

EDUARDO GOMES DE MENDONÇA

Influência de inibidores proteicos e não-proteicos de proteases digestivas e
caracterização bioquímico-cinética de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de
Anticarsia gemmatalis

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

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M539i
2012

Mendonça, Eduardo Gomes de, 1983-
Influência de inibidores proteicos e não-proteicos de
proteases digestivas e caracterização bioquímico-cinética de
cisteíno-proteases parcialmente purificadas de
Anticarsia gemmatalis / Eduardo Gomes de Mendonça. –
Viçosa, MG, 2012.
xv, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Enzimas proteolíticas - Inibidores.
3. Cinética enzimática. 4. Relação inseto-planta. 5. Soja.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

EDUARDO GOMES DE MENDONÇA

Influência de inibidores proteicos e não-proteicos de proteases digestivas e
caracterização bioquímico-cinética de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de
Anticarsia gemmatalis

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

Aprovada: 28 de Maio de 2012.

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Coorientadora)
(UFV)

Prof^a. Liliane Evangelista Visotto
(UFV-RP)

Prof. Wellington Garcia Campos
(UFSJ)

Dr^a. Camila Rocha da Silva

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)
(UFV)

Onipresentes em minha vida... Base forte do meu caráter... Amor ainda não cantado por nenhum compositor... Vocês são o meu “sempre”, de todo dia, de toda hora, de todo minuto e de toda minha eternidade. Dedico a vocês mais uma vitória. Ao meu pai Sinval, à minha mãe Maria Helena e à minha irmã Kiara.

AGRADECIMENTOS

Sou grato:

À Deus, que em sua obra perfeita nos permite evoluir moral e intelectualmente e buscar sermos cada dia melhores. Obrigado pela presença constante em todos os momentos, inclusive os de ilusória angústia e desespero;

À Universidade Federal de Viçosa, minha casa durante os anos de graduação mestrado e doutorado, e à toda sua equipe de profissionais;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela formação do que sou hoje;

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo, sem a qual seria impossível realizar esse tão sonhado doutorado;

Ao meu orientador Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pelo incentivo, acompanhamento, apoio e paciência durante esses 6 anos de convivência;

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, minha eterna mestra e guia na arte de trabalhar com enzimas. Obrigado por sempre acreditar em mim! Sei do seu carinho e dedicação com todos os seus orientados... seus verdadeiros filhos aqui dentro dessa Universidade;

Ao Bioagro e ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, por me permitir o desenvolvimento técnico de que necessitava;

Ao Dudu, secretário da Pós... mais que um amigo, um guardião de todos nós, sempre presente e prestativo;

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia: Anderson, Camila, Franciny, Fabrício, Adriana, Ritinha, Lídia, Elias, Mayara e Francelina, pelos momentos de descontração, pelas inúmeras discussões técnicas, pela amizade e carinho durante esses anos;

Em especial à Franciny, por toda dedicação durante nosso aprimoramento. Ela que está comigo desde a iniciação científica, ajudando nos experimentos, nos discussões, nos projetos... Sem sua companhia não teria chegado até aqui;

À Camila Rocha, agregada que se tornou membro da família Enzimologia, com quem me identifico nos pensamentos e ações. Obrigado pela sincera amizade.

Aos meus grandes amigos de Viçosa, Cris, Filipe, Deisy, Bebel, Anoca, Xuxu, Erica, Renata, Janini e Marcos, por acreditarem em mim e me mostrar a todo dia, mesmo que eu não quisesse acreditar, que sou capaz. Obrigado por serem minhas referências aqui em Viçosa;

Em especial ao Filipe... Como diria Paulo Coelho: “Você foi a esperança nos meus dias de solidão, a angústia dos meus instantes de dúvida, a certeza nos momentos de fé”. Muito obrigado.

E como esquecer da pessoa de cuja boca saem as palavras mais sábias e sensatas, pelas quais sempre me guio: Cris, obrigado por tudo.

Aos amigos de república, Roque, Rodolfo, Caio e Theus, os quais me ajudaram a esquecer que viramos gente grande;

Ao meu grande irmãozão Carlos, por quem tenho uma admiração e afeto sem igual;

À minha prima Erica, por ter me dado um lar perto de Viçosa, onde pude me aconchegar quando não tive minha mãe por perto e por ter me dado as pequenas luminárias da minha vida: Pedro, Miguel e Helena;

À minha madrinha Pepeta, minha fada-madrinha, meu anjo da guarda, minha estrela guia, por sempre estar cuidando de mim;

Aos meus pais, Maria Helena e Sinval, pela oportunidade oferecida, pela mão sempre estendida, pelo apoio na hora certa, pelas palavras carinhosas e cheias de amor, pelo abraço calado que me fortaleceu, pela confiança de estarem fazendo a coisa certa e pela vitória que hoje posso oferecer a vocês;

À minha irmã, de sangue, de alma, de coração, de espírito, de pensamento... Kiara. Você sabe como é fundamental em todas as minhas vidas. Sabe como agradeço todos os dias por você ser minha irmã e estar na minha vida dessa maneira tão especial;

Muito obrigado!

“Como é fácil ser difícil. Basta ficar longe dos outros e, desta maneira, não vamos sofrer nunca.

Não vamos correr os riscos do amor, das decepções, dos sonhos frustrados.

Como é fácil ser difícil. Não precisamos nos preocupar com telefonemas que precisam ser dados, com pessoas que pedem nossa ajuda, com a caridade que é necessário fazer.

Como é fácil ser difícil. Basta fingir que estamos numa torre de marfim, que jamais derramamos uma lágrima.

Basta passar o resto de nossa existência representando um papel.

Como é fácil ser difícil. Basta abrir mão do que existe de melhor na vida.”

Maktub – Paulo Coelho

BIOGRAFIA

Eduardo Gomes de Mendonça, filho de Sinval Resende de Mendonça e Maria Helena Gomes de Mendonça, nasceu em 28 de Julho de 1983, na cidade de Patos de Minas, Estado de Minas Gerais.

Em Maio de 2002 iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, tendo colado grau em 5 de Maio de 2006.

Em 15 de Maio de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, defendendo dissertação em 27 de fevereiro de 2008, obtendo o título de *Magister Scientiae*.

Em 03 Março de 2008 iniciou seu doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela mesma Universidade, defendendo tese em 28 de Maio de 2012 e obtendo o título de *Doctor Scientiae*.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xi |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| OBJETIVO GERAL | 2 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 2 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 3 |
| CAPÍTULO 1 - EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES PROTEICOS E NÃO- PROTEICOS NO DESENVOLVIMENTO LARVAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM <i>Anticarsia gemmatalis</i> | 5 |
| RESUMO..... | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| INTRODUÇÃO | 7 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 9 |
| Criação da lagarta da soja | 9 |
| Alimentação de <i>A. gemmatalis</i> | 9 |
| Desenvolvimento pós-embriológico de <i>A. gemmatalis</i> | 9 |
| Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático | 10 |
| Determinação da concentração de proteína | 10 |
| Atividade de proteases totais | 10 |
| Atividade de serino-proteases | 11 |
| Atividade de cisteíno-proteases | 11 |
| Análises estatísticas | 12 |
| RESULTADOS | 12 |
| Sobrevivência e desenvolvimento de <i>A. gemmatalis</i> | 12 |

| | |
|---|----|
| Atividades enzimáticas | 15 |
| DISCUSSÃO | 18 |
| CONCLUSÃO..... | 20 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 21 |
| CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CISTEÍNO-PROTEASES PARCIALMENTE PURIFICADAS DO INTESTINO MÉDIO DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> | 26 |
| RESUMO..... | 26 |
| ABSTRACT | 27 |
| INTRODUÇÃO | 28 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| Criação da lagarta da soja | 30 |
| Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático | 30 |
| Determinação da concentração de proteínas..... | 31 |
| Atividade enzimática de cisteíno-protease | 31 |
| Precipitação diferencial com sulfato de amônio [(NH ₄) ₂ SO ₄]..... | 31 |
| Cromatografia de afinidade em coluna de Aprotinina-agarose | 32 |
| Cromatografia de afinidade em coluna de Thiol-sepharose | 32 |
| Eletroforese em gel de poliacrilamida | 32 |
| Efeito de pH e temperatura | 33 |
| Determinação dos parâmetros cinéticos | 33 |
| Efeito da concentração de íons cálcio..... | 34 |
| Efeito de modificadores químicos..... | 34 |
| RESULTADOS | 35 |
| Purificação parcial de cisteíno-proteases de <i>Anticarsia gemmatalis</i> | 35 |
| Efeito do pH sobre a atividade enzimática | 37 |
| Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática..... | 38 |
| Determinação dos parâmetros cinéticos | 39 |

| | |
|---|----|
| Efeito da concentração de íons cálcio | 42 |
| Efeito de EDTA..... | 43 |
| Efeito de Pepstatina A..... | 43 |
| Efeito de Aprotinina | 44 |
| Efeito de TLCK..... | 45 |
| DISCUSSÃO | 46 |
| CONCLUSÃO..... | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(NH₄)₂SO₄ - Sulfato de Amônio

Arg - Arginina

BSA - Albumina de Soro Bovino

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

DTT - Ditioneitol

E-64 - N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EI - Complexo Enzima-Inibidor

HCl - Ácido Clorídrico

IP - Inibidor de Protease

kDa - Kilodaltons

K_{M app} - Constante de Michaelis-Menten aparente

L-BApNA -

Lys - Lisina

NaOH - Hidróxido de Sódio

SBBI - Inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SKTI - Inibidor de tripsina da soja do tipo Bowman-Birk

TCA - Ácido Tricloroacético

TLCK - N-tosil-L-lisina clorometil cetona

Tris - Tris (hidroximetil) amino metano

V_{max app} - Velocidade máxima aparente

RESUMO

MENDONÇA, Eduardo Gomes de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2012. **Influência de inibidores proteicos e não-proteicos de proteases digestivas e caracterização bioquímico-cinética de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *Anticarsia gemmatalis***. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Joel Antônio de Oliveira, Marcelo Matos Santoro e Thiago Rennó dos Mares Guia.

Os inibidores de proteases têm efeito protetor de plantas contra danos causados por vários tipos de pragas agrícolas, inibindo, significativamente, a atividade proteolítica de enzimas presentes no intestino dos insetos. A ingestão de inibidores de proteases leva os insetos a utilizarem aminoácidos livres na síntese de mais proteases digestivas, com a finalidade de compensar as formas dessas enzimas indisponíveis à catálise, justamente por estas estarem na forma do complexo enzima-inibidor (EI). Conseqüentemente, ao invés de utilizarem os aminoácidos biodisponíveis para a síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução os insetos usam sua reserva aminoacídica para a biossíntese de novas proteases para realizar a hidrólise de sua dieta proteica. A caracterização bioquímica e cinética de enzimas hidrolíticas presentes no intestino de insetos tem sido realizada para se entender o complexo sistema de proteases dos insetos sob o ponto de vista da relação estrutura/função. Dessa forma, os centros ativos de tais enzimas poderão ser mapeados através de cinética enzimática e química de proteínas, com o objetivo de produzir inibidores específicos para cada protease. Neste trabalho foram selecionados os inibidores de proteases SBBI, SKTI e E-64, a fim de avaliar seus efeitos sobre o desenvolvimento larval de *Anticarsia gemmatalis* e sobre a atividade de algumas enzimas digestivas, tais como proteases totais, serino-proteases tripsinas-like e cisteíno-proteases. Esses inibidores foram adicionados individualmente na dieta artificial na concentração de 0,1% (p/v) e lagartas de 1º instar foram alimentadas até completarem seu ciclo larval. Os três inibidores utilizados causaram prejuízo no desenvolvimento de larvas de *A. gemmatalis*, aumentando o ciclo larval e afetando o ganho de peso dessas larvas até a fase pupal. A concentração de IP's utilizada foi insuficiente para causar efeito inibitório das proteases presentes no intestino de *A. gemmatalis*. Porém o perfil de proteases coincidiu com o perfil das proteases

específicas tripsina-like e cisteíno-proteases, sendo que as serino-proteases apresentaram maior atividade do que as cisteíno-proteases. Foi realizada também a purificação parcial de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* utilizando-se precipitação diferencial com 30 – 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de afinidade com coluna de aprotinina-agarose. As proteínas não ligadas à coluna, ou seja, todas as proteínas presentes no extrato bruto com exceção das serino-proteases ligadas à aprotinina-agarose, que apresentaram atividade proteolítica, foram reunidas num pool enzimático e caracterizadas utilizando o substrato sintético L-BApNA na presença do inibidor de serino-proteases benzamidina. Observaram-se picos de atividade nos valores de pH 4,0, 5,5 e 8,0, sendo o pH 8,0 o de melhor atividade. Com relação à influência da temperatura, observaram-se dois picos mais discretos de atividade a 20°C e entre 35 – 45°C, e um pico de atividade pronunciada na faixa entre 55 – 60°C. O $K_{M \text{ app}}$ obtido foi de 0,74 mM e a $V_{\text{max app}}$ foi 0,8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise do efeito de íons cálcio mostrou que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas são cálcio-dependentes e apresentaram melhor atividade em 30 mM de CaCl_2 . A presença do inibidor de serino-proteases benzamidina e do agente redutor DTT no meio reacional, juntamente com os dois inibidores de serino-proteases aprotinina e TLCK comprovam a atividade de cisteíno-proteases testadas no presente trabalho.

ABSTRACT

MENDONÇA, Eduardo Gomes de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Influence of proteinaceous and non-proteinaceous digestive protease inhibitors and kinetic biochemical characterization of cysteine-proteases partially purified of *Anticarsia gemmatalis*.** Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Advisors: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Joel Antônio de Oliveira, Marcelo Matos Santoro and Thiago Rennó dos Mares Guia.

