

Luciana Pereira Xavier

**Caracterização Bioquímica de Proteases do Intestino de
Anticarsia gemmatalis Envolvidas no Mecanismo de
Interação Planta-Inseto**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

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

T

X3c
2002

Xavier, Luciana Pereira, 1975-

Caracterização bioquímica de proteases do intestino de
Anticarsia gemmatalis envolvidas no mecanismo de
interação planta-inseto / Luciana Pereira Xavier. – Viçosa :
UFV, 2002.

83p. : il.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. *Anticarsia gemmatalis* - Serina proteinases - Caracte-
rização. 2. Interação inseto-planta. 3. Soja - Resistência a
Anticarsia gemmatalis. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 19.ed. 595.781041925

CDD 20.ed. 595.781041925

Luciana Pereira Xavier

Caracterização Bioquímica de Proteases do Intestino de *Anticarsia gemmatalis* Envolvidas no Mecanismo de Interação Planta-Inseto

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

Aprovada: 06 de agosto de 2002.

Prof. José Cola Zanuncio
(Conselheiro)

Prof. Salvatore Giovanni De Simone

Prof. José Eduardo Serrão

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Profª. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

A Deus, pela presença constante.

A João Eudócio, avô querido.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Sou grata,

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), onde se realizou o trabalho de tese.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de Bolsa de Estudo.

A professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, amizade, paciência e confiança transmitida em todos os momentos.

Ao Departamento de Biologia Animal, ao Prof. José Cola Zanúncio, pelo espaço cedido e equipamentos disponibilizados para a viabilização do trabalho na criação e manutenção dos insetos e ao apoio que recebi, em todos os momentos pelos companheiros, do Laboratório de Controle Biológico de Insetos.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pela amizade, apoio nos experimentos e paciência com os meus questionamentos.

Ao Prof. Salvatore Giovanni De Simone, chefe do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da FIOCRUZ/RJ, pelos reagentes cedidos e apoio técnico-científico na realização deste trabalho.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, meu primeiro mestre de Bioquímica, que me ensinou a amar e respeitar esta ciência.

A Agenor Valadares, pelo incentivo, amor e carinho, paciência e auxílio na realização dos trabalhos durante todo o período de elaboração da dissertação.

Aos colegas de Laboratório: Maria Helena, Christiano Pires, Giordani de Oliveira, Gal, Luciana Resende, Márcio e Isabella, pelo incentivo e amizade.

Ao secretário de Pós – graduação Eduardo Pereira Monteiro pelo apoio e amizade sincera.

Aos funcionários José Fausto e Gláucia, pela agradável convivência.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola e da Entomologia pelo incentivo e companheirismo, em especial Dirce e Solange.

Aos meus amigos Waldney, Izaltina, William, Márcio Arndt e Jamil Silvano que sofreram comigo e incentivaram nas horas mais difíceis da minha vida e que mesmo de longe me apoiaram e apóiam este trabalho.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Luciana Pereira Xavier, filha de Marcos Xavier e Rosaura Lúcia Pereira Xavier, nasceu em 21 de abril de 1975, na cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais. Em 10 de setembro de 1999, graduou-se no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Bioquímica e Imunologia, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Em 18 de janeiro de 2001 graduou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Em Março de 2001, iniciou o curso de mestrado em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se a defesa da dissertação em 06 de agosto de 2002.

CONTEÚDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE QUADROS.....	ix
ABREVIACÕES UTILIZADAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Interação inseto-Planta.....	4
2.1.1. Inibidores de proteases.....	8
2.1.2. Inibidores de serino-proteases.....	9
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).....	10
2.3. Enzimas digestivas de Insetos.....	14
2.3.1. Serino-proteases.....	17
2.3.1.1. Tripsinas de Insetos.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.1.1. Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Criação da lagarta da soja.....	23
4.1.1. Preparo da dieta artificial.....	24
4.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio de larvas de <i>A. gemmatalis</i>..	24
4.3. Determinação da concentração de proteína.....	25
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	25
4.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina (substrato SDS-PAGE).....	25
4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	26
4.5.1. Atividade proteásica.....	26
4.5.2. Atividade amidásica.....	26

4.5.3. Atividade esterásica.....	27
4.5.4. Efeito de pH e temperatura na atividade de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	27
4.6. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	28
4.7. Determinações das constantes cinéticas.....	28
4.8. Efeito de modificadores químicos na atividade de proteases do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Obtenção do extrato enzimático e determinação da concentração de proteínas.....	30
5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
5.3. Determinação da atividade proteásica de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	35
5.4. Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de proteases	37
5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	39
5.5.1. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade amidásica de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-BApNA.....	40
5.5.2. Determinação das constantes cinéticas de proteases sobre o L-BApNA.....	44
5.5.3. Efeito de pH e temperatura na atividade esterásica de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-TAME.....	48
5.5.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de proteases sobre L-TAME.....	51
5.6. Efeito de modificadores químicos na atividade de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	56
5.6.1. Efeito de EDTA.....	56
5.6.2. Efeito de PMSF.....	58
5.6.3. Efeito de TLCK.....	60
5.6.4. Efeito de Aprotinina.....	62
5.6.5. Efeito de Benzamidina.....	64
6. CONSIDRAÇÕES FINAIS.....	66
7. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Mecanismo esquemático da ativação da produção de nibidores de proteases por fermento em folhas de tomate.....	6
Figura 2: Lagarta da soja (larva), <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner).....	12
Figura 3: Forma adulta da <i>Anticarsia gemmatalis</i>	13
Figura 4: Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos...	15
Figura 5: Modelo de secreção da tripsina em <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	21
Figura 6: Determinação da concentração de proteína das Frações I e II. Determinação da atividade no extrato enzimático da Fração I e II.....	32
Figura 7: Eletroforeses SDS-PAGE da Fração I e II.....	34
Figura 8: Hidrólise de caseína por proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	36
Figura 9: Efeito de íons cálcio na atividade específica de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	38
Figura 10: Efeito de pH sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-BApNA.....	42
Figura 11: Efeito da temperatura sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-BApNA.....	43
Figura 12: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração I, do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	46
Figura 13: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração II, do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	47
Figura 14: Efeito de pH sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-TAME.....	49
Figura 15: Efeito da temperatura na atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-TAME.....	50
Figura 16: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração I, do intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	52
Figura 17: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração II, do intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	53

Figura 18: Efeito de EDTA sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	57
Figura 19: Efeito de PMSF sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	59
Figura 20: Efeito de TLCK sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	61
Figura 21: Efeito de aprotinina sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	63
Figura 22: Efeito de benzamidina sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	65

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro I: Propriedades cinéticas de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	54
Quadro II: Propriedades da atividade enzimática do intestino médio de Lepidópteras.....	55

ABREVIACÕES UTILIZADAS

BSA – Albumina do soro bovino

L-BApNA – N-benzoil-L-argininil *p*-nitroanilida

CHAPS – (3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato)

CMC – concentração crítica micelar

DMF – dimetilformamida

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

GPI-PLC – Fosfolipase C específica de glicosil fosfatidilinositol

k_{cat} – constante catalítica

kDa – kilodaltons

K_i – constante de dissociação do complexo enzima inibidor

$K_{M\ app}$ – constante de Michaelis-Menten aparente

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

L-TAME – N α -tosil-L-arginil metil éster

TLCK – 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona

Tris – Tris (hidroximetil) amino metano

Triton-X 100 – t-octifenoxipolietoxietanol

$V_{max\ app}$ – velocidade máxima aparente

RESUMO

XAVIER, Luciana Pereira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2002.
Caracterização bioquímica de proteases do intestino de *Anticarsia gemmatalis* envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e José Cola Zanuncio.