The protease inhibitors have protective effect of plants against damage from various types of agricultural pests, inhibiting significantly the activity of proteolytic enzymes in the gut of insects. Ingestion of protease inhibitors leads insects to use free amino acids in the synthesis of more digestive proteases, in order to compensate forms of these enzymes unavailable to catalysis, precisely because they are in the form of enzyme-inhibitor complex (EI). Consequently, instead of using bioavailable amino acids for synthesis of proteins necessary for growth, development, maintenance and breeding, insects using the amino acid reservation for biosynthesis of new proteases to perform the hydrolysis of the diet protein. The biochemical and kinetic characterization of hydrolytic enzymes in the gut of insects has been made to understand the complex system of proteases of insects from the view of the structure/function. Thus, the active centers of these enzymes can be mapped through enzyme kinetics and protein chemistry, with the goal of producing protease inhibitors specific for each. In this work we selected protease inhibitors SBBI, SKTI and E-64 in order to evaluate its effects on larval development of *Anticarsia gemmatalis* and on the activity of some digestive enzymes such as total proteases, trypsin-like serine proteases and cysteine proteases. These inhibitors were added individually on artificial diet at a concentration of 0.1% (w/v) and first instar larvae were fed to complete their larval cycle. The three inhibitors used caused injury in the development of larvae of *A. gemmatalis*, increasing the larval cycle and affecting the weight gain of the larvae to the pupal stage. The concentration of PI used was insufficient to cause the inhibitory effect of proteases present in the gut of *A. gemmatalis*. But the profile of proteases coincided with the profile of specific proteases trypsin-like and cysteine proteases, and the activity serine-proteases were higher than cysteine proteases. It was also done partial purification of midgut

cysteine proteases of *Anticarsia gemmatalis* using differential precipitation with 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and affinity chromatography with aprotinin-agarose column. The proteins not bound to the column, ie all the proteins present in the crude extract with the exception of serine proteases associated with aprotinin-agarose, which showed proteolytic activity were pooled enzyme and characterized using the synthetic substrate L-BApNA in the presence the serine protease inhibitor benzamidine. Observed peak activity at pH values 4.0, 5.5 and 8.0, being the best activity in pH 8.0. Regarding the influence of temperature, we observed two more discrete peaks activity at 20°C and between 35-45°C, and a pronounced peak of activity 55-60°C. The $K_{M \text{ app}}$ obtained was 0.74 mM and $V_{\text{max app}}$ was 0.8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Analysis of the calcium ions effect showed that partially purified cysteine proteases are calcium-dependent and showed a better activity in 30 mM CaCl_2 . The presence of the serine protease inhibitor benzamidine and the reducing agent DTT in the reaction medium together with the two inhibitors of serine proteases TLCK and aprotinin proved the activity of cysteine proteases tested in this study.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. 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, necessitando ser controlados. As próprias plantas possuem mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. Estudos mostram que os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra herbivoria e doenças. Na via dos octadecanóides, que está ligada a importantes processos fisiológicos da planta como crescimento, desenvolvimento, senescência e biossíntese de moléculas regulatórias, a hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico que, após uma redução e três β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico, que tem atividade de fitohormônio e está envolvido na regulação dos processos de desenvolvimento, bem como na resposta de defesa da planta através da indução da expressão de genes que codificam inibidores de proteases (GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992; CROFT *et al.*, 1993). É postulado que inibidores de proteases têm efeito em proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER *et al.*, 1987; RYAN, 1990). Quando ocorrem ferimentos em folhas de plantas, há um aumento da síntese de inibidores de proteases no local do ferimento, como também em folhas mais distantes (FARMER e RYAN, 1992). Foi constatado que diversos compostos identificados em plantas podem regular a expressão dos genes que codificam para inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, o ácido abscísico, o metil jasmonato, o ácido jasmônico e a sistemina (SILVA *et al.*, 2002, HERDE *et al.*, 2008).

Falhas no método tradicional de controle de insetos e a pressão da sociedade pelo uso de técnicas mais sustentáveis têm estimulado o desenvolvimento de novos métodos para controlar pragas (LALITHA *et al.*, 2005). Um melhor entendimento sobre enzimas digestivas de insetos pode ser uma alternativa chave para desenvolver cultivares resistentes a insetos. Conhecendo-se o mecanismo enzimático e catalítico, o sítio ativo dessas enzimas, bem como as bases de resistências a alguns insetos (PEREIRA *et al.*, 2010), códigos para proteínas e

peptídeos poderão ser inseridos ao genoma da planta ou peptídeos sintéticos poderão ser pulverizados diretamente na cultura.

Uma possível ferramenta adicional ao manejo integrado de pragas é o uso de genes de plantas que codificam inibidores de proteases. Os inibidores de proteases têm se mostrado eficazes na inibição de proteases de insetos, acarretando déficit no crescimento larval, quando adicionados em dietas artificiais (PILON *et al.*, 2006). Porém, alterações no desenvolvimento larval por um inibidor de protease individual não é unânime. Alguns insetos são bem adaptados a este mecanismo de defesa da planta hospedeira. Uma dessas adaptações refere-se ao aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes, na tentativa de burlar o efeito inibitório (PILON *et al.*, 2006). São necessários múltiplos inibidores de proteases para se obter êxito contra as atividades proteolíticas mais pronunciadas no intestino de insetos. E para se alcançar esse objetivo é fundamental a caracterização das enzimas proteolíticas do intestino desses insetos.

Muitos insetos utilizam cisteíno-proteases para digerir proteínas adquiridas na dieta. O crescimento e desenvolvimento destas pragas são seriamente afetados por inibidores de cisteíno-proteases. A redução da proteólise dentro do intestino desses insetos, causado pela inibição de cisteíno-protease, resulta numa carência de aminoácidos livres, levando a efeitos prejudiciais no crescimento e desenvolvimento dos insetos, os quais mobilizarão outras proteínas e aminoácidos na tentativa de suprir a diminuição de atividade.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo testar três inibidores de proteases na alimentação de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e caracterizar cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino da lagarta da soja, buscando entender a relação estrutura-função das enzimas envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Criação de lagartas da soja com dietas artificiais contendo os inibidores de proteases SKTI, SBBI e E-64;

Avaliar o efeito desses inibidores no desenvolvimento e performance do inseto;

Avaliar o efeito desses inibidores nas enzimas digestivas do inseto;

Purificar enzimas cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* utilizando colunas de afinidade;

Testar a pureza da purificação através de eletroforese;

Caracterizar as enzimas quanto aos seus parâmetros cinéticos e presença de modificadores químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CROFT, K.P.C., JÜTTNER, F., SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol.*, 101:13-24, 1993.

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.

GARDNER, W.H. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1084: 221-239, 1991.

HERDE, M.; GARTNER, K.; KOLLNER, T.G.; FODE, B.; BOLAND, W.; GERSHENZOU, J.; GATZ, C. & THOLD, D.. Identification and regulation of TPS04/GES, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. *The Plant Cell*, Vol. 20: 1152-1168, 2008.

HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature.*, 300:160-160, 1987.

LALITHA, S.; SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; NIELSEN, S.S. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 227–235. 2005.

PEREIRA, D.A.; RAMOS, M.V.; SOUZA, D.P.; PORTELA, T.C.L.; GUIMARÃES, J.A.; MADEIRA, S.V.F.; FREITAS, C.D.T. Digestibility of defense proteins in latex of milkweeds by digestive proteases of Monarch butterflies, *Danaus plexippus* L.: A potential determinant of plant–herbivore interactions. *Plant Science*, 179: 348-355, 2010.

PILON, A. M. Resposta bioquímica e fisiológica da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) ao inibidor de protease benzamidina. Viçosa, MG: UFV. 60p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 2004.

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. Pestic. Bioch. Physiol. 86, 26-29. 2006.

RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 28:425-449, 1990.

SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L.P.; PIOVESSAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSE, I.C.; MOREIRA, M. A. . Função Fisiológica de Lipoxigenases de Folhas de Soja submetidas ao ataque de Lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 69: 67-74, 2002.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES PROTEICOS E NÃO-PROTEICOS NO DESENVOLVIMENTO LARVAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM *Anticarsia gemmatalis*

RESUMO

Os inibidores de proteases ocorrem naturalmente em muitas famílias botânicas desempenhando diversas funções. Eles podem atuar nos processos fisiológicos das plantas, como reservas proteicas e, principalmente na defesa de plantas contra insetos herbívoros. Os inibidores funcionam como substratos específicos para as proteases digestivas pois formam um complexo estável o qual limita a velocidade de proteólise e interfere no consumo e assimilação do alimento, afetando negativamente o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos. Neste trabalho foram testados os inibidores de proteases SBBI (inibidor de tripsina e quimotripsina), SKTI (inibidor de tripsina) e E-64 (inibidor de cisteíno-proteases) na alimentação de larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Esses inibidores foram usados, individualmente, na dieta artificial fornecida a essas lagartas, na concentração de 0,1% (p/v) e seus efeitos sobre o desenvolvimento larval foi acompanhado assim como as atividades enzimáticas de suas enzimas digestivas. Os três inibidores utilizados causaram prejuízo no desenvolvimento de larvas de *A. gemmatalis*, aumentando o ciclo larval e afetando o ganho de peso dessas larvas até a fase pupal. O ciclo larval de *A. gemmatalis* alimentadas com inibidores de protease apresentaram maior duração, sendo, em média, de 25 dias, e o peso médio foi menor que 200mg. Já as lagartas criadas com a dieta controle, ou seja, sem inibidor, apresentaram significativamente um menor ciclo larval (22 dias) e um maior peso médio de aproximadamente 300mg. Não foi verificado efeito de inibidores na sobrevivência de *A. gemmatalis*, o mesmo ocorreu com as atividades enzimáticas presentes no intestino médio desse inseto. Os perfis enzimáticos mostram que a atividade proteásica no intestino de *A. gemmatalis* se deve preponderantemente à ação de serino-proteases tripsinas-like, uma vez que analisando o gráfico de proteases totais e o de serino-protease, esses tiveram o mesmo perfil. A atividade de cisteíno-protease é baixa quando comparada à atividade de serino-proteases.

Conclui-se portanto que o uso de inibidores na alimentação de *A. gemmatalis* causa decréscimo no peso larval desse inseto aumentando seu ciclo larval, porém a dose utilizada pode não ter sido suficiente para a inibição de suas proteases digestivas.

ABSTRACT

Protease inhibitors occur naturally in many botanical families carrying out various functions. They can act in the physiological processes of plants, such as protein and reserves, mainly in plant defense against insect herbivores. The inhibitors act as substrates for specific digestive proteases because they form a stable complex which limits the rate of proteolysis and impacts on consumption and assimilation of food negatively affecting the development and survival of the insects. In this work were tested SBBI protease inhibitors (inhibitor of trypsin and chymotrypsin), SKTI (trypsin inhibitor) and E-64 (cysteine protease inhibitor) on the feeding of larval *Anticarsia gemmatalis*. These inhibitors were used individually on artificial diet to these caterpillars at a concentration of 0.1% (w/v) and their effects on larval development was followed as well as the enzymatic activities of their digestive enzymes. The three inhibitors used caused injury in the development of larvae of *A. gemmatalis*, increasing the larval cycle and affecting the weight gain of the larvae to the pupal stage. The larval cycle of *A. gemmatalis* fed protease inhibitors showed greater length being on average 25 days, and the average weight was less than 200mg. As for the larvae reared on the diet control, ie no inhibitor, had significantly lower larval cycle (22 days) and a higher mean weight of approximately 300mg. There was no effect of inhibitors on the survival of *A. gemmatalis*, so did the enzymatic activities present in the midgut of this insect. The profiles show that the enzymatic activity in the gut protease of *A. gemmatalis* preponderantly is due to the action of serine proteases-like trypsin, since the analyzing chart of total proteases and serine protease, they have the same profile. The cysteine protease activity is lower compared to the activity of serine proteases. It is therefore concluded that the use of inhibitors in feed *A. gemmatalis* cause decrease in larval weight increasing cycle of this insect larvae, but the dose may not have been sufficient for inhibiting their digestive proteases.

INTRODUÇÃO

Cultivada no mundo todo, a soja destaca-se como um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil. A expansão dos cultivos de soja tem aumentado sua vulnerabilidade a insetos-praga (KOGAN E TURNIPSEED, 1987), dentre as quais a lagarta da soja é o desfolhador mais importante (TURNIPSEED E KOGAN, 1976). 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 a lagarta da soja é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (PRAÇA *et al.*, 2006; SÁVIO *et al.*, 2008).

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma das novas ferramentas 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, composto 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 degradação de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores são considerados agentes antimetabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência proteica. Essa interferência na digestão diminui a biodisponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Outra hipótese é que os inibidores afetem o desenvolvimento dos insetos de forma indireta, via um mecanismo de “*feedback*”, que levaria a um aumento da produção de proteases digestivas, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes de enzimas hidrolíticas, para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2006; PILON, *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010). Os aminoácidos seriam deslocados para síntese de mais serino-proteases ou de outros tipos de proteases em detrimento de

outras proteínas essenciais ao seu crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

As famílias de inibidores de serino-proteases mais bem caracterizadas da soja são as do tipo 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 BBI 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 que conferem grande estabilidade à sua estrutura, distribuídas entre 70 a 90 resíduos de aminoácidos (RICHARDSON, 1991). O primeiro inibidor pertencente à família BBI, 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 P₁ e para a quimotripsina há presença de um grupo aromático ou um grupo hidrofóbico de cadeia longa nesta mesma posição. (LIN *et al.*, 1993). Os inibidores da família KTI 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 que proporcionam estabilidade à estrutura proteica (RICHARDSON, 1991). Outra classe de inibidores são os peptídeos epóxidos, inibidores irreversíveis baseados no composto E-64 isolado por HANADA *et al.* (1978) de um extrato de *Aspergillus japonicus*, os quais inibem cisteíno-proteases papaína-like. A inibição de proteases da família da papaína por E-64 resulta da ocupação de subsítios da enzima seguido por alquilação da cisteína da tríade catalítica pelo grupo trans epóxido (SALVESEN & NAGASE, 2001).

Neste trabalho foram utilizados dois inibidores de serino-proteases de tripsina da soja, SBBI e SKTI, e o inibidor de cisteíno-proteases, E-64, na alimentação de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). O efeito desses inibidores foram avaliados através do acompanhamento da performance do inseto e da determinação da atividade proteolítica de suas enzimas digestivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação da lagarta da soja

Os insetos foram mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. 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 foram alimentados 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°C , com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas.

Alimentação de *A. gemmatalis*

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. Os tratamentos consistiram de quatro dietas distintas: 1- Dieta artificial sem inibidor de protease (dieta controle); 2- Dieta contendo 0,1% (p/v) de SBBI; 3- Dieta contendo 0,1% (p/v) de SKTI e 4- Dieta contendo 0,1% (p/v) de E-64.