A identificação e caracterização de proteases de intestino médio de insetos são importantes para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao ataque de insetos. Neste estudo, a atividade proteolítica em intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* foi investigada. O extrato enzimático foi obtido após ciclos de congelamento e descongelamento dos intestinos e posterior centrifugação do homogenato a 100,000 g, e o sobrenadante resultante (Fração I) foi utilizado como fonte de proteína solúvel. Como parte de nossos estudos, envolvendo a identificação de proteases do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis*, a presença de enzimas ligadas a membrana foi avaliada. Para este propósito, o precipitado do homogenato de intestino médio centrifugado a 100,000 g. foi ressuspendido em tampão com Triton X-100, centrifugado como anteriormente e o sobrenadante (Fração II) usado como fonte de proteases ligadas à membrana. A Fração I foi capaz de hidrolisar a caseína, e o substratos sintéticos L-BApNA e TAME. Usando L-BApNA como substrato, a atividade da Fração I foi investigada na presença de vários inibidores de proteases. Assim, EDTA, PMSF, TLCK, benzamidina e aprotinina, foram todos capazes de inibir a atividade da Fração I, com maior inibição observada com TLCK e benzamidina. De acordo com este resultados, conclui-se que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui uma serino protease trpsina-like. Com o propósito de caracterizar melhor a atividade tripsina-like, foi determinada a atividade ótima para a Fração I. O pH ótimo foi de 8.5 e à temperatura ótima foi a 35 °C, sobre L-BApNA. O pH ótimo e temperatura foi de 8.0 e 30 °C, sobre TAME. O efeito de cálcio na atividade da Fração I foi investigado usando L-BApNA como substrato. A atividade máxima foi obtida na concentração de 20 mM de cálcio. Valores de K_{Mapp} para L-BApNA e TAME foram de 0.32mM e 52.5 μ M, respectivamente. A Fração II foi capaz de hidrolisar a caseína, e os substratos sintéticos, L-BApNA e TAME. O efeito de vários inibidores de proteases

também foi avaliado, usando L-BApNA como substrato. EDTA, PMSF, TLCK, benzamidina e aprotinina foram capazes de inibir a atividade da Fração II, com TLCK e benzamidina exibindo forte inibição. Estes resultados mostram que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui proteases tripsin-*like* ligadas a membrana. Esta atividade tripsina-*like* foi melhor caracterizada. O pH ótimo para a Fração II usando L-BApNA e TAME foi 8.5 e 8.0, respectivamente. A atividade ótima exibida foi a 50 °C para ambos substratos, L-BApNA e TAME. Na concentração de 20 mM de cálcio, a Fração II mostrou um aumento na atividade sobre o L-BApNA. Os valores de K_{Mapp} para L-BApNA e TAME foram de 0.23mM e 95.4 μ M, respectivamente.

ABSTRACT

XAVIER, Luciana Pereira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, August 2002.
Biochemical characterization of gut proteases of *Anticarsia gemmatalis* involved in the mechanism of interaction plant-insect. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee Members: Maurílio Alves Moreira e José Cola Zanuncio.

The identification and characterization of proteases from insects midgut are important in developing cultivars resistant to insect attack. In this study, proteolytic activities in the larval midgut of *A. gemmatalis* were investigated. Enzymatic extracts were obtained after frozen-and-thawed several times and centrifugation of the midgut homogenate at 100,000 g, and the resulting supernatant (Fraction I) used as source of soluble proteins. As part of our studies involving the identification of proteases from midgut larvae of *A. gemmatalis*, the presence of the membrane-bound enzymes was evaluated. For this purpose, the pellet from midgut homogenates centrifuged at 100,000 g. was resuspended in buffer with Triton X-100, centrifuged as before and the supernatant (Fraction II), used as a source of membrane-bound proteases. Fraction I was able to hydrolyze casein, and the synthetic substrates, L-BApNA and TAME. Using L-BApNA as substrate, Fraction I activity was investigated in the presence of several protease inhibitors. Thus, EDTA, PMSF, TLCK, benzamidine and aprotinin, were all able to inhibit Fraction I activity, with greater inhibition observed with TLCK and benzamidine. According with these results, we conclude that the midgut larvae of *A. gemmatalis* have a trypsin-like serine protease. In order to further characterize the trypsin-like activities, the optimal activity for Fraction I was determined. The optimal pH was 8.5 and the optimal temperature was 35 °C, toward L-BApNA. Optimum pH and temperature were 8.0 and 30 °C, toward TAME. The effect of calcium on Fraction I activity was investigated using L-BApNA as substrate. The maximum activity was obtained at 20 mM calcium concentration. K_{Mapp} values for L-BApNA and TAME were 0.32mM and 52.5µM, respectively. Fraction II was able to hydrolyze casein, and the synthetic substrates, L-BApNA and TAME. Also, the effect of several proteases inhibitors were evaluated, using L-BApNA as substrate. EDTA, PMSF, TLCK, Benzamidine and Aprotinin were able to inhibit Fraction II activity, with TLCK and

benzamidine exhibiting stronger inhibition. These results showed that the midgut larvae of *A. gemmatalis* have a membrane-bound trypsin-like protease. These trypsin-like activities were further characterized. Optimum of pH for Fraction II activity using L-BApNA and TAME were 8.5 and 8.0, respectively. Optimal activity was exhibited at 50 °C toward L-BApNA and TAME. At 20 mM calcium concentration, Fraction II showed the highest activity toward L-BApNA. K_{Mapp} values for L-BApNA and TAME were 0.23mM and 95.4 μ M, respectively.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 2/3 (dois terços) de todas as espécies do mundo são da classe insecta, sendo esta o maior grupo de animais. Cerca de 67% de todas as plantas floríferas dependem dos insetos para polinização, o que evidencia a sua grande importância ecológica no ambiente terrestre. Outros insetos, entretanto, nos afetam indiretamente como vetores de doenças humanas ou de animais domésticos: malária, elefantíase e febre amarela, têm como vetores os mosquitos; tifo e febre recorrente, os piolhos; peste bubônica, as pulgas; e febre tifóide e desintéria, as moscas domésticas. Na agricultura mundial não é diferente. Das grandes perdas sofridas por ataque de insetos e pela ação de patógenos (fungos, bactérias e vírus), cerca de 37% da produção mundial é perdida por ação de pragas ou por doenças em geral e 13% deste percentual deve-se ao ataque de insetos (GATEHOUSE *et al.*, 1992).

As plantas apresentam um recurso importante para milhares de espécies de insetos, não surpreendentemente, a evolução de ambos está intimamente interligada: os insetos participaram na seleção de certas características na evolução das plantas, assim como estas determinaram várias adaptações nos mesmos. Essa co-evolução é mais evidente na polinização, onde a interação plantas-insetos é mutuamente benéfica. Entretanto, os insetos, também podem danificá-las e, nos últimos anos, há um interesse crescente no estudo dos mecanismos de defesas das plantas contra os insetos e aos danos causados por eles.

As plantas possuem um complexo sistema de autodefesa contra patógenos e herbívoros. Algumas das defesas são constitutivas, ou seja, estão presentes no organismo, sem necessidade de serem induzidas, elas são barreiras físicas ou biológicas para os organismos invasores. Outras já são ativas, quando induzidas por ataque de pragas ou patógenos a planta. A resposta ao dano pode ser local ou sistêmica na planta, sendo que muitos dos compostos químicos de defesa são denominados “metabólitos secundários” e são produtos de uma via biossintética especializada. Entretanto, algumas moléculas ativas na planta possuem papéis primários na defesa, como, por exemplo, os inibidores de proteases e lectinas que agem como proteínas de reserva em sementes e complexos estruturais como lignina (RYAN & JAGENDORF, 1995).