Desenvolvimento pós-embrionário de *A. gemmatalis*

Cinquenta larvas de primeiro ínstar de *A. gemmatalis*, provenientes da criação-estoque, foram individualizadas em potes plásticos de 200 mL. Os potes foram cobertos com uma tampa plástica com orifício central de 1 cm de diâmetro recoberto por tecido de organza e mantidos em câmara climatizada. As lagartas

foram alimentadas, diariamente, com dieta artificial nos 4 tratamentos mencionados. A duração da fase larval, bem como a sobrevivência dos adultos foi determinada para cada tratamento. A duração do ciclo de vida foi obtida pelo número de dias compreendidos entre a individualização das lagartas até a morte dos adultos. A partir da individualização, as lagartas foram pesadas diariamente até atingirem a fase de pupa, sendo o número de repetições igual ao número de lagartas.

Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático

Lagartas de 1º ao 5º instares foram utilizadas para se determinar as atividades enzimáticas. Três intestinos de cada ínstar foram colocados em tubo plásticos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução HCl 10^{-3} M a 4 °C. O experimento foi realizado em 3 repetições para cada ínstar, ou seja, três intestinos em cada tubo, três tubos por ínstar. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular dos intestinos em gral de porcelana, com auxílio de um pistilo, sobre banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel, chamado de extrato bruto, foi separado e mantido a -80°C para análises posteriores.

Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA na faixa de concentração de 0-0,2mg/mL como padrão.

Atividade de proteases totais

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli *et al.* (1949) utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 37°C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos plásticos de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25°C

para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 μL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 μL de NaOH 1M. A atividade foi determinada no sobrenadante com leituras de absorvâncias a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas. Cada repetição consistiu de um tubo contendo três intestinos cada.

Atividade de serino-proteases

A atividade amidásica foi determinada segundo o método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando o substrato cromogênico para tripsina-*like* L-BApNA (N- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl_2 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 500 μL de substrato e 10 μL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorvância da amostra foi obtida em 410 nm em função do tempo (2,5 min), a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

Atividade de cisteíno-proteases

A atividade amidásica de cisteíno-proteases foi realizada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961) com modificações conforme Mendonça *et al.* (2011 e 2012), utilizando-se 500 μL do substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA) na concentração final de 0,5 mM, na temperatura de 25°C e 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20mM de CaCl_2 e 5mM de Ditioneitol (DTT) para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Ao extrato foi adicionado 100 μL do inibidor de serino-protease benzamidina na concentração final de 1mM, a qual corresponde ao K_i de inibição de tripsinas-like por benzamidina. A reação foi realizada durante 2,5 minutos com leitura de absorvância a 410 nm a cada 30s. Para a determinação da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, p-nitroanilina, 8800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Todos os experimentos envolvendo determinação da atividade enzimática foram realizados

com três repetições utilizando o mesmo extrato enzimático em todas as determinações, não variando, portanto, o conteúdo protéico de cada análise.

Análises estatísticas

Foi usada a regressão de Cox para análise de sobrevivência, usando o procedimento PHREG do programa SAS. Já o ganho de peso foi analisado utilizando regressões não lineares também pelo programa SAS.

RESULTADOS

Sobrevivência e desenvolvimento de *A. gemmatalis*

De acordo com a análise de sobrevivência (Figura 1), a ingestão de inibidores de proteases não afetou significativamente a sobrevivência das lagartas em nenhum dos tratamentos.

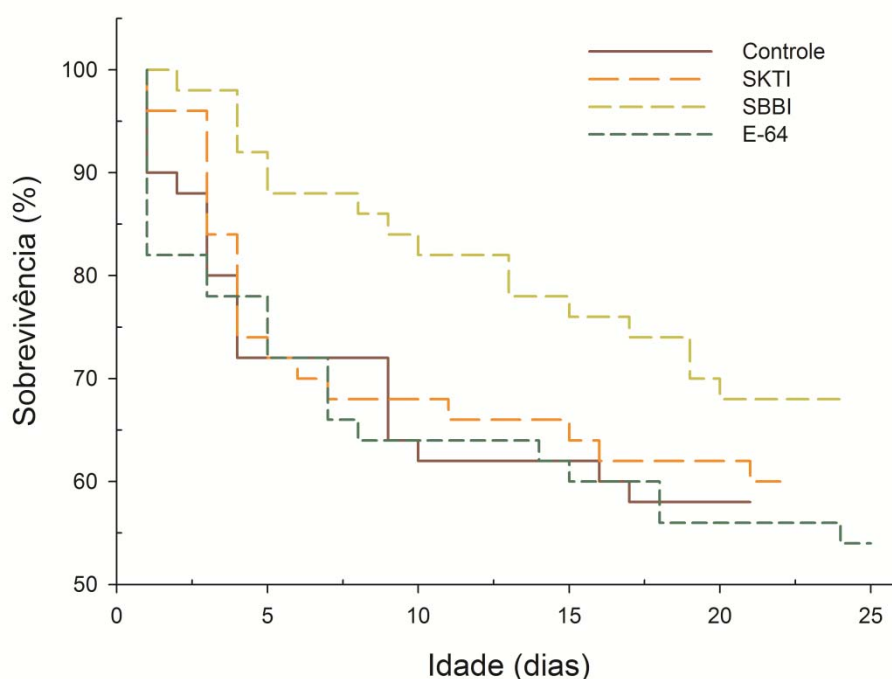


Figura 1 - Sobrevivência acumulada de *A. gemmatalis* (n = 50) alimentadas com dieta controle e dietas contendo 0,1% dos diferentes IP's em função do tempo.

A análise de ganho de peso das lagartas (Tabela 1) seguiu tendência distinta da sobrevivência, tendo as lagartas criadas sem inibidor de proteases apresentado maior ganho de peso quando comparadas às lagartas criadas com os inibidores de proteases (SBBI, SKTI e E-64) (Figura 2). O peso médio das lagartas alimentadas sem inibidores de proteases chegou a aproximadamente 300mg entre o 15º e o 19º dias, o que corresponde ao 5º ínstar do ciclo de desenvolvimento. A biomassa incorporada pelas lagartas durante a fase larval foi menor nas lagartas criadas com inibidores de proteases (Figura 2), indicando que a ingestão de inibidor resultou em menor ganho de peso pelas lagartas quando comparadas àquelas que consumiram dieta sem a adição de inibidores.

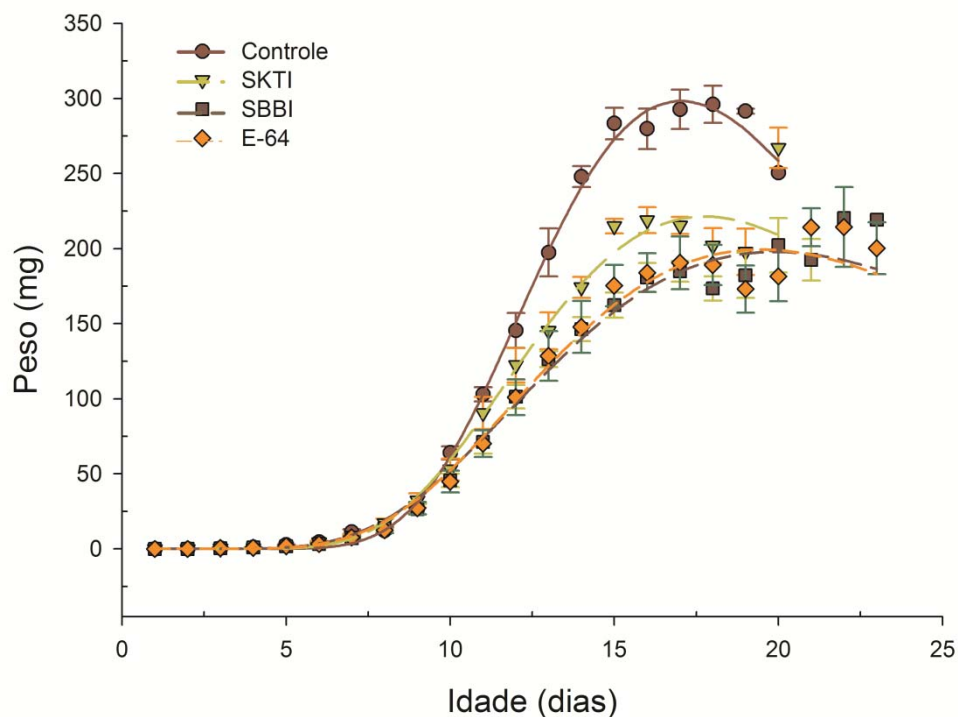


Figura 2 - Peso das larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dietas contendo 0,1% dos diferentes IP's em função do tempo. Os pontos representam as médias das 50 repetições avaliadas e as barras o erro padrão.

Tabela 1. Análise de regressão não-linear de ganho de peso de lagartas da soja (*Anticarsia gemmatalis*) alimentadas com dieta controle e dietas contendo 0,1% dos diferentes IP's mostradas na Figura 2.

| Modelo (log normal, 3 parâmetros) | Inibidor | Parâmetros estimados (\pm EPM) | | | Graus de liberdade do erro | F | R ² |
|--------------------------------------|----------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|---------|----------------|
| | | A | b | C | | | |
| $y = a \exp(-0.5(\ln(x/b)/c)^2)$ | Controle | 298.46 (\pm 3.61) | 17.03 (\pm 0.19) | 0.30 (\pm 0.01) | 90 | 2415.40 | 0.98 |
| | SKTI | 221.45 (\pm 4.01) | 17.75 (\pm 0.39) | 0.35 (\pm 0.02) | 93 | 1097.08 | 0.96 |
| | SBBI | 197.84 (\pm 3.78) | 19.89 (\pm 0.55) | 0.42 (\pm 0.02) | 100 | 1192.48 | 0.96 |
| | E-64 | 199.44 (\pm 4.81) | 19.45 (\pm 0.61) | 0.41 (\pm 0.03) | 101 | 600.23 | 0.92 |

Todos os parâmetros estimados foram significativos a $P < 0.01$ pelo teste de t de Student e todos os modelos foram significativos a $P < 0.01$ pelo teste de F de Fisher.

Atividades enzimáticas

As análises das atividades das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* durante o desenvolvimento larval em função da idade são mostradas na Figura 3. Apenas as atividades enzimáticas analisadas sem a presença de inibidores é que permitiram que uma regressão se ajustasse aos dados obtidos (Tabela 2). Na Figura 3A observa-se um aumento da atividade de proteases totais do intestino médio de *A. gemmatalis* com o tempo de desenvolvimento do inseto. A atividade de serino-proteases e cisteíno-proteases seguem o mesmo padrão da atividade de proteases totais (Figura 3B). Os dados apresentados na Figura 3 (A e B) sugerem que há predominância da atividade de serino-proteases no intestino de *A. gemmatalis* quando comparada a cisteíno-proteases. Os resultados mostram que o perfil de atividade entre serino e cisteíno-proteases são semelhantes, mas que cisteíno é uma protease menos importante, uma vez que serino é a protease com valores de atividades muito maiores do que cisteíno.

Pode ter havido uma produção de outras proteases da mesma classe ou de classes diferentes e isso impediu que o efeito dos inibidores testados fosse analisado. Essa produção pode ter mascarado o efeito prejudicial dos inibidores, o que justifica os valores similares de atividade enzimática encontrados em todos os tratamentos.

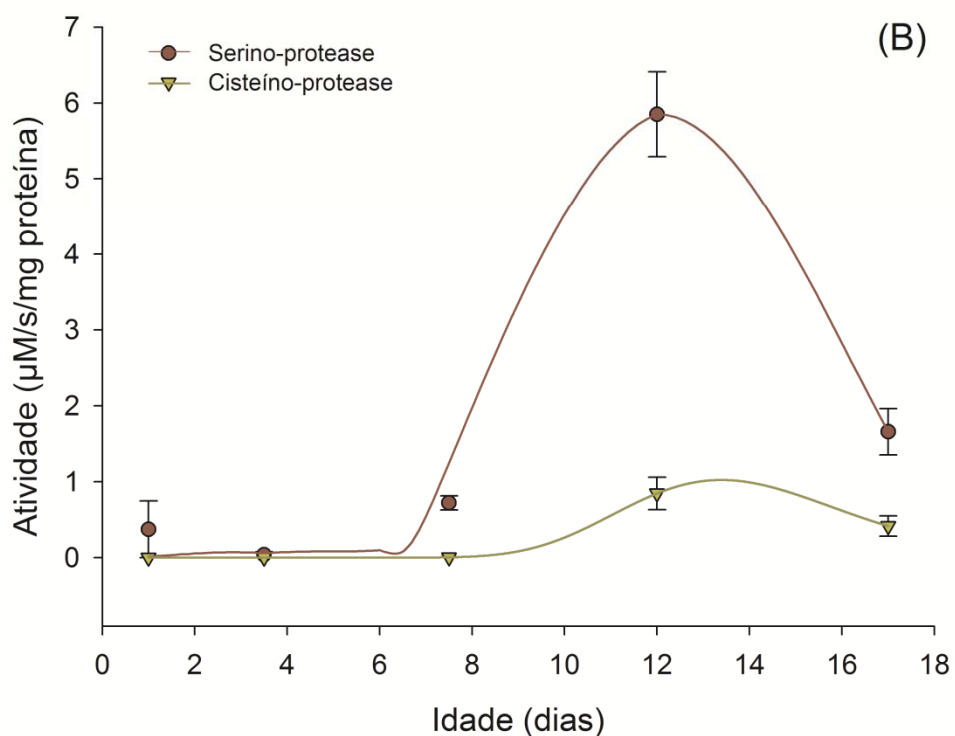
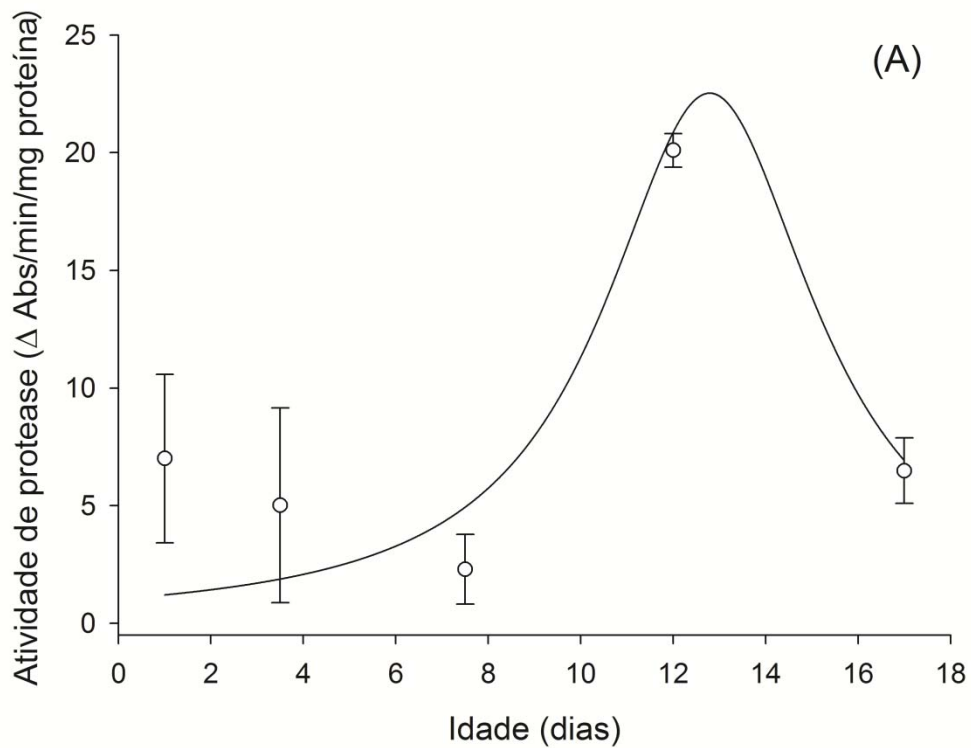


Figura 3 - Atividade específica de (A) proteases totais e (B) serino e cisteíno-proteases do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta sem inibidores de proteases em função do desenvolvimento larval representado em dias. Pontos representam as médias de 3 repetições e as barras o erro padrão.

Tabela 2. Análise de regressão não-linear das atividades de enzimas do intestino médio de lagartas da soja (*Anticarsia gemmatalis*) alimentadas com dieta controle e dietas contendo 0,1% dos diferentes IP's mostradas na Figura 3.

| Modelo (log normal, 3 parâmetros) | Atividade | Parâmetros estimados (\pm EPM) | | | Graus de liberdade do erro | F | R ² |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|--------|----------------|
| | | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | | | |
| $y = a \exp(-0.5(\ln(x/b)/c)^2)$ | Proteases totais | 22.53 (\pm 6.64) | 12.79 (\pm 1.14) | 2.80 (\pm 1.03) | 12 | 8.16 | 0.58 |
| | Serino-proteases | 6.42 (\pm 0.62) | 12.95 (\pm 0.34) | 1.56 (\pm 0.17) | 12 | 108.66 | 0.95 |
| | Cisteíno-proteases | 1.02 (\pm 1.42) | 13.39 (\pm 2.90) | 0.18 (\pm 0.30) | 12 | 26.60 | 0.82 |

Todos os parâmetros estimados foram significativos a $P < 0.01$ pelo teste de *t* de Student e todos os modelos foram significativos a $P < 0.01$ pelo teste de F de Fisher.

DISCUSSÃO

Vários estudos já 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). Tem sido demonstrado que a ingestão de inibidores de proteases em dietas naturais e artificiais retarda o crescimento e o desenvolvimento de diversos insetos-praga, atuando como uma forma efetiva de controle (BROADWAY, 1986; McMANUS, 1995; GATEHOUSE, 1999; PILON *et al.*, 2006). Desse modo, a susceptibilidade aos inibidores de proteases pode ser medida em termos de desenvolvimento, sobrevivência e atividade das enzimas digestivas do inseto.

A alimentação de dieta com inibidores de proteases pode representar custos para o desenvolvimento do inseto. O consumo de alimento pelo inseto pode implicar no prolongamento do ciclo larval que, associado à baixa atividade enzimática resultaria no consumo de grande quantidade de toxinas ou de compostos antinutricionais (RAUBENHEIMER, 1992; SLANSKY E WHEELER, 1992), como é o caso dos inibidores de proteases ou mesmo na contaminação pela ingestão de patógenos (BOOTS, 2000).

Resultados semelhantes foram observados para lagartas de *Spodoptera littura* (Lepidoptera: Noctuidae) (McMANUS e BURGESS, 1995) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (POMPERMAYER *et al.*, 2001) alimentadas em dietas acrescidas do inibidor de protease da soja do tipo Kunitz (SBTI). Essas lagartas apresentaram taxa de crescimento e peso menores que as lagartas que não ingeriram inibidor. A redução na fecundidade, atraso no desenvolvimento e o aumento da mortalidade pela ingestão de inibidor foram verificados em coleópteros da espécie *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (BOLTER e LATOSZECK- GREEN, 1997) quando alimentados em dietas contendo o inibidor de cisteíno-proteases, E-64. Por outro lado, foi relatado que a mortalidade associada à ação de inibidores de proteases é reduzida até mesmo quando altas concentrações do inibidor foram usadas (ORTEGO *et al.*, 1998). A concentração utilizada nesse trabalho pode não ter sido suficiente para demonstrar um efeito deletério dos inibidores quanto à sobrevivência, uma vez que todos os tratamentos apresentaram

a mesma taxa de mortalidade, não havendo efeito significativo no parâmetro analisado, ao contrário do que aconteceu com ganho de peso.

Estudos anteriores realizados com *A. gemmatalis* e o inibidor benzamidina, demonstraram que são necessárias altas concentrações do inibidor (> 0,50% p/p) na dieta para afetar negativamente a performance do inseto e aumentar o consumo, a digestibilidade e os perfis de atividade enzimática do intestino médio da lagarta, sugerindo que os insetos, após a ingestão de inibidores de proteases, podem apresentar respostas de defesa através da hiperprodução de proteases sensíveis à benzamidina e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor (PILON *et al.*, 2006).

Provavelmente a concentração do inibidor adicionado à dieta não tenha sido suficiente para mostrar a resposta esperada nas atividades enzimáticas. De acordo com Patarroyo-Vargas (2011) os inibidores SKTI e SBBI apresentaram valores de K_i para enzimas trispinas-like de *A. gemmatalis* menores comparados aos valores de K_i dos inibidores sintéticos benzamidina e bisbenzamidina. No caso dos inibidores proteicos 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.

Insetos polívoros têm a capacidade de responder a mudanças na qualidade nutricional da dieta e/ou agentes antimetabólicos, como os inibidores de proteases, alterando suas proteases digestivas. As mudanças podem ser quantitativas, caracterizando-se pelo aumento nos níveis de proteases intestinais para manter a digestão nos níveis ideais, ou qualitativas, que incluem a síntese de isoformas insensíveis às quais o inibidor seria incapaz de se ligar e inibir (SRINIVASAN *et al.*, 2006). *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto herbívoro generalista, mas tem o repolho como uma de suas plantas hospedeiras preferidas. Quando alimentadas em dieta proteica contendo inibidor de proteases extraído de folhas de repolho, as lagartas de *T. ni* tiveram sua digestibilidade proteica aumentada devido à síntese de outras proteases (BROADWAY, 1995). A síntese de tripsinas insensíveis à ação de IP's também é uma das estratégias empregadas por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *S. frugiperda* não teve o seu crescimento e desenvolvimento afetados pela ingestão de inibidor extraído de sementes de soja (PAULILLO *et al.*, 2000) porque

expressaram endopeptidases com baixa susceptibilidade ao inibidor, enquanto *H. virescens* produziu isoformas de tripsina ao alimentarem-se em folhas de tabaco (BRITO *et. al.*, 2001), uma de suas plantas hospedeiras caracterizada por conter altos níveis de defesas químicas. A adaptação à ingestão de IP's pela síntese de proteases insensíveis também já foi identificada em outras espécies da família Noctuidae como *Helicoverpa zea*, *T. ni*, *Agrotis ipsilon* e *H. armigera* (MAZUNDARLEIGHTON e BROADWAY, 2001; CHOUGULE *et al.*, 2005, VOLPICELLA *et al.*, 2006).

Lepidópteros também respondem à presença de inibidores pela regulação das isoformas de quimiotripsina e tripsinas no trato intestinal (TELANG *et al.* 2003; BOWN, *et. al.*, 2004). Em coleópteros, foi observada reconfiguração da expressão das enzimas digestivas quando as larvas foram alimentadas em dietas com inibidores de proteases. *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), duas pragas de grãos armazenados, seriam capazes de alterar o perfil de suas enzimas proteolíticas entre aspartil, cisteíno e serino-proteases quando alimentadas em dietas acrescidas de inibidores de cisteíno e serino-proteases, E-64 e inibidor de tripsina Kunitz da soja e inibidor de cisteíno-proteases da soja, respectivamente (OPPERT *et al.*, 2005; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003), ou mesmo reconfigurar a expressão da principal enzima digestiva (AHN *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

As lagartas de *A. gemmatalis* sofreram interferência dos inibidores de proteases SBBI, SKTI e E-64 durante seu desenvolvimento larval, aumentando seu ciclo de vida e diminuindo o peso das larvas até se transformarem em pupa. Não foi verificada influência dos inibidores na taxa de mortalidade desses insetos na concentração dos inibidores testada. Foi não observado efeito inibitório nas enzimas digestivas de *A. gemmatalis* quando se adicionou IP's à sua dieta. Provavelmente a concentração dos inibidores testados não tenha sido suficiente para mostrar o efeito deletério na sobrevivência do inseto e na inibição de suas enzimas. Outra hipótese é que a lagarta tenha se adaptado aos inibidores e os parâmetros analisados foram insuficientes para se detectar essa adaptação.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.-E., LOVINGSHIMER, M.R., SALZMAN, R.A., PRESNAIL, J.K., LU, A.L., KOIWA, H., ZHU-SALZMAN, K. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* counteracts dietary protease inhibitors by modulating propeptides of major digestive enzymes. *Insect Molecular Biology* 16(3): 295–304, 2007.

BENREY, B., DENNO, R.F. The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78(4): 987-999, 1997.

BERNAYS, E.A. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological Entomology* 22(1): 121–123, 1997.

BOLTER, C.J., LATOSZECK-GREEN, M. Effect of chronic ingestion of the cysteine protease inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83(3): 295-303, 1997.

BOOTS, M. Density-independent resource limitation and the transmission of an insect pathogen. *Oecologia* 124(2): 172–175, 2000.

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. *Analytical Biochemistry* 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.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 365-375, 2001.

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology* 41(2): 107-116, 1995.

CHOUGULE, N.P., GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 355-367, 2005.

CLANCY, K.M., PRICE, P.W. Rapid herbivores growth enhances enemy attack: sublethal plant defenses remain a paradox. *Ecology* 68(3): 736-738, 1987.

ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 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.

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.

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, A.M.R., NORTON, E., DAVISON, G.M. BABBE, S.M.; NEWELL, C.A.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects on plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Insect Physiology* 45(6): 545-558, 1999.

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

HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42: 523-528. 1978.

HEINRICH, B., COLLINS, S.L. Caterpillar leaf damage, and the game of hide-and-seek with birds. *Ecology* 64(3): 592-602, 1983.

JONGSMA, M.A., BOLTER, C. The adaptation os insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43(10): 885-895, 1997.

KOGAN, M., TURNIPSEED, S.G. Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology* 32: 507-538, 1987.

LEATHER, S.R., WALSH, P.J. Sub-lethal plant defences: the paradox remains. *Oecologia* 93(2): 153-155, 1993.

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.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S., BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31:645-657, 2001.

McMANUS, M.T., BURGESS, E.P.J. Effects of soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera littura*. *Journal of Insect Physiology* 41(9): 731-738, 1995.

MENDONÇA, E.G.; VISÔTTO, L.E.; COSTA, N.C.S.; RIBEIRO, F.R.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 446-454, 2011.

MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; VISÔTTO, L.E.; GUEDES, R.N.C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)). *Journal of Pest Science*, 85: 117-123, 2012.

MULATU, B., APPLEBAUM, S.W., COLL, M. A recently acquired host provides an oligophagous insect herbivore with enemy-free space. *Oikos* 107(2): 231-238, 2004.

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., SIMONE, S.G.DE., XAVIER, L.P., GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 140(3): 369-380, 2005.

OPPERT, B., MORGAN, T.D., HARTZER, K., KRAMER, K.J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 140 (1): 53-58, 2005.

ORTEGO, F., FARINÓS, G.P., RUIZ, M., MARCO, V., CASTAÑERA, P. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefrancisciae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88(3): 265-274, 1998.

PATTAROYO-VARGAS, A.M. Purificação parcial e caracterização cinética da inibição de proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

PAULILLO, L.C.M., 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. *Journal of Economic Entomology* 93(3): 892-896, 2000.

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.

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. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86(1): 23-29, 2006.

POMPERMAYER, P., LOPES, A.R., TERRA, W.R., PARRA, J.R.P., FALCO, M.C., SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99(1): 79–85, 2001.

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.

RAUBENHEIMER, D. Tannic acid, protein, and digestible carbohydrate: dietary imbalance and nutritional compensation in locusts. *Ecology* 73(3): 1012–1027, 1992.

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

SALVESEN, G.S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. & BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. Oxford: Oxford University Press, 2001. cap 5, p. 105-130.

SAVIO, 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.

SCHEIRS, J., DeBRUYN, L. Temporal variability of top-down forces and their role in host choice evolution of phytophagous arthropods. *Oikos* 97(1): 139-144, 2002.

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-FILHO, M.C., FALCO, M.C., Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidos pelas plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 12, 38-42, 2000.

SLANSKY, F., WHEELER, G.S. Caterpillars' compensatory feeding response to diluted nutrients leads to toxic allelochemical dose. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65(2): 171–186, 1992.

SRINIVASAN, A., GIRI, A.P., GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepdopteran serine proteases. Cellular and Molecular Biology Letters 11: 132-154, 2006.

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

TOMARELLI, R.M., CHARNEY, J., HARDING, M.L. Journal Laboratory Clinical Medical 34: 428, 1949.