Na tentativa de controlar o ataque destas pragas, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos, os quais, apesar de manterem a produtividade, causam sérios danos ao ambiente e ao homem. Um destes métodos é a introdução de genes em genomas das plantas, que conferem resistência a insetos. Juntamente com vários resultados positivos em plantas transgênicas resistentes a pragas via expressão de genes de inibidores de proteases (HILDER *et al.*, 1987; DUAN *et al.*, 1996; GATEHOUSE *et al.*, 1997). Por outro lado, um número crescente de trabalhos mostra que os insetos são capazes de adaptarem-se a presença dos inibidores produzidos pelas plantas (JONGSMA *et al.*, 1997). Esta resistência parcial às pragas está presente em algumas variedades de soja, mas não proporciona uma completa proteção. Em estudos com variedades de soja resistentes a insetos, BEACH & TODD (1988) observaram que o consumo das folhas da planta da soja pela *A. gemmatilis* não diminuiu por serem as plantas resistentes, apenas ocorreu um consumo mais lento pelas larvas, o que acarretou menor ganho de peso para o inseto e também menor taxa de seu crescimento no estágio posterior.

Pela via das lipoxigenases, via bioquímica de defesa da soja a insetos e patógenos, ocorre a produção de ácido jasmônico, o qual ativa genes de defesa da planta que codificam inibidores de proteases. Os inibidores de proteases têm efeito de proteger plantas contra danos causados por vários tipos de pragas agrícolas, impedindo, significativamente, a atividade proteolítica de enzimas presentes no intestino dos insetos. Vários trabalhos têm demonstrado que plantas de soja respondem a diferentes estresses bióticos e abióticos, incluindo ataque de insetos, com aumento da atividade de lipoxigenases e da síntese de inibidores de proteases em suas folhas (FORTUNATO, 2001; SILVA *et al.*, 2002). Portanto, o conhecimento do sistema de proteases do inseto permitirá inferir que tipo de inibidores a planta produz ou deverá produzir em resposta ao ataque da praga.

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora, bastante problemática em culturas brasileiras. Mesmo em baixas densidades populacionais, este inseto causa grandes danos à lavoura de soja, que vai desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. É um inseto mastigador que se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ela ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens com conseqüente redução da produção de grãos. A utilização de genes que codificam inibidores

de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia promissora. Entretanto, fazem-se necessários maiores estudos que levem em consideração a fisiologia e a bioquímica da digestão dos inibidores produzidos pelas plantas no intestino dos insetos. Neste contexto, propõe-se realizar a caracterização bioquímica de proteases de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) com o objetivo de elucidar o mecanismo de interação planta-inseto.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Interação inseto-planta

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra o ataque dos insetos, principalmente defesa química, e os compostos químicos envolvidos – moléculas orgânicas, alcalóides, terpenos e proteínas – são encontrados em todos os tecidos vegetais. As proteínas de defesa podem ser produzidas constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque de insetos, como as sementes, ou produzidas indutivamente por danos mecânicos, como ocorre quando um inseto alimenta-se de uma folha (JOUANIN *et al.*, 1998). Entretanto, muitas destas proteínas também são tóxicas a mamíferos, o que indica que devam ser cuidadosamente estudadas para o uso em culturas agrícolas como mecanismo de proteção de plantas a insetos (SILVA-FILHO & FALCO, 2000). Entre as proteínas de defesa estão incluídas as enzimas, tais como: as quitinases, as substâncias como lectinas e os inibidores de protease (RYAN, 1990). Estes mecanismos de defesa levaram às várias estratégias evolutivas entre os insetos herbívoros. Alguns se alimentam de uma larga variedade de espécies de plantas (polívoros), mas selecionam o alimento de acordo com as toxinas presentes no mesmo. Outros insetos restringem sua dieta a uma ou algumas espécies de plantas (insetos monóvoros) e evoluíram sistemas enzimáticos de desintoxicação (RUPPERT & BARNES, 1996).

Os inibidores de proteases são naturalmente produzidos pelas plantas e têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores. Existem quatro famílias de inibidores de proteases que atuam sobre serino, cisteíno, metalo ou aspartil proteases. Os mais estudados são aqueles capazes de inibir as serino proteases, grupo da tripsina e da quimotripsina, enzimas estas encontradas majoritariamente em insetos da ordem Lepidoptera (TERRA & FERREIRA, 1994).

Os inibidores de serino proteases foram encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas, tais como sementes e tubérculos, mas, posteriormente, foram detectados em folhas e frutos (XAVIER-FILHO, 1992), acontecendo o mesmo para os inibidores de

cisteíno proteases. Além de protegerem as plantas contra o ataque de insetos, os inibidores de protease também são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

Danos causados em folhas de tomateiro por insetos mastigadores ou por outros meios mecânicos resultam numa rápida ativação transcricional de inibidores de proteases. O modelo proposto por FARMER & RYAN (1992) para genes que codificam inibidores de proteases em tomateiro mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa (Figura 1).

BROADWAY & DUFFEY (1986) observaram em larvas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* que após ingestão crônica de inibidores houve uma deficiência de aminoácidos essenciais. A ingestão de inibidores enzimáticos não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, invés disto resulta na hiperprodução de enzimas proteolíticas. Ou seja, o efeito adverso ocorre de acordo com a ingestão crônica de inibidores, o que resulta na hiperprodução de proteases alimentares, levando à limitação da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese protéica e, conseqüentemente, redução do crescimento e do desenvolvimento do inseto (BROADWAY & DUFFEY, 1986; BROADWAY, 1995).

Por outro lado, os insetos apresentam diversos mecanismos de defesa contra os inibidores de proteases produzidos pelas plantas. Quando a planta produz um inibidor que atua sobre uma enzima de uma determinada classe de proteases, o inseto produz proteases de classes diferentes que poderão degradar inclusive o inibidor protéico produzido por esta planta e, desta forma, impede a sua ação prejudicial (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

Na tentativa de controlar o ataque destas pragas, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos, os quais, apesar de manterem a produtividade, causam sérios danos ambientais, contaminação dos operadores rurais e proporcionam a seleção de indivíduos resistentes entre as espécies que está combatendo-se. A engenharia genética de plantas oferece possibilidade de se introduzir genes de bactérias (ex. *Bacillus thuringiensis*) que conferem resistência às pragas em plantas ou genes derivados de plantas que codificam para inibidores de proteases ou lectinas (JOUANIN *et al.*, 1998) como uma alternativa na tentativa de se controlar o ataque de insetos.

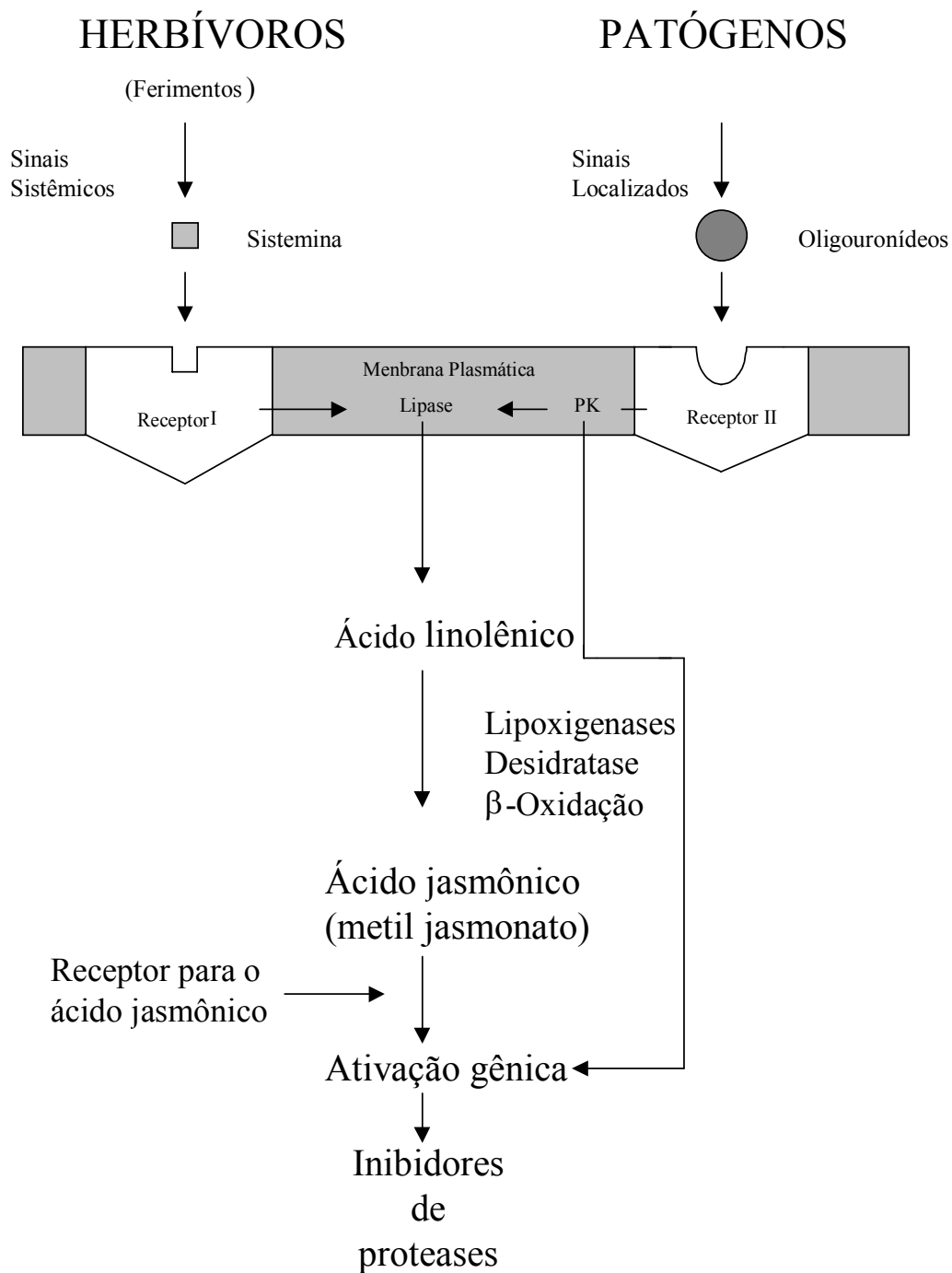


Figura 1: Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. **PK**=Proteína Quinase (FARMER & RYAN, 1992).

A transferência de genes pode ser considerada como um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Neste sentido, os inibidores de proteases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento até mesmo a morte de suas larvas. Juntamente com vários resultados positivos em plantas transgênicas resistentes a pragas via expressão de genes de inibidores de proteases (HILDER *et al.*, 1987; DUAN *et al.*, 1996; GATEHOUSE *et al.*, 1997), um número crescente de trabalhos mostra que os insetos são capazes de adaptarem-se à presença dos inibidores produzidos pelas plantas (JONGSMA *et al.*, 1997).

BROADWAY (1995), em experimentos com larvas de *Lymantria dispar* e *Helicoverpa zea*, demonstrou a adaptação a inibidor de tripsina por estes insetos. A inibição de tripsina e quimotripsina *in vitro* pelos inibidores de proteases de soja sugeririam que o inibidor Kunitz ou Bowman-Birk teria um potencial efeito antimetabólico quando ingerido pela larva. No entanto, PAULILLO *et al.* (2000) em estudos com *Spodoptera frugiperda*, após ingestão crônica dos inibidores semipurificados de soja, observaram que não houve redução significativa do crescimento e desenvolvimento de *S. frugiperda*. Os autores sugeriram que o inseto foi fisiologicamente capaz de adaptar-se a dieta de inibidores de proteases alterando o *pool* de enzimas proteolíticas complementares do intestino médio.

SILVA *et al.* (2002), trabalhando com plantas de soja submetidas ao ataque de larvas *Anticarsia gemmatalis*, verificaram aumento nos níveis de inibidores de proteases produzidos pela planta como resposta local e sistêmica a este estresse biológico.

Segundo FRANCO *et al.* (1999), a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia com grande chance de sucesso, mas, para que isto ocorra, é necessário que se selecione estes inibidores levando-se em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto.

2.1.1. Inibidores de Proteases

Inibidores de proteases são moléculas protéicas importantes na natureza para a regulação específica da atividade proteolítica de enzimas alvo, inibindo a atividade destas em casos emergenciais, ou na interação com receptores de sinalização. Muitos inibidores de proteases possuem um número de propriedades que claramente os distinguem da maioria das proteínas. Estes resistem à ação do calor, a extremos de pH e à hidrólise por enzimas proteolíticas. Esta resistência é resultado da sua estrutura tridimensional compacta, a qual é, geralmente, mas não necessariamente, estabilizada por pontes dissulfeto. Inibidores de proteases de plantas são geralmente caracterizados por alto conteúdo de resíduos de cisteína e baixo percentual de resíduos de metionina, histidina e triptofano, sendo normalmente ricos em aminoácidos aspártico e glutâmico ou de serina e lisina, podendo portanto ter ponto isoelétrico ácido ou básico (LASKOVSKI & KATO, 1980; BODE & HUBER, 1992).

Geralmente os inibidores associam-se fortemente às enzimas que eles inibem, com constante associação da ordem de 10^7 a 10^{14} M⁻¹. Esta relação é do tipo competitiva, diminuindo significativamente a atividade da enzima (LASKOVSKI & KATO, 1980).

Em plantas, os inibidores de protease servem como mecanismo de defesa (RYAN, 1990). Estes inibidores têm efeito de proteger as plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER *et al.*, 1987).

Encontramos inibidores pertencentes a quatro classes de proteases nas plantas: inibidores de serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases e metalo proteases (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989). Os inibidores de serino protease, por exemplo, mostram-se capazes de afetar o crescimento de insetos herbívoros e podem funcionar como agentes de defesa da planta contra insetos-praga (JONGSMA *et al.*, 1994).

2.1.2. Inibidores de serino proteases

O número de inibidores de serino proteases bem caracterizadas excede o número de inibidores descritos para as outras três classes, podendo ser agrupados em, no mínimo, 16 famílias baseadas na similaridade de seqüência e mecanismo de ligação (LASKOVSKI & KATO, 1980; BODE & HUBER, 1992). Os inibidores de serino proteases de plantas são agrupados em oito famílias: Bowman-Birk, Kunitz, Potato I, Potato II, Curcubita, Superfamília dos cereais, Ragi e família Thaumatin PR-like (RICHARDSON, 1991).

Em relação a outros inibidores de proteases, o mecanismo de interação dos inibidores de serino proteases com suas enzimas cognatas é bem conhecido. Estudos de sequenciamento e cristalografia por raios-X mostram que estes inibidores, apesar de não serem homólogos, em sua maioria, interagem com um mesmo “mecanismo padrão” (LASKOVSKI & KATO, 1980). Este grupo de inibidores compreende pequenas proteínas de 29 a 190 de aminoácidos aproximadamente. Todos possuem um *loop* de ligação exposto em conformação bem característica (BODE & HUBER, 1992).

A família de inibidores Kunitz inclui o inibidor de tripsina da soja (SBTI) que é o mais estudado em plantas e que dá nome à família. É comum em Leguminosae mas também é encontrado em Mimosoideae, Papilionidae, Caeasalpiniodae, dentre outras. Este inibidor possui 21 kDa e as seqüências de aminoácidos de três variantes genéticas são conhecidas – T_i^a , T_i^b e T_i^c . Estas possuem valores de K_i diferentes, T_i^a e T_i^c possuem valores de K_i similares de 1.5×10^{-10} M e 2.0×10^{-10} M respectivamente e T_i^b tem um valor mais alto de 1.0×10^{-8} M (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989).