TURNIPSEED, R.G., KOGAN, M. Soybean entomology. Annual Review of Entomology 21: 247-282, 1976.

VOLPICELLA, M., CORDEWENER, J., JONGSMA, M.A., GALLERANI, R., CECI, L.R., BEEKWILDER, J. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. Journal of Chromatography B 833: 26-32, 2006.

XAVIER, L.P., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R.N.C., SANTOS, A.V., SIMONE, S.G. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae). European Journal of Entomology 102(2): 147-153, 2005.

ZHU-SALZMAN, K., HOIWA, K., SALZMAN, R.A., SHADE, R.E., AHN, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine proteinase inhibitor. Insect Molecular Biology 12(2): 135-145, 2003.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CISTEÍNO-PROTEASES PARCIALMENTE PURIFICADAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis*

RESUMO

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Uma possível maneira de controlar esses insetos é o uso de bioinseticidas que possam causar prejuízos ao desenvolvimento do inseto, controlando seu número na lavoura sem afetar o meio ambiente e o homem. Como exemplo de um possível bioinseticida tem-se os inibidores de proteases, que despontam como uma ferramenta para minimizar o ataque de pragas à cultura. Porém, para que esses inibidores sejam efetivos contra insetos-praga e possam ser utilizados com essa finalidade, primeiramente é necessária a purificação e a caracterização das proteases intestinais desses insetos para conhecimento de seus mecanismos catalíticos. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar bioquímico e cineticamente cisteíno-proteases produzidas no trato intestinal da lagarta *Anticarsia gemmatalis*. O extrato enzimático foi obtido por rompimento celular de cinco intestinos de *A. gemmatalis* no 5º instar. Cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* foram parcialmente purificadas utilizando-se precipitação diferencial com 30 – 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de afinidade com coluna de aprotinina-agarose. As proteínas não ligadas à coluna, ou seja, todas as proteínas presentes no extrato bruto com exceção das serino-proteases ligadas à aprotinina-agarose, que apresentaram atividade proteolítica, foram reunidas num pool enzimático e caracterizadas utilizando o substrato sintético L-BApNA na presença do inibidor de serino-proteases benzamidina. Uma nova etapa de purificação foi testada utilizando-se uma coluna de thiol-sepharose, específica para cisteíno-proteases. Porém após essa etapa as frações proteicas obtidas não apresentavam atividade enzimática. Seguiu-se com a caracterização utilizando-se o pool enzimático obtido da aprotinina-agarose. Observaram-se picos de atividade nos valores de pH 4,0, 5,5 e 8,0, sendo o pH 8,0 o de melhor atividade. Com relação à influência da temperatura, observaram-se dois picos mais discretos de atividade a 20°C e entre 35 – 45°C, e um pico de atividade pronunciada na faixa entre 55 –

60°C. O $K_{M\text{ app}}$ obtido foi de 0,74 mM e a $V_{\text{max app}}$ foi 0,8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise do efeito de íons cálcio mostrou que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas são cálcio-dependentes e apresentaram melhor atividade em 30 mM de CaCl_2 . Nos ensaios de inibição foram testados EDTA (inibidor de metalo-proteases), Pepstatina A (inibidor de aspartil-proteases), Aprotinina e TLCK (ambos inibidores de serino-proteases). O único resultado significativo observado foi para a concentração de EDTA. Houve diminuição de atividade frente ao aumento da concentração de EDTA, comprovando a dependência de íons Ca^{2+} por essas proteases. Pepstatina A, Aprotinina e TLCK não apresentaram efeito significativo sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. A presença do inibidor de serino-proteases benzamidina e do agente redutor DTT no meio reacional, juntamente com o teste de dois inibidores de serino-proteases aprotinina e TLCK comprovam a atividade de cisteíno-proteases testadas no presente trabalho.

ABSTRACT

The soybean crop is subject, throughout its cycle, to the attack of different insect species. One possible way to control these insects is the use of biopesticides that may cause damage to the insect, controlling their numbers in the crop without affecting the environment and man. As an example of one possible bioinsecticides up the protease inhibitors, which emerge as a tool to minimize attack of pests culture. But for these inhibitors to be effective against insect pests and can be used for this purpose, it is first necessary purification and characterization of these insect intestinal proteases to knowledge of their catalytic mechanisms. The objective of this study was to purify and characterize biochemical and kinetically cysteine proteases produced in the intestinal tract of caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. The enzyme extract was obtained by five intestines cell disruption of 5th instar *A. gemmatalis*. Cysteine proteases of *Anticarsia gemmatalis* midgut were partially purified using differential precipitation with 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and affinity chromatography with aprotinin-agarose column. The proteins not bound to the column, ie all the proteins present in the crude extract with the exception of serine proteases associated with aprotinin-agarose, which showed proteolytic activity were pooled enzyme and characterized using the synthetic substrate L-BApNA in the presence the serine protease inhibitor benzamidine. A new purification step was tested using a thiol-

sepharose column, specific for cysteine proteases. But after this step the protein fractions obtained showed no enzymatic activity. The characterization was made using the enzyme obtained from the pool aprotinin-agarose. Observed peak activity at pH values 4.0, 5.5 and 8.0, being the pH 8.0 the best activity. Regarding the influence of temperature, we observed two peaks more discrete activity at 20°C and between 35-45°C, and a pronounced peak of activity between 55-60°C. The $K_{M\ app}$ obtained was 0.74 mM and $V_{max\ app}$ was 0.8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Analysis of the effect of calcium ions showed that partially purified cysteine proteases are calcium-dependent and showed a better activity in 30 mM CaCl_2 . In inhibition assays were tested EDTA (an inhibitor of metallo proteinases), pepstatin A (aspartyl protease inhibitor), aprotinin and TLCK (both serine-protease inhibitors). The only significant result was observed for the concentration of EDTA. Decreased activity against the increasing concentration of EDTA, demonstrating the Ca^{2+} dependency by these proteases. Pepstatin A, aprotinin and TLCK had no significant effect on the activity of partially purified cysteine proteases from *A. gemmatalis*. The presence of the serine protease inhibitor benzamidine and the reducing agent DTT in the reaction medium together with the two inhibitors of serine proteases TLCK and aprotinin demonstrate the activity of cysteine proteases tested in this study.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo a soja um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país (SÁVIO *et al.*, 2008; IBGE, 2010). Essa cultura está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam folhas e grãos, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE *et al.*, 2004).

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* 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. 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 (SILVA *et al.*, 2002). A fase

imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo (BATISTA *et al.*, 2005). O entendimento das enzimas digestivas desses insetos pode ser a chave para se desenvolver cultivares resistentes, pois conhecendo o mecanismo enzimático e catalítico, bem como o sítio ativo dessas enzimas, poderão ser adicionados ao genoma da planta códigos para síntese de proteínas e/ou peptídeos inibidores ou esses peptídeos sintéticos poderão ser pulverizados diretamente na cultura, combatendo essas pragas, minimizando o uso dos inseticidas tradicionais.

A maioria dos estudos de caracterização molecular e enzimática de cisteíno-proteases de insetos testa inibidores de proteases sobre enzimas digestivas (NOVILLO, *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2007; AMIRHUSIN *et al.*, 2007; WAGNER, *et al.*, 2002). Esses estudos mostram a síntese de tal classe de protease pelas larvas e pelos insetos adultos. Cisteíno-proteases (EC 3.4.22) são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico do ânion sulfeto, no sítio ativo, à ligação peptídica (KUNAKBAEVA *et al.*, 2003). O sítio ativo de uma cisteíno protease é composto por um resíduo de cisteína, por um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica.

Desta maneira, com a possibilidade do mapeamento dos centros ativos destas proteases, espera-se encontrar uma sequência de aminoácidos que, ocupando o centro ativo destas enzimas, possa causar potente inibição de sua atividade biológica, comprometendo o sistema digestivo do inseto e levando-o a morte. Uma vez conhecida, esta sequência poderá ser utilizada na produção de potentes inibidores orgânicos, peptídeos ou peptídeos miméticos para serem utilizados na defesa da planta contra pragas agrícolas ou então para produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Esse trabalho teve como objetivo a purificação parcial e a caracterização cinético-enzimática de cisteíno-proteases de *A. gemmatilis*, buscando elucidar as estruturas das proteases digestivas desse inseto e impedir prejuízos na cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação da lagarta da soja

Os insetos foram mantidos no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular a 25 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite A4.

Após obtenção das pupas, os adultos emergiram e foram alimentados com solução nutritiva composta por: mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1050 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

As posturas de *A. gemmatilis* ocorreram após três dias na superfície das folhas de papel que revestem internamente a gaiola. Estas foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500 mL) com um orifício circular na tampa de, aproximadamente, 2 cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas de *A. gemmatilis* foram alimentadas com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO *et al.*, 1985) colocando-se um cubo de dieta em cada copo plástico.

Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático

Após dissecação de 50 larvas de 5° ínstar, os intestinos foram colocados em 10 mL de solução de HCl 10^{-3} M a 4 °C, mantendo sempre a proporção de 5 intestinos para 1 mL de solução. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular dos intestinos em gral de porcelana, com auxílio de um pistilo, sobre banho de gelo. O extrato foi centrifugado em tubos plásticos de 10 mL com tampa a 23.500 g por 10 min a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005;

XAVIER *et al.*, 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel, chamado de extrato bruto, foi separado e mantido a -80°C para análises posteriores.

Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina do soro bovino (BSA) 0,2 mg/mL como padrão.

Atividade enzimática de cisteíno-protease

A atividade amidásica de cisteíno-proteases foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961) com modificações (MENDONÇA *et al.*, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2012), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA). Foram adicionados 250 µL da solução de L-BApNA 2,4 mM, 250 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo DTT 5 mM – para garantir que os grupos tiol dos resíduos de cisteína do sítio ativo da enzima estejam reduzidos, 50 µL do inibidor de serino-protease benzamidina 12 mM – para assegurar que a atividade enzimática avaliada seja referente apenas a cisteíno-proteases e, ao final, 50 µL do extrato enzimático. Após 15 minutos a 25°C a reação foi paralisada pela adição de 50 µL de ácido acético 60% e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Precipitação diferencial com sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄]

Foram precipitados 5 mL do extrato bruto com 30% de sulfato de amônio. A quantidade de sal necessária para atingir o referido grau de saturação foi adicionada ao extrato enzimático, que ficou sob agitação por 60 minutos a 4°C. A mistura foi centrifugada a 12000 *g* por 30 minutos a 4°C. A fração solúvel foi submetida novamente à precipitação com 60% de sulfato de amônio, nas mesmas condições citadas. O *pellet* foi então ressuscendido em 1,0 mL de tampão Tris-HCl 10⁻³ M pH 7,5 e dialisado *overnight* em 200 mL do mesmo tampão a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 20000 *g* por 60 minutos a 4 °C, para remoção de impurezas. Após cada etapa da precipitação diferencial, a atividade enzimática foi avaliada como descrito anteriormente.

Cromatografia de afinidade em coluna de Aprotinina-agarose

Alíquota de 1,0 mL do dialisado foi aplicada na coluna de afinidade (serino-proteases) aprotinina-agarose (Sigma-Aldrich Química Brasil - 1,0 x 6,5 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e 5 mM CaCl₂, sob o fluxo de 1mL/min e frações de 1,0 mL foram coletadas. A eluição foi feita com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e 1,5 M NaCl. O material proteico de cada fração foi localizado pela leitura de absorvância a 280 nm. A atividade enzimática das frações coletadas foi verificada de acordo com o protocolo para determinação de cisteíno-proteases e as frações que apresentaram atividade foram armazenadas. Posteriormente, as frações com atividade foram reunidas para realização dos ensaios de caracterização enzimática.

Cromatografia de afinidade em coluna de Thiol-sepharose

Após a cromatografia de afinidade em coluna de Aprotinina-agarose, os tubos com atividade proteolítica contendo as proteínas que não ficaram retidas na matriz foram reunidos e concentrados com Ultrafiltradores do tipo Amicon® com membrana de 3kDa. Foi aplicado 1 mL do concentrado na coluna de afinidade Thiol-sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5, NaCl 0,5M e EDTA 1mM sob o fluxo de 1ml/min. A eluição foi feita com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo 25mM de Ditioneitol (DTT). O material proteico foi localizado pela leitura de absorvância a 280 nm e a atividade enzimática das frações coletadas de acordo com o protocolo para determinação de cisteíno-proteases.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente em um gel de poliacrilamida a 12% sob condições desnaturantes de acordo com Laemmli (1970). Após cada etapa de purificação as amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl (80 mM, pH 6,8, 2% de SDS, 12% de glicerol, 5% de β-mercaptoetanol e 0,05% de azul de bromofenol). A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados em 100 mL de solução, contendo metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume, por no mínimo 2 h, seguido de 3

lavagens de 10 min cada, com solução de etanol 50 %. A seguir, os géis foram lavados por 1 min, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Posteriormente, os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados por 15 min em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v). Após serem lavados por 3 vezes de 20 segundos com água destilada, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

Efeito de pH e temperatura

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado utilizando-se tampões Macllvaine na faixa de 3,0 a 7,5 e tampões Tris-HCl na faixa de 8,0 a 10,0, com variação de 0,5. Todas as soluções tampão continham DTT na concentração 5 mM.

A atividade do extrato enzimático parcialmente purificado foi determinada misturando-se 50 µL do extrato enzimático, 250 µL da solução de L-BApNA 2,4 mM, 50 µL de benzamidina 12 mM e 250 µL de tampão correspondente ao pH desejado. Após 15 minutos de ensaio a reação foi paralisada pela adição de 50 µL de ácido acético 60% e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410 nm. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

Para a avaliação do efeito da temperatura na atividade, foi utilizado banho-maria na faixa de 10 a 65°C. O efeito da temperatura foi realizado misturando-se 250 µL da solução de L-BApNA 2,4 mM, 50µL de benzamidina 12 mM e 250 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 5 mM DTT. Após 5 minutos de incubação da mistura na temperatura desejada, foi adicionado 50 µL do extrato enzimático parcialmente purificado e após 15 minutos a reação foi paralisada com 50 µL de ácido acético 60% e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410 nm. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} foi realizada na temperatura de melhor atividade em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo DTT 5

mM, com o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,02 a 2,0 mM. Inibidor de serino-proteases benzamidina foi acrescentado na concentração final de 1 mM. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente.