A família de inibidor de soja Bowman–Birk (BBI) é típico de Leguminosae podendo ser encontrado também em Fabaceae, Phaseolaceae, Glycinaceae e Viciae (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989), possui uma massa molecular de 8 kDa e é considerado como um potencial agente anticarcinogênico e quimopreventivo de alguns tipos cânceres humano, por possivelmente inibir a atividade de um antígeno específico na próstata; o seu uso em tratamento de pacientes com câncer neste órgão está sendo avaliado (ZHANG *et al.*, 1999; WAN *et al.*, 1999). O BBI pode simultaneamente inibir tripsina e quimotripsina em sítios reativos independentes (XAVIER-FILHO, 1992). O BBI de

sementes de soja é único, porque possui um sítio inibidor de quimotripsina mais ativo relativo à atividade do sítio de inibição da tripsina em soja (KENNEDY, 1998; SESSA & WOLF, 2001).

A família Curcubita compreende inibidores encontrados em sementes de Cucubitaceae, com inibidores de tripsina e o fator Hagemam caracterizado pelo baixo peso molecular (XAVIER-FILHO, 1992).

O tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) é rico em inibidores de serino proteases e de carboxipeptidases. Potato I possui massa molecular de 8 kDa, associa-se fortemente formando uma molécula pentamérica, é inibidor de quimotripsina e também pode inibir subtilisina e tripsina (XAVIER-FILHO, 1992).

Sementes de cereais (Gramineae) são ricas em inibidores de serino proteases. A família Ragi compreende inibidores bifuncionais inibindo serino protease e α -amilase-like. Cereais que também contém inibidores bifuncionais são relacionados à família da proteína *Thaumatococcus* (XAVIER-FILHO, 1992).

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

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), é uma das pragas da soja (*Glycine max*). Consome a folha iniciando pela epiderme inferior e mesófilo e após o segundo instar a lagarta da soja consome a folha inteira. Uma vez que as folhas superiores e inferiores, a folhagem mediana e a cobertura de baixo foram consumidas, a lagarta promove a completa desfolhação da planta (ROBERTS & GUILLEBEAU, 1999).

Apesar da soja ser um dos principais hospedeiros primários da *A. gemmatalis*, sua larva é capaz de alimentar-se de muitas outras espécies incluindo amendoim, kudzu (*Pueraria thunbergiana*), feijão de cavalo (*Cannavalia* sp), algodão, ervilha, erva daninha do café, folhas de trevo, entre outras. A lagarta da soja é nativa das áreas tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental sendo uma permanente habitante da América tropical (WATERS & BARFIELD, 1989).

O ciclo de vida da lagarta da soja completa-se em cerca de quatro semanas durante o verão, sendo de maior duração no outono. O número de gerações depende da dispersão e a

chegada dos adultos. Os ovos são brancos, ligeiramente ovais e com tamanho entre 1 mm a 2 mm de diâmetro e aplainado em sua superfície de baixo. O ovo possui suportes proeminentes, sendo brancos só até antes de eclosão, quando se tornam rosas. Os ovos são postos separadamente do lado abaxial da folha, entretanto quando se tem alta infestação de ovos podemos encontrá-los também na superfície adaxial das folhas, nos pecíolos e até mesmo no caule (WATSON, 1916).

Larvas recém-eclodidas alimentam-se da casca do ovo do qual irão emergir deixando somente a porção presa à folha. Existem normalmente seis instars no estágio larval da lagarta da soja. As larvas variam extremamente em coloração e manchas durante os instars. A maioria das lagartas possui uma linha negra longitudinal e linhas brancas estreitas, amarelas ou rosas. A larva gasta cerca de dois dias no primeiro instar e cresce de 2,5 mm a 6 ou 7 mm antes da muda. A cabeça é marrom claro, arredondada e bilobada. O corpo da lagarta no primeiro instar é uniformemente verde claro sem nenhuma faixa longitudinal. As falsas pernas do segmento abdominal 3 e 4 são menores do que as dos segmentos 5 e 6. No segundo instar a borda negra da linha lateral aparece e o primeiro par de falsas pernas abdominais estão cerca de um quarto maior do que o do terceiro par, entretanto o segundo par está 50% maior do que o terceiro. O segundo instar termina em 3 ou 4 dias tendo larva cerca de 9 mm de comprimento. O terceiro instar também termina em 3 ou 4 dias e a lagarta pode alcançar 16 mm em comprimento. O quarto e o quinto instars terminam em 3 ou 4 dias e a lagarta pode atingir cerca de 25 mm de comprimento. Durante o sexto instar a lagarta da soja torna-se gradualmente maior e pode chegar a medir 48 mm. O sexto instar termina no quinto dia, até este período passaram-se cerca de 25 dias. No estágio pré-pupal a larva reduz em tamanho para 25mm de comprimento e torna-se marrom com poucas linhas longitudinais. (WATSON, 1916) (Figura 2).



Figura 2: Lagarta da soja (Larva), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner).

Fonte - http://www.biotecnologia.com.br/bio/12_h.htm.

A pupa da *A. gemmatalis* é verde claro por volta de um dia de idade, quando então se torna marrom. A pupa é de textura lisa e mede de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura. Ela vive diretamente embaixo da superfície do solo em uma profundidade de cerca de 2 cm. A mariposa adulta é variável em formas e coloração com uma envergadura de 30 a 38 mm. A asa da mariposa de *A. gemmatalis* varia de cinza, marrom amarelado claro, ou marrom avermelhado escuro. As extremidades das asas são marrons claras com uma linha de pontos claros próximo à margem. Uma linha diagonal escura estende-se através de dois pares de asas quando estas estão completamente estendidas (BARBARA, 2001) (Figura 3).

Vários parasitóides atacam a lagarta da soja, sendo que o parasitóide predominante é *Winthemia rufopicta* (Bigot) (Diptera: Tachinidae). Os parasitóides podem variar de ano a ano e de local para local. Os predadores desta lagarta são generalistas que se alimentam de outras lagartas. Dentre estes predadores observamos os besouros, *Calosoma sayi* Dejean, *Calleida decora* (Fabricius) e *Poecilus chalcites* (Say) (Carabidae) e vários outros. Predadores vertebrados como os pássaros, sapos, e roedores também agem como inimigos naturais da lagarta da soja. Este tipo de predação tem-se mostrado insignificante no controle da lagarta da soja. Os patógenos mais importantes são os fungos *Nomurea rileyi* e *Entomophthora* sp que contribuem significativamente no controle natural (BARBARA, 2001).



Figura 3: Forma adulta da *Anticarsia gemmatalis*.

Fonte - <http://www.gaipm.org/top50/velvetbean.html>

RICHTER & FUXA (1984) demonstraram que a *A. gemmatalis* foi susceptível ao nucleopoliedrovirus (NPV) e ao *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). O baculovírus anticarsia (nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis*) infecta sítios no epitélio do intestino médio do hospedeiro, onde se replica no núcleo das células colunares, produzindo progênie viral e estabilizando infecção sistêmica, embora a infecção também possa ocorrer em células isoladas (MATOS *et al.*, 1999). O Baculovírus tem sido usado para controlar a lagarta da soja, o que vem sendo o maior programa do mundo em termos de área tratada com bioinseticida natural. A sua aplicação no Brasil, em área superior a 1 milhão de hectares, vem resultando em uma economia anual superior a 10 milhões de dólares e em grandes benefícios ambientais, devido à economia de 1.400.000 litros de inseticidas químicos (MOSCARDI (1998) citado por SOUZA, 2001). Uma das desvantagens do uso desse vírus para o controle da *A. gemmatalis* é o longo tempo entre a infecção e a morte do inseto alvo que pode levar de quatro a quatorze dias, desta forma, após a aplicação do vírus, o inseto ainda consegue causar danos à lavoura antes da sua morte, o que tem incentivado cada vez mais novos estudos com baculovírus recombinantes no controle de pragas com a introdução de genes de resistência em plantas (RIBEIRO & PINEDO, 2001).