As velocidades iniciais foram determinadas a 410 nm para L-BApNA, em função do tempo (15 minutos) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os experimentos foram realizados três repetições e em duplicata.

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear, empregando-se o programa SigmaPlot.

Efeito da concentração de íons cálcio

Diferentes concentrações de íons cálcio foram analisadas na atividade da cisteíno-protease utilizando-se o substrato L-BApNA em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 com concentrações de CaCl_2 variando de 5 a 30 mM. Para cada ensaio foram misturados 250 μL de L-BApNA 2,4 mM, 50 μL da solução de benzamidina 12 mM, 50 μL de extrato enzimático e 250 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo a concentração de cálcio necessária para atingir a concentração desejada. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

Efeito de modificadores químicos

Na avaliação do efeito de modificadores químicos na atividade enzimática foram utilizados 250 μL da solução de L-BApNA 2,4 mM como substrato, 50 μL de benzamidina 12 mM, 50 μL do extrato enzimático e 250 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo DTT 5 mM e CaCl_2 30 mM adicionado de: EDTA (25 – 100 mM) – inibidor de metalo-proteases e proteases ativadas por metais por ser quelante de Ca^{2+} e outros metais divalentes, pepstatina A (1,0 – 2,0 μM) – inibidor de aspartil-protease, aprotinina (1,0 – 2,0 μM) – inibidor competitivo de serino-proteases, e, TLCK (0,005 - 1mM) – inibidor irreversível de serino-protease tripsina-*like*.

As amostras passaram por um período de pré-incubação de 5 minutos com cada inibidor, posteriormente foi adicionado o substrato L-BApNA e a atividade enzimática foi analisada como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

RESULTADOS

Purificação parcial de cisteíno-proteases de *Anticarsia gemmatalis*

O perfil cromatográfico em coluna de Aprotinina-agarose está representado na Figura 1. Observam-se dois picos de proteína e dois picos de atividade enzimática.

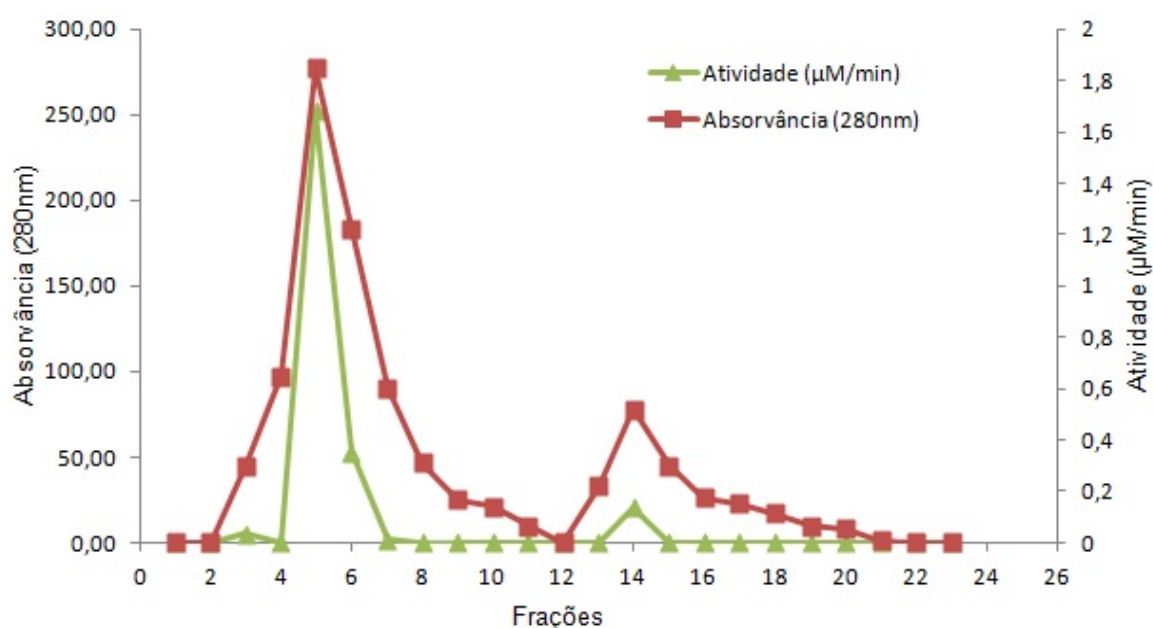


Figura 1. Perfil cromatográfico do dialisado obtido a partir da precipitação diferencial em coluna de afinidade Aprotinina-agarose.

O primeiro pico proteico refere-se às proteínas que não se ligaram à matriz da coluna, uma vez que esta coluna apresenta afinidade por serino-proteases. Dentre elas estão as cisteíno-proteases de interesse nesse trabalho. O segundo pico proteico representa as serino-proteases que foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e NaCl 1,5 M. Os dois picos de atividade se justificam pelo fato de o substrato sintético utilizado no presente trabalho, L-BApNA, ser substrato tanto para cisteíno, quanto para serino-proteases. A diferença nos picos de atividade deve-se à utilização do inibidor de serino-proteases, benzamidina, na mistura de reação de todos os ensaios enzimáticos realizados no trabalho. As frações que apresentaram atividade de cisteíno-proteases foram reunidas formando um pool enzimático.

Os dados de cada etapa da purificação são apresentados na Tabela 1. O fator de purificação final foi de 0,8, com rendimento de 2,6% e atividade específica de 6,22 mM/min/mg de proteína.

Tabela 1. Tabela de Purificação de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*.

| Fração | Proteína Total (mg) | Atividade Total (mM/min) | Atividade Específica (mM/min/mg) | Fator de Purificação | Rendimento (%) |
|---|---------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|
| Extrato Bruto | 28,55 | 214,43 | 7,51 | 1 | 100 |
| Precipitação (NH₄)₂SO₄ 30-60% | 2,00 | 8,48 | 4,25 | 0,6 | 4,0 |
| Aprotinina-agarose | 0,88 | 5,48 | 6,22 | 0,8 | 2,6 |

As frações referentes ao extrato bruto, precipitado com 30-60% de saturação (NH₄)₂SO₄, o pool proteico obtido do volume não ligado na cromatografia de afinidade usando coluna aprotinina-agarose e o primeiro pico proteico após eluição da coluna de afinidade Thiol-sepharose estão representados no gel de poliacrilamida na concentração de 12% mostrado na Figura 2.

A primeira canaleta representa o perfil migratório do marcador com seus valores de pesos moleculares conhecidos, listados em KDa, as outras canaletas representam, respectivamente, o extrato bruto, o dialisado obtido a partir da precipitação diferencial com 30 – 60% de (NH₄)₂SO₄ e o pool proteico obtido a partir do volume não ligado da coluna de aprotinina-agarose. Foram aplicados 15 µL de extrato bruto e 20 µL do da fração precipitada e do pool protéico. A quinta canaleta representa as proteínas eluídas da thiol-sepharose, as quais não apresentaram atividade enzimática. Provavelmente essas enzimas perderam a atividade devido à elevada concentração do agente redutor ditioneitol (DTT), o qual pode ter causado uma desnaturação das enzimas a ponto de não restar nenhuma atividade remanescente das cisteíno-proteases. Foram feitas tentativas para tentar reverter

essa perda de atividade, como a diminuição da concentração de DTT na eluição, a mudança do agente redutor para 2-mercaptoetanol, mas ambos falharam.

Após a cromatografia tiol-sepharose, o perfil proteico foi analisado e visto que existia apenas um pico após eluição. As frações referentes a esse pico foram reunidas e aplicadas no gel de poliacrilamida 12%. Esse pico revelou 5 bandas, as quais provavelmente são enzimas e/ou proteínas com grupos tiol que se ligaram à matriz. Dentre essas cinco bandas, acredita-se que pelo menos uma delas seja de uma cisteíno protease de *A. gemmatalis*. Essas bandas foram retiradas do gel e levadas para espectrometria de massa. Porém a qualidade dos picos não permitiu a devida identificação das proteínas.

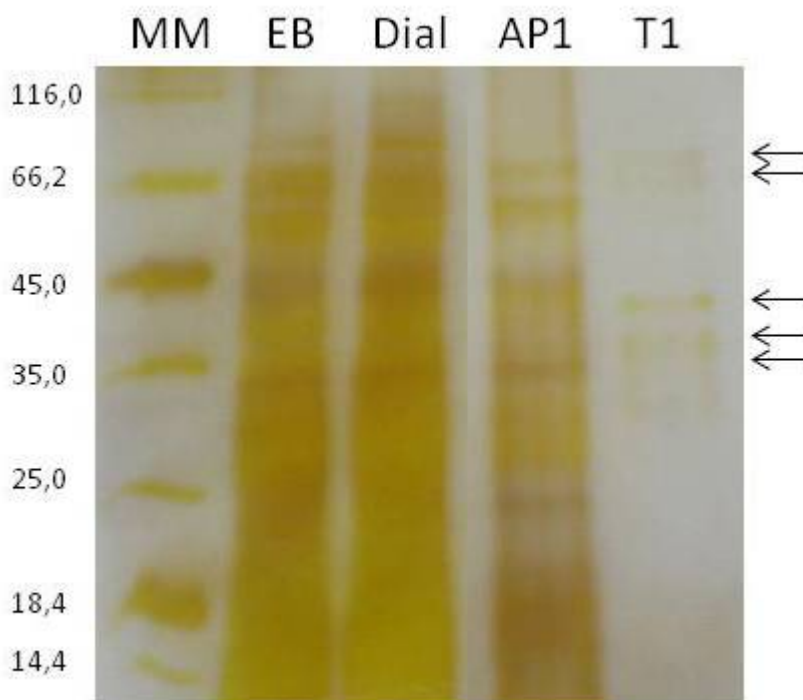


Figura 2. Purificação de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis* em SDS-PAGE 12%. As cinco setas marcam as bandas que, supostamente, podem representar as cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*. MM: marcador molecular; EB: extrato bruto; Dial: dialisado; AP1: pico 1 após aprotinina agarose (proteínas não ligadas à membrana); T1: pico 1 após tiol-sepharose (proteínas coletadas após eluição).

Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade enzimática está representado na Figura 3.

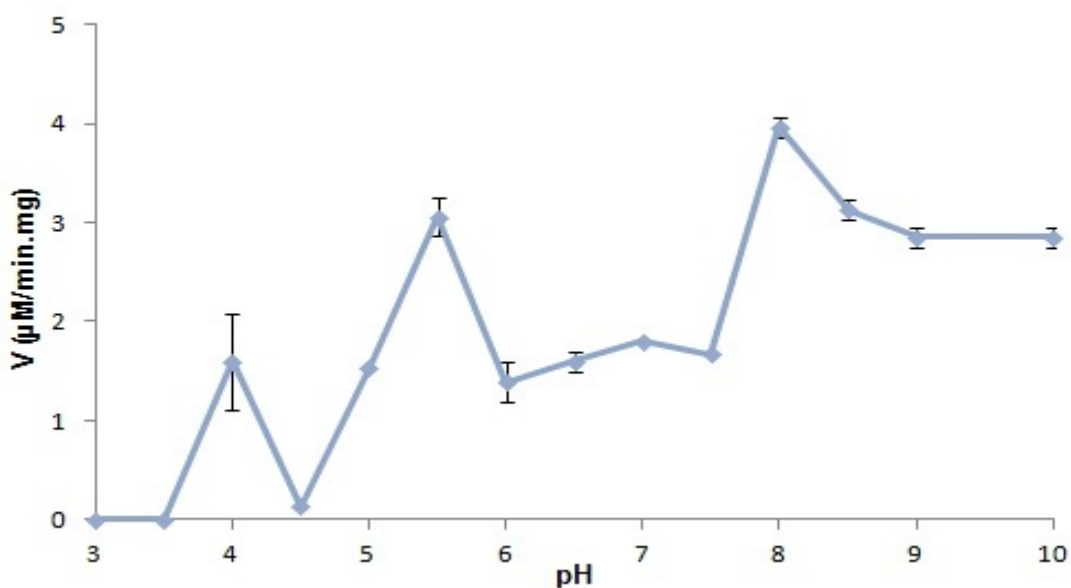


Figura 3. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*. Cada ponto é a média de 3 repetições. Barra representa o erro padrão.

O perfil de atividade do pool enzimático apresenta quatro picos de atividade nos valores de pH 4,0, 5,5, 7,0 e 8,0. Os resultados sugerem a presença de diferentes formas de enzimas no pool enzimático. O valor de pH em que se observou melhor atividade enzimática foi pH 8,0. Desta maneira, todas as análises posteriores foram realizadas em pH 8,0.

Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas está representado na Figura 4. A partir do perfil de atividade em função da temperatura observa-se que o melhor valor de atividade foi na faixa de 55 a 60°C. Observam-se também um incremento da atividade na faixa de 35 – 45°C, sugerindo novamente a presença de mais uma forma de enzima no pool enzimático. Pode-se observar quatro picos de atividades nas temperaturas de 20, 40, 55 e 60°C. Os 4 picos de pH e temperatura confirmam a purificação parcial com pelo menos 4 formas de cisteíno-proteases presentes.