2.3. Enzimas digestivas dos Insetos

Cerca de dois terços de todas as espécies do mundo são da classe insecta. Este fenómeno tem sido explicado pela habilidade que os insetos possuem em utilizarem uma gama extensa de materiais orgânicos na sua nutrição (madeira, húmus, cera, sangue, seiva, tecidos animais e vegetais, etc). Além de digerirem materiais refratários (ex. madeira e cera), eles exploram recursos tóxicos não acessíveis a outros animais, como os inibidores de proteases. Esta capacidade digestiva depende das enzimas presentes e compartimentalizadas no intestino do inseto. Por possuírem estas habilidades são classificados como pragas em culturas agrícolas, em estocagem de alimentos, das indústrias e da saúde humana (TERRA *et al.*, 1996).

As proteases digestivas catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos (Figura 3). As peptidases – (peptídeo hidrolases, EC 3.4) agem em ligações peptídicas; neste grupo estão incluídas as proteases (endopeptidases, EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.4.11-19). As proteases são divididas em quatro subclasses, de acordo com o seu mecanismo catalítico, serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases e metalo proteases.

A organização do processo digestivo depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo do intestino médio que são responsáveis pela translocação das enzimas e produtos da digestão. Segundo TERRA *et al.* (1996a), a digestão de polímeros dos alimentos (proteínas, amido, celulose e hemicelulose) no intestino dos insetos acontece em três fases:

- inicial – nesta fase ocorre a diminuição da massa molecular dos polímeros através da ação de hidrolases, como tripsina, α -amilase, celulase e hemicelulase;
- intermediária – os oligômeros resultantes da primeira fase são hidrolisados em dímeros ou em dipeptídeos por hidrolases, tais como a α -amilase e aminopeptidase;

- final – ocorre na digestão final dos dímeros que são transformados em monômeros por hidrolases, tais como dipeptidases, maltase e celobiase.

Estes mesmos autores relatam a proposição de que a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico (Figura 4), a digestão intermediária e a final ocorrem no espaço ectoperitrófico e nas células do intestino médio, respectivamente.

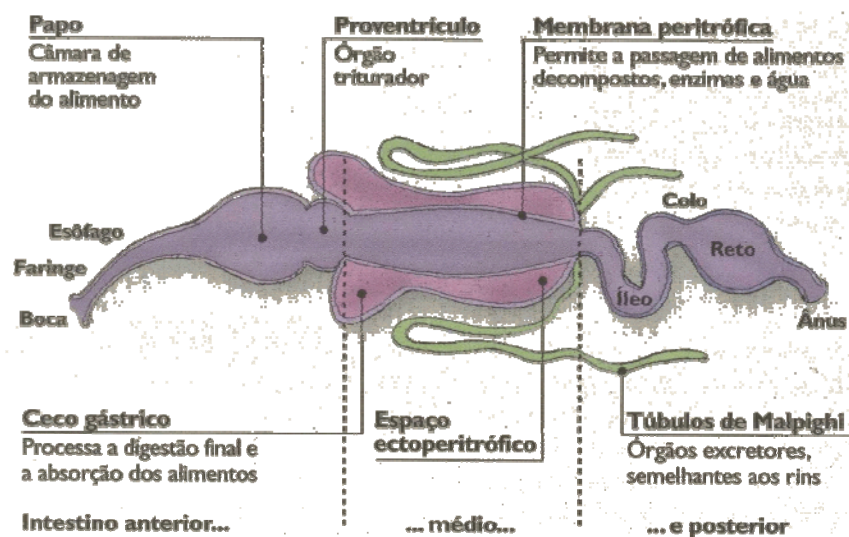


Figura 4: Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos. (TERRA *et al*, 2000).

As enzimas atravessam a membrana peritrófica e chegam ao espaço ectoperitrófico acompanhando os alimentos à medida que são fracionados. Depois, retornam para o interior do espaço peritrófico, na porção inicial do intestino médio. A água passa pelo espaço ectoperitrófico até chegar aos cecos, nos quais é absorvida (Figura 4) (TERRA et al, 2000).

O intestino médio de Lepidopteras é alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, pois várias espécies desta ordem são insetos de grande interesse econômico, pois atacam variedades comerciais, como cereais, algodão, leguminosas, dentre outros. SANTOS *et al.* (1986) demonstraram que não existe digestão no intestino anterior em larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). A digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico do intestino médio, a digestão intermediária e a final são realizadas por enzimas associadas ao glicocálice das células ou ligadas a membrana microvilar. Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram encontrados resultados similares. Dados obtidos com larvas de *Manduca sexta* (Sphingidae) mostraram que a atividade da tripsina é recuperada no lúmen do intestino médio anterior, sendo que a maioria do mRNA para tripsina é encontrada na porção mediana do intestino médio. Estes resultados levaram à proposição de que esta enzima é secretada por células da porção mediana do intestino médio e carregada pelo espaço ectoperitrófico para a porção anterior do intestino médio. Esta organização espacial do processo digestivo é provavelmente comparável na maioria das larvas, parecendo também ser similar em Lepidoptera adulta (TERRA *et al.*, 1996a, 1996b).

2.3.1. Serino proteases (EC 3.4.21)

As serino proteases são as enzimas mais estudadas, sendo encontradas em vírus, bactérias e em eucariotos, o que sugere serem vitais para os organismos. Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas (WILSON *et al.*, 1997; GORMAN *et al.*, 2000a e 2000b), desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (GILL *et al.*, 1996).

GORMAN & PASKEWITZ (2001) identificaram cinco serino proteases da hemolinfa do mosquito, *Anopheles gambiae*. As serino proteases regulam várias respostas de defesa em invertebrados, incluindo coagulação da hemolinfa, síntese de peptídeos antimicrobianos e melanização da superfície de patógenos. Estes processos requerem a presença de serino proteases na hemolinfa, onde elas podem rapidamente ativar a resposta imune em resposta à detecção de um patógeno. Neste trabalho, foi identificada a presença de Sp22D, uma protease com domínios apresentando potencial de ligação a patógenos, que é expressa em três tipos celulares que possuem funções imune (epitélio do intestino médio, corpo gorduroso, e hemócitos). Sp14A, Sp14D1, e Sp14D2 estão correlacionadas pelo domínio de serino proteases, sendo similares e com papéis prováveis na melanização ou na síntese de peptídeos antimicrobianos.

As serino proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e omega peptidase. Baseado em suas similaridades estruturais são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns: o clã A (AS) agrupa famílias que possuam origens comuns com a quimotripsina; o clã B (SB) com a subtilisina; o clã C (SC) com a carboxipeptidase C; o clã E (SE) com a peptidase A D-Ala-D-Ala de *Escherichia* sp; o clã F (SF) com o repressor do Lex A; e o clã G (SG) que agrupa as serino-proteases ATP dependentes (RAWLINGS & BARRET, 1993; RAO *et al.*, 1998).

A função catalítica das serino proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina reativa, histidina, e ácido aspártico) e o grau e tipo de especificidade pelo

substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de turnover da enzima, o k_{cat} , conseqüentemente mudando o mecanismo enzimático, com pequeno efeito no K_M . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo contribuindo para uma atividade catalítica otimizada (CARTER & WELLS, 1988; PERONA & CRAIK, 1995).

Geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupo hidroxila da serina do sítio ativo sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base, leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acilenzima, uma base imidazólica e uma amina. Este mecanismo implica num estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK *et al.*, 1987).

A relação entre a velocidade de acilação e de deacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a de deacilação e, para um substrato éster, esta velocidade pode ser 1 a 3 vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa de acilação é lenta e a de deacilação rápida e na atividade esterásica a etapa de acilação é rápida e de deacilação lenta, sendo portanto a etapa lenta o passo limitante da hidrólise (INAGAMI, 1971; FASTREZ & FERSHT, 1973).