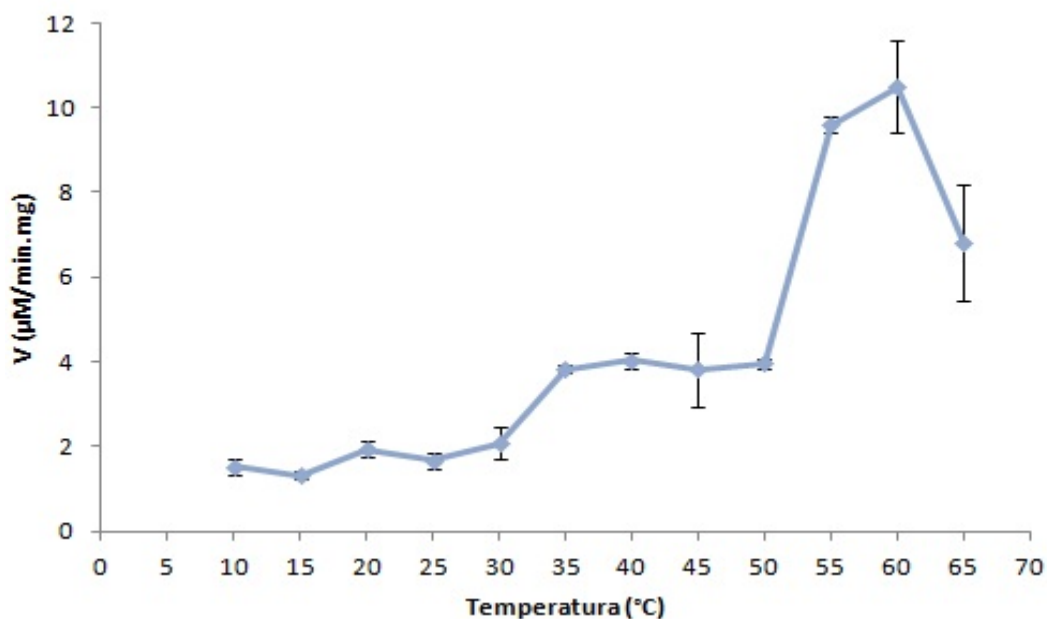


Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*. Cada ponto é a média de 3 repetições. Barra representa o erro padrão.

O pico de melhor atividade observado foi em 60°C. Contudo, como as repetições apresentaram elevado valor de desvio padrão e os valores de atividade nas temperaturas de 55 e 60°C foram praticamente os mesmos, optou-se por utilizar a temperatura de 55°C nas análises posteriores.

Determinação dos parâmetros cinéticos

O gráfico de Michaelis-Menten para as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA está representado na Figura 5. Observa-se também a inserção do gráfico de Lineweaver-Burk. Os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando-se concentrações de L-BApNA variando de 0,02 a 2,0 mM. As cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* apresentaram gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, demonstrando que essas cisteíno-proteases seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato utilizada.

Como se trata de uma purificação parcial, os parâmetros cinéticos obtidos são valores aparentes. O valor de $K_{m\ app}$ das cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* foi de 0,74 mM.

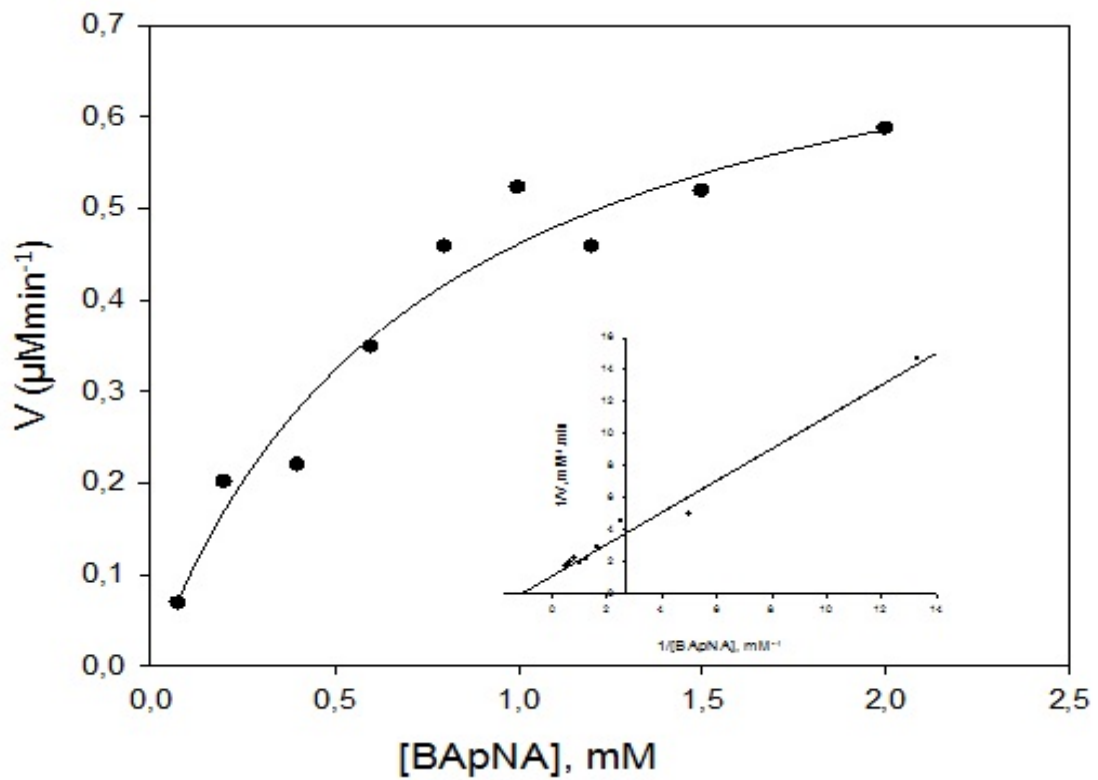


Figura 5. Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade enzimática sobre L-BAPNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para obtenção dos valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

Tabela 2 - Equações e respectivos coeficientes de determinação ajustados para a equação de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* mostradas na Figura 5.

| Equação | Equação ajustada | F | Graus de liberdade | P | Coeficiente de determinação |
|---|---|----------|--------------------|---------|-----------------------------|
| Michaelis-Menten $f = B_{max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x))$ | $f = 0,8047 \cdot (x) / (0,7438 + (x))$ | 137,20 | 1 | <0,0001 | 0,95 |
| Lineweaver-Burk $f = y_0 + a \cdot x$ | $f = 1,1566 + 0,9932x$ | 35232,69 | 1 | <0,0001 | 0,98 |

A Tabela 3 apresenta as propriedades bioquímico-cinéticas importantes da atividade das cisteíno-proteases parcialmente purificadas avaliadas no presente trabalho.

Tabela 3 - Propriedades bioquímico-cinéticas de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*.

| Substrato | pH de Melhor Atividade | Temperatura de melhor atividade (°C) | $K_{M\ app}$ | $V_{max\ app}$ |
|-----------|------------------------|--------------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| L-BApNA | 8,0 | 55 – 60 | 0,74 mM | 0,8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ |

Efeito da concentração de íons cálcio

O efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno-proteases está representado na Figura 6. A atividade das cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* foi maior na concentração de 30 mM de íons cálcio.

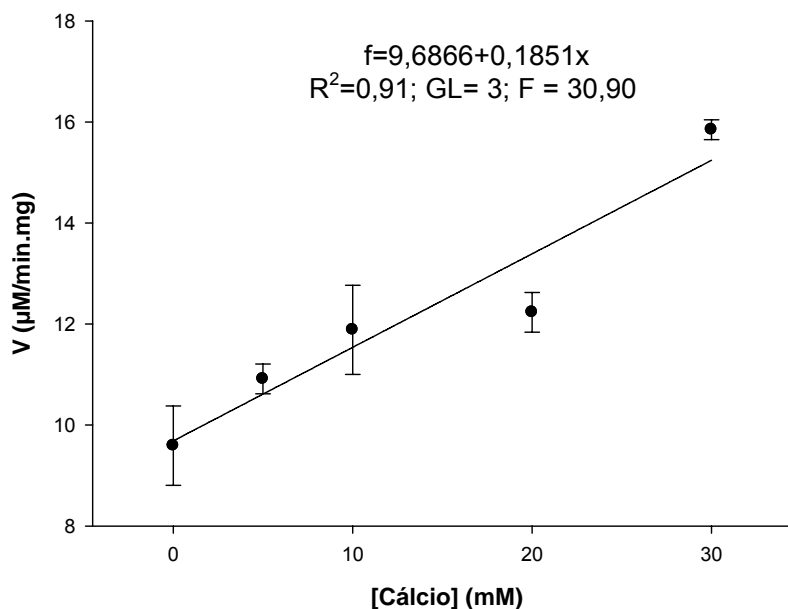


Figura 6. Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Efeito de EDTA

A Figura 7 representa o efeito da concentração de EDTA sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. Verifica-se um decréscimo nos valores de atividade com adição de EDTA no meio reacional. O EDTA é um inibidor de metalo-proteases e quelante de íons metálicos, tais como cálcio. Desta maneira, quando está presente no meio reacional, o EDTA forma complexos muito estáveis com os íons metálicos, retirando-os do meio.

Após a análise do efeito de Ca^{2+} e de EDTA sobre a atividade comprovar a hipótese de que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes, todos os ensaios de atividade posteriores foram realizados na presença de 30 mM de CaCl_2 .

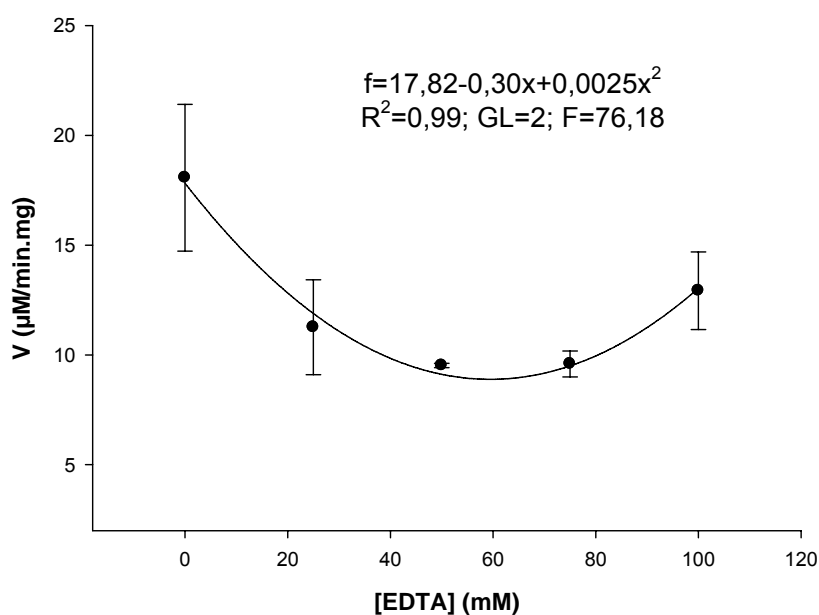


Figura 7. Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Efeito de Pepstatina A

A análise do efeito da concentração de pepstatina A, inibidor de aspartil-protease, sobre a atividade de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis* está representada na Figura 8. Verificou-se que não houve efeito significativo ($p>0,01$) sobre cisteíno-proteases de *A. gemmatalis* em todas as concentrações de pepstatina A.

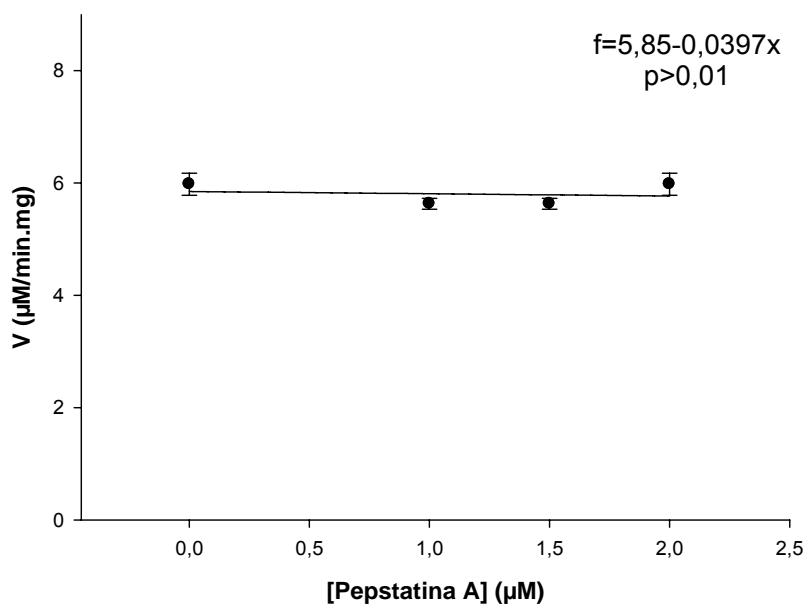


Figura 8. Efeito da concentração de Pepstatina A sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Efeito de Aprotinina

O inibidor competitivo de serino-proteases de origem animal Aprotinina não influenciou significativamente ($p>0,01$) a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. O efeito da concentração de aprotinina sobre a atividade de cisteíno-protease é mostrado na Figura 9.

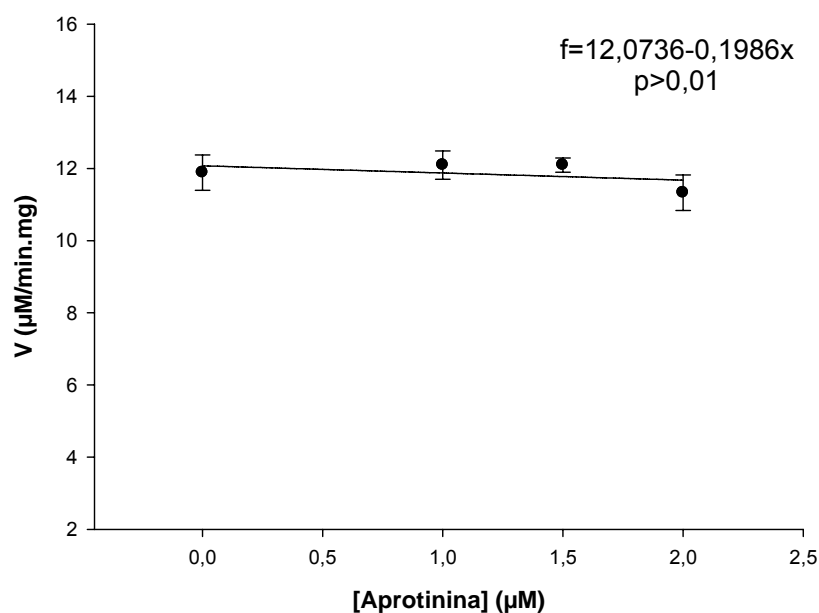


Figura 9. Efeito da concentração de Aprotinina sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Efeito de TLCK

Outro inibidor de serino-proteases teve seu efeito testado sobre a atividade de cisteíno-proteases. O efeito da concentração de TLCK, um inibidor irreversível de tripsina-like, sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* está representado na Figura 10. Verificou-se que, assim como a aprotinina, TLCK não influenciou significativamente ($p > 0,01$) a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. Mais uma vez estes dados revelam que a enzima parcialmente purificada deve estar isenta da presença de tripsinas-like evidenciando ser uma cisteíno-protease papaína-like.