As serino proteases são reconhecidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E.64), diisopropilfluorofato (DFP), e tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Algumas das serino proteases são também inibidas por reagente tiol tal qual *p*-

cloromercuribenzoato (PCMB) devido à presença de um resíduo de cisteína na região do centro ativo (RAO *et al.*, 1998).

RAO *et al* (1998) em um trabalho de revisão descreve que as serino proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade incluindo atividade amidásica e esterásica. A massa molecular das serino proteases, em geral, está na faixa de 18 a 35 kDa, entretanto, vários organismos possuem serino proteases com massas moleculares maiores, como é o caso de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidae), cuja massa molecular, para duas enzimas tripsina-like, é de 56 e 63 kDa (WAGNER *et al.*, 2002). O ponto isoelétrico das serino proteases está geralmente na faixa entre pH 4,0 e 6,0. Serino proteases alcalinas que são ativas em pH altamente alcalino representam um grande subgrupo das serino-proteases.

2.3.1.1. Tripsinas de insetos (EC 3.4.21.4)

As tripsinas são serino proteases que preferencialmente clivam ligações peptídicas do lado carboxila de L-aminoácidos básicos, tais como arginina e lisina, sendo inibida irreversivelmente por TLCK, o qual age alquilando o resíduo de histidina da tríade catalítica. A atividade digestiva de enzimas tripsina-like é encontrada na maioria das espécies de insetos estudados e sua especificidade mostra-se similar às tripsinas de vertebrados, sendo instáveis em pH ácido, além de possuírem diferentes especificidades frente aos inibidores de proteases (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA *et al.*, 1996a).

Similaridades entre as tripsinas de insetos e a tripsina bovina aparentemente estão relacionadas com o mecanismo catalítico e inibição por inibidores típicos de tripsina. Entretanto, comparação entre tripsinas de pâncreas bovino e tripsina de insetos tem mostrado diferença nos valores de pH ótimo, massa molecular (PURCHELL *et al.*, 1992) e em sua sensibilidade a inibidores de proteases de plantas (CHRISTELLER & SHAW, 1989).

Enzimas tripsina-like do intestino médio de insetos tem sido encontradas em várias espécies de Lepidoptera (LEE & ANSTEE, 1994, VALAITIS, 1995; NOVILLO *et al.*, 1999) que tem sido estudadas e caracterizadas. Várias outras espécies de insetos também

têm sido alvo destes estudos, como: Coleoptera (ZHU *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 2002), Hemiptera (FOISSAC *et al.*, 2002), Blattoptera (ELPIDINA *et al.*, 2001; MARANA, *et al.*, 2002), Diptera (GORMAM & PASKEWITZ, 2001; MUHARSINI *et al.*, 2001), dentre outros. A maioria das tripsinas dos insetos possui entre 20-30 kDa, entretanto tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como é o apresentado por WAGNER *et al.* (2002) em estudos com duas enzimas tripsina-like de *Melolontha melolontha*, de massas moleculares de 56 e 63 kDa. As tripsinas são mais ativas em pH alcalino (8,0 a 10,0) (TERRA & FERREIRA, 1994).

De acordo com a literatura as tripsinas de insetos não são estabilizadas ou ativadas por íons cálcio (JONHSTON *et al.*, 1991; LEMOS & TERRA, 1992), enquanto que em vertebrados, o íon cálcio, impede a agregação de moléculas da enzima protegendo-a da autólise e desnaturação por calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (SIPOS & MERKEL, 1968; SIPOS & MERKEL, 1970).

Estudos realizados por LEE & ANSTEE (1995) em larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e WAGNER *et al.* (2002) em *Melolontha melolontha* sobre o efeito de íons cálcio na atividade de tripsina em presença de EGTA e/ou EDTA, quelantes de cálcio, demonstraram que esta enzima sofreu pequena queda em sua atividade (5%), o que levou estes autores a sugerirem que o cálcio talvez possa ter uma função na enzima destes insetos, provavelmente, como co-fator.

Em estudos com *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), JORDÃO *et al.* (1999) propôs que a tripsina, provavelmente seja sintetizada ligada a membrana através de um peptídeo âncora. Posteriormente, é processada no complexo de Golgi e transportada em vesículas secretoras. As vesículas migrariam através das microvilosidades, fundindo-se com a membrana apical e liberadas no lúmen. Vesículas de membrana única ou de membrana dupla tornam-se solúveis por proteólise limitada. A membrana remanescente com alguma enzima ligada funde-se posteriormente com a membrana peritrófica (Figura 5).

A ligação de enzimas em membranas celulares comumente ocorre através um peptídeo hidrofóbico ou através de uma âncora de GPI. Enzimas ligadas por peptídeos hidrofóbicos são bem solubilizadas por detergentes com alto CMC, como o CHAPS, ou

com baixo CMC, como o Triton X-100, e parcialmente liberadas de membranas por ação de papaína ou tripsina. Enzimas ancoradas a membranas via âncora de GPI são liberadas em solução com detergente com alto CMC ou por tratamento com GPI-PLC (HOOPER & TURNER, 1988).

Em estudos com *Aedes aegypti* vários autores demonstraram uma visão molecular da síntese da tripsina. A ingestão de sangue, por fêmeas de *A. aegypti*, induz duas fases de síntese de tripsina. A primeira fase acontece nas primeiras 4 a 6 horas após a ingestão, sendo caracterizada pela presença de pequenas quantidades de tripsina “inicial”. A segunda fase ocorre de 8 a 36 horas após o repasto sendo caracterizada pela presença de grandes quantidades de tripsina “tardia”. A atividade enzimática da tripsina inicial possui um papel único e crítico na regulação da síntese da tripsina tardia, pois age como um sensor, sendo os seus produtos de proteólise utilizados na indução da síntese da tripsina tardia, a qual é responsável pela maior parte das clivagens endoproteolíticas das proteínas do repasto (NORIEGA *et al.*, 1995; BARILLAS *et al.*, 1995; NORIEGA & WELLS, 1999).

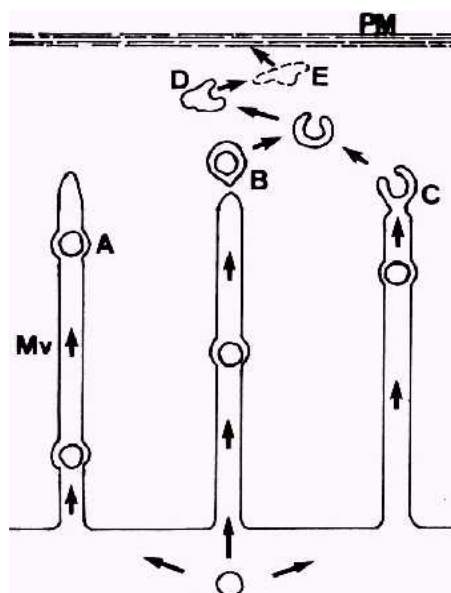


Figura 5: Modelo de secreção da tripsina em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). Mv - microvilosidades. A – vesícula secretora migrando dentro de microvilosidades. B – união da vesícula com a zona apical de microvilosidades. C – vesícula secretora delimitada por membrana. D – vesículas de membrana única. E – incorporação da vesícula remanescente à membrana peritrófica - PM (JORDÃO *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo principal realizar a caracterização bioquímica e cinética de proteases de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), visando contribuir para o esclarecimento do processo envolvido no mecanismo de interação planta-inseto.