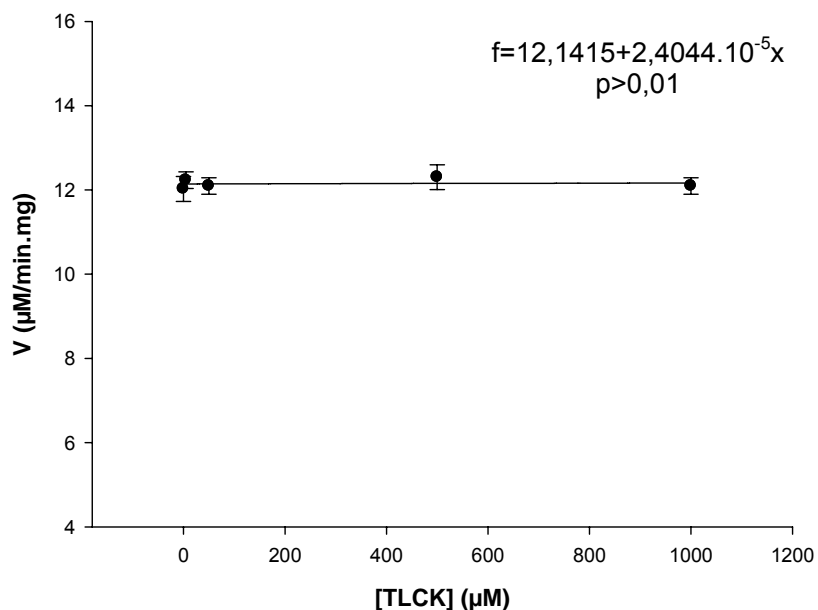


Figura 10. Efeito da concentração de TLCK sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

DISCUSSÃO

A análise dos dados da tabela de purificação mostra que a purificação foi parcial. O fator de purificação menor do que 1 significa diminuição da atividade específica. Observa-se perda considerável de proteínas na etapa de precipitação. Entretanto, como houve redução pronunciada da atividade total do extrato bruto para a etapa de precipitação, pode-se considerar que grande parte das cisteíno-proteases foi perdida com a etapa de precipitação.

A etapa de purificação utilizando coluna de afinidade aprotinina-agarose foi bem sucedida em relação à etapa anterior, resultando num aumento da atividade específica da enzima e, conseqüentemente, num maior fator de purificação.

Uma vez que o volume aplicado da fração do precipitado e do pool foi o mesmo, é possível que se compare qualitativamente o perfil proteico das duas frações. O perfil de bandas do pool proteico obtido da cromatografia de afinidade mostra uma menor concentração de proteínas, já que não mais se observa o arraste no final da canaleta e há uma melhor resolução das bandas. As duas bandas bem resolvidas que aparecem entre 25 e 45 kDa podem, supostamente, representar as cisteíno-proteases de *A. gemmatalis*. Terra e Ferreira, (1994) relataram que cisteíno-proteases comuns no intestino médio de insetos possuem, normalmente, peso

molecular de 25 – 45 kDa, estando de acordo com a hipótese mencionada anteriormente.

Fahmy *et al.* (2004) analisando cisteíno-protease de trigo (*Triticum aestivum*) encontraram valores de melhor atividade na faixa de pH 3,5 a 4,5. O primeiro pico de atividade em pH 4,0 (Figura 3) está dentro da faixa do referido resultado. Já o segundo pico, em pH 5,5, está de acordo com Mohamed *et al.* (2005), que em estudos com *Fasciola gigantica* encontraram um pico de atividade em pH 5,5. Aranishi *et al.* (1997), estudando Catepsina B purificadas de carpas *Cyprinus carpio*, encontraram melhor atividade na faixa de pH de 5,5 a 6,5, sendo a máxima atividade em pH 6,0.

O pico de melhor atividade foi em pH 8,0. O valor encontrado está próximo ao pH alcalino fisiológico de lepidópteros, cujo pH do intestino médio é em torno de 10 a 10,5. Pereira *et al.* (2001) obtiveram o melhor valor de atividade em pH 8,0 para uma cisteíno-protease purificada de *Carica candamarcensis* L.

Visessanguan *et al.* (2003) encontraram para catepsina L purificada dos músculos de linguado o melhor valor de atividade na temperatura de 60°C. Valasaki *et al.* (2007) em estudos com cisteíno-proteases extracelulares purificadas de *Lactobacillus helveticus* encontraram temperatura de melhor atividade em 60°C utilizando como substratos Cbz-FR-pNA e Suc-FR-pNA, ou seja, foram utilizados substratos sintéticos *p*-nitroanilidas, semelhantes ao L-BApNA utilizado no presente trabalho. Portanto, cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* apresentaram temperatura de melhor atividade semelhante às obtidas em outros estudos com enzimas purificadas.

Valasaki *et al.* (2008) purificaram duas cisteíno-proteases de *Lactobacillus helveticus*, a cisteíno-protease cálcio dependente Hmm-protease-Lh apresentou K_M de 0,72 mM sobre o substrato Suc-FR-pNA. Mohamed *et al.* (2005) encontraram um K_M de 0,6 mM para cisteíno-proteases do parasita *Fasciola gigantica* sobre o substrato L-BApNA. Pilon (2008) caracterizando cisteíno-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* obteve valores de $K_{M\ app}$ para cisteíno-proteases de *Enterococcus galinarum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* de 0,70 mM, 0,67 mM, 0,63 mM e 0,67 mM, respectivamente.

Parâmetros cinéticos com a mesma ordem de grandeza, sob o ponto de vista cinético, são iguais (BORGES et. al., 2006). Portanto, considerando todos os estudos citados e o fato de que os valores de K_M referidos apresentam a mesma ordem de grandeza, tem-se que o valor de $K_{M\text{ app}}$ encontrado no presente trabalho, 0,74 mM, está dentro da faixa dos valores de K_M obtidos em outros trabalhos com cisteíno-proteases, utilizando substratos *p*-nitroanilidas.

Os resultados de efeito de íons cálcio sugerem que essas enzimas devem possuir um sítio de ligação para tais íons. A ligação desses íons no referido sítio, provavelmente, estabiliza e melhora a conformação do centro ativo da enzima, justificando o aumento da atividade enzimática na presença de tais íons. A interação de íons cálcio com os sítios da enzima também tem função de proteção contra autólise. A ligação de íons cálcio aos resíduos de aminoácido da tripsina produz uma mudança conformacional e em temperaturas mais baixas, esse complexo torna a conformação mais rígida, impedindo que ocorra autólise (SIPOS e MERKEL, 1970 e VAJDA e GARAI, 1981).

Analisando a Figura 6, nota-se a ativação enzimática com o aumento da concentração de íons cálcio. Portanto, pode-se concluir que possivelmente as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes. O resultado obtido no presente trabalho está de acordo com os resultados citados em outros trabalhos. D'Avila-Levy *et al.* (2003) purificaram uma cisteíno-protease cálcio-dependente do tripanosoma *Crithidia deanei*. Valasaki *et al.* (2007) também caracterizaram uma cisteíno-protease cálcio-dependente de *Lactobacillus helveticus*. Raphael *et al.* (2000) observaram efeito ativador de íons cálcio em cisteíno-proteases de *Plasmodium falciparum*.

A diminuição dos valores de atividade na presença de EDTA comprova a hipótese de que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes. Uma vez presente, o EDTA forma complexos estáveis com os íons cálcio que deixarão de interagir com a enzima nos sítios específicos para esses íons. Assim, a enzima perde a estabilidade adicional da ligação com o íon cálcio e, conseqüentemente, a conformação e o melhor posicionamento do seu centro ativo são prejudicados, levando a um decréscimo de 47,3% no valor da atividade.

O presente resultado está de acordo com D'Avila-Levi *et al.* (2003), que obtiveram redução de 30% de atividade de uma cisteíno-protease cálcio-dependente do tripanossomo *Crithidia deanei* com a utilização de EDTA.

Segundo Fahmy *et al.* (2004) pepstatina A não influenciou a atividade de cisteíno-protease de trigo. Também não foi influenciada por pepstatina A a atividade de cisteíno-proteases purificadas de ovos da lagarta do algodoeiro (*Helicoverpa armigera*) (ZHAO *et al.*, 1998). Assim, estes resultados confirmam que a enzima parcialmente purificada não pertence à família de aspartil-protease.

De forma análoga, D'Avila-Levy *et al.* (2003) mostraram que cisteíno-proteases cálcio-dependentes do tripanossomo *Crithidia deanei* também não foram influenciadas pelo inibidor de serino-proteases Aprotinina. Isto mostra que a enzima purificada tem pouca contaminação de enzimas tripsina-like e que se trata de proteases papaína-like.

CONCLUSÃO

No presente trabalho realizou-se a purificação parcial e a caracterização bioquímico-cinética de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. O pH no qual se detectou melhor atividade, frente ao substrato L-BApNA, foi 8,0. Dois outros picos em pH 4,0 e 5,5 foram verificados no perfil de pH x atividade. A temperatura de melhor atividade, frente ao substrato L-BApNA, foi na faixa de 55 – 60°C. Dois outros picos de menor atividade foram observados em 20°C e na faixa entre 35 – 45°C. Os valores dos parâmetros cinéticos, $K_{M\ app}$ e $V_{max\ app}$, utilizando o substrato L-BApNA, foram de 0,74 mM e 0,8 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Os íons cálcio ativaram as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* podendo ser consideradas cisteíno-proteases cálcio-dependentes. A concentração de íons cálcio na qual se observou melhor atividade foi de 30 mM. O efeito da concentração de EDTA reforçou a hipótese que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes, visto que nas concentrações de EDTA utilizadas os valores de atividade foram significativamente ($p < 0,01$) menores que na ausência de EDTA. O efeito do inibidor de aspartil-proteases, Pepstatina A não afetou significativamente ($p > 0,01$) a atividade das cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. A aprotinina, inibidor competitivo de serino-proteases, não influenciou

significativamente ($p > 0,01$) a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. Da mesma forma, o efeito da concentração de outro inibidor de serino-proteases, o inibidor irreversível TLCK, também não se mostrou significativo ($p > 0,01$) frente à atividade das referidas cisteíno-proteases. A análise do efeito de modificadores químicos mostrou que as proteases parcialmente purificadas do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, não pertencem à classe das metalo, nem das aspartil e nem das serino-proteases. Portanto, as enzimas proteolíticas parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* possivelmente são da classe das cisteíno-proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRHUSIN, B.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MURDOCK, L. L.; ZHU-SALZAMAN, K. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*. 53:734–740. 2007.

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.

ARANISHI, F.; HARA, K.; KIYOSHI OSATOMI, K.; ISHIHARA, T. Purification and Characterization of Cathepsin B from Hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpi*. *Comparative Biochemistry Physiology* 117B:579-587, 1997.

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.

BORGER, S.; LIEBERMEISTER, W.; KLIPP, E. Prediction of Enzyme Kinetic Parameters Based on Statistical Learning. *Genome Informatics*, 17: 80–87, 2006.

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

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.

D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 420: 1-8, 2003.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. of Biochem. and Bioph. v. 95, p. 271-278, 1961.

FAHMY, A.S.; ALI, A.A.; MOHAMED, S.A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). Bioresource Technology, 91:297-304. 2004

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912c_omentarios.pdf. Acessado em 03 de novembro de 2010.

KUNAKBAEVA, Z., CARRASCO, R., ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. Journal of Molecular Structure 626, 209–216. 2003.

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

MENDONÇA, E.G.; VISÔTTO, L.E.; COSTA, N.C.S.; RIBEIRO, F.R.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). Ciência e Agrotecnologia (UFLA), 35: 446-454, 2011.

MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; VISÔTTO, L.E.; GUEDES, R.N.C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)). Journal of Pest Science, 85: 117-123, 2012.

MOHAMED, S.A.; FAHMY, A.S.; MOHAMED, T.M.; HAMDY, S.M. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 142:192-200, 2005.

NOVILLO, C., CASTAÑERA, P., ORTEGO, F. Inhibition of Digestive Trypsin-Like Proteases from Larvae of Several Lepidopteran Species by the Diagnostic Cysteine Protease Inhibitor E-64. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27:247-254, 1997.

OLIVEIRA, A.S., MIGLIOLO, L., AQUINO, R.O., RIBEIRO, J.K., MACEDO, L.L., ANDRADE, L.B., BEMQUERER, M.P., SANTOS, E.A., KIYOTA S., SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. Plant Physiology and Biochemistry, v.45, p.858–865. 2007.

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 gematallis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140(B): 369-380, 2005

PEREIRA, M.T.; LOPES, M.T.P.; MEIRA, W.O.; SALAS, C.E. Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Clonig of a Genomic Putative Fragment Coding for this Enzyme. *Protein Expression and Purification* 22:249-257, 2001.

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. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 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*. Viçosa, MG: UFV. 115p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

RAPHAEL, P.; TAKAKUWA, Y.B.; MANNO, S.; LIU, S.; CHISHTI, A.H.; HANSPAL, M.. A cysteine protease activity from *Plasmodium falciparum* cleaves human erythrocyte ankyrin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110: 259-272, 2000.

SAVIO, 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.

SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BATISTA,R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L.P.; PIOVESSAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSE, I.C.; MOREIRA, M. A. . Função Fisiológica de Lipoxigenases de Folhas de Soja submetidas ao ataque de Lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 69: 67-74, 2002.

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

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. n.109b, p. 1-62, 1994.

VAJDA, T.; GARAI, A. Comparison of effect of calcium (II) and manganese (II) ions on trypsin autolysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 15: 307-315, 1981.

VALASSAKI, K.; STAIKOU, A.; THEODOROU, L.G.; CHARAMPOULOU, V.; ZACHARAKI, P.; PAPAMICHAEL, E.M. Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. *Bioresource Technology*, 2007.

VISESSANGUAN,W.; BENJAKUL,S.; AN, H. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134:477-487, 2003.

WAGNER, W.; MÖRLEN, F.; SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 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). *Europe J. Biocem.*, 102: 147-153, 2005.

ZHAO, X.; WANG, J.; WANG, Y. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28:259–264.1998.