3.1.1. Objetivos específicos

- Avaliação da atividade proteolítica do extrato enzimático obtido a partir do intestino médio do inseto;
- Avaliação da influência da concentração de íons cálcio em sua atividade;
- Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade;
- Caracterização cinética destas proteases com o substratos sintéticos L-BApNA e L-TAME, para atividade amidásica e esterásica, respectivamente;
- Estudo da ação de vários inibidores de serino proteases sobre a atividade de proteases intestino médio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Criação da lagarta da soja

Ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), Londrina/ PR e mantidos no laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da UFV, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 quatro dias, os adultos emergiram e foram alimentados com solução nutritiva composta de 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. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície do papel que reveste internamente a gaiola. As folhas de papel que revestem internamente a gaiola 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 está 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 dois ou três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando se iniciou a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial baseada na metodologia de HOFFMAN-CAMPO *et al.* (1985) colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

4.1.1. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi composta de feijão (mulatinho), levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Estes ingredientes foram processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura era autoclavada por 1 hora à pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$, em seguida transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1 mg), pantoenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), água (1L); até formar uma pasta homogênea que era então transferida ainda quente para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida era resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis*

O intestino médio foi extraído após dissecação de larvas de 4º e 5º instar, em presença de $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme metodologia utilizada no laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – FIOCRUZ / RJ. Após os ciclos, frações de 1 mL do extrato foram centrifugadas em tubos plásticos de 2mL com tampas a 100.000 g por 30 min a 4°C .

O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a -18°C para análises posteriores e denominado como Fração I. O precipitado foi solubilizado com o detergente Triton X-100 0,5% em 1mL de $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$, centrifugado a 100.000 g por 30 min a 4°C . O sobrenadante obtido foi então retirado e mantido a -18°C para análises futuras e denominado como Fração II.

4.3 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína, para as Frações I e II, foi obtida pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de BSA.

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

A eletroforese foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – FIOCRUZ/RJ. Utilizou-se o método descrito por LAEMMLI (1970): gel de poliacrilamida 12% na presença do agente desnaturante SDS (SDS-PAGE 0,1%). Este foi corado com Coomassie blue R-250 [0.2% (w/v) em metanol/ ácido acético /água (4:1:50)].

Como padrão de massa molecular foi utilizado Miosina de músculo de coelho (205 kDa), β -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), Fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), Frutose-6-fosfato cinase de músculo de coelho (84 kDa), Albumina do soro bovino (66 kDa), Desidrogenase glutâmica de fígado de boi (55 kDa), Ovalbumina do ovo de galinha (45 kDa) e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa).

4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina (substrato SDS-PAGE)

A eletroforese substrato SDS-PAGE (ALVES *et al.*, 1993) foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – FIOCRUZ/RJ. A análise da atividade proteolítica em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina co-polimerizada foi realizada, usando as mesmas condições para a eletroforese descrita anteriormente, sendo que as amostras não foram submetidas à desnaturação por aquecimento. Após a eletroforese, o gel foi incubado em 2,5% (v/v) de Triton X-100, por uma hora, à temperatura ambiente, sob agitação para remover o SDS. Posteriormente, os géis foram lavados e incubados com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, por 18 horas à temperatura

ambiente. A atividade foi revelada pela coloração com 0,1% de Amido *black*. As bandas claras no gel referem à atividade proteolítica sobre a gelatina co-polimerizada.

4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

4.5.1. Atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada utilizando-se caseína como substrato numa faixa de concentração variando de 0,075 a 0,6% (p/v). A atividade foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm utilizando-se o método descrito por KUNITZ (1947). A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 a 37 °C.

O tempo de incubação foi de 3 minutos, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 5% (p/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas para remover a proteína precipitada e a atividade do sobrenadante pôde, então, ser determinado a 280 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

4.5.2. Atividade amidásica

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando o substrato cromogênico L-BApNA (substrato para enzimas tripsina-*like*) na concentração final de 0,5 mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 1% (v/v) de dimetilformamida (DMF).

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 (M⁻¹ x cm⁻¹) para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

4.5.3. Atividade esterásica

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por HUMMEL *et al.* (1959), utilizando o substrato L-TAME na concentração final de 0,10 mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂. As velocidades iniciais foram determinadas pela medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹ x cm⁻¹ para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

4.5.4. Efeito de pH e temperatura na atividade de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

Os perfis de pH foram determinados utilizando-se os seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,05 M:

TAMPÃO	Faixa de pH
ácido cítrico/fosfato dissódico	2,0-2,5
ácido cítrico/citrato de sódio	3,0-3,5
ácido acético/acetato de sódio	4,0-4,5
ácido cítrico/citrato de sódio	5,0-5,5
Monofosfato/fosfato dissódico	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
ácido bórico/borato de sódio	9,0-10,0

A atividade do extrato enzimático, Fração I e II, nos respectivos valores de pH foi determinada misturando-se 100 µL do extrato enzimático, 400 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM ou de 75 µL da solução de L-TAME 0,6 mM e volume suficiente do tampão, correspondente a faixa de pH desejada, para completar 1 mL. Após 5 minutos de incubação

da mistura a 25 °C, a reação foi paralisada com 300 µL de ácido acético 60% (v/v) e a absorvância da mistura foi determinada 410 nm.

O efeito da temperatura sobre a atividade do extrato enzimático, Fração I, foi determinado a 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C e o da Fração II determinado a 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C. Foi utilizado banho-maria para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas e espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada. Após 5 minutos de incubação da mistura na temperatura desejada, a reação foi paralisada com 300 µL de ácido acético 60% (v/v) e a absorvância da mistura determinada a 410 nm para o caso de L-BApNA ou de 247 nm para o caso de L-TAME. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

4.6. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

As Frações I e II foram analisadas com relação ao efeito da concentração de íons cálcio em suas atividades utilizando-se o substrato L-BApNA na concentração final de 0,5 mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, em concentrações de CaCl₂ variando de 5 a 30 mM. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

4.7. Determinações das constantes cinéticas

A determinação das constantes cinética de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$ foram realizadas a 35 °C, em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5, com o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,019 a 1,2 mM, tanto para Fração I quanto para Fração II. Na determinação das constantes cinéticas, utilizando-se o substrato L-TAME, nas concentrações de 0,013 a 0,8 mM, foram realizadas a 30 °C em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para a Fração I e a 50 °C em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para a Fração II.

As velocidades iniciais foram determinadas a 410 nm para L-BApNA e 247 nm para o substrato L-TAME, em função do tempo (2,5 minutos) utilizando-se para os cálculos os

coeficientes de extinção molar específicos. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear, empregando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987).

4.8. Efeito de modificadores químicos na atividade de proteases do intestino de *A. gemmatalis*

No estudo do efeito de modificadores químicos na atividade do extrato enzimático da Fração I e da Fração II, utilizou-se L-BapNA como substrato em presença de: EDTA (0 mM-100 mM) - inibidor de metalo proteases e proteases ativadas por metais por ser quelante de Ca^{+2} e outros metais divalentes, PMSF (0,040 mM-3,2 mM) – inibidor irreversível de serino-protease, TLCK (0,005 mM-1 mM) – inibidor irreversível de serino protease tipo tripsina, Benzamidina (0,001mM-1mM) – inibidor competitivo de serino protease e Aprotinina (0,05 μM -4,0 μM) – inibidor de serino proteases, com exceção de trombina e Fator X_a .

Ambas frações passaram por um período de pré-incubação com cada inibidor, posteriormente, foi adicionado substrato L-BapNA, incubado pelo mesmo período de tempo e a atividade amidásica foi analisada como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do extrato enzimático e determinação da concentração de proteínas.

No processo de obtenção do extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis*, os ciclos de congelamento e descongelamento proporcionam a lise celular do tecido do intestino liberando as enzimas solúveis em HCl 10^{-3} M. No precipitado, encontramos debris celulares, proteínas e enzimas insolúveis que podem estar ligadas à membrana e/ou às vesículas de secreção.

A ligação de enzimas em membranas celulares comumente ocorre através de um peptídeo hidrofóbico ou de uma âncora de GPI. Enzimas ligadas por peptídeos hidrofóbicos são bem solubilizadas por detergentes como CHAPS ou Triton X-100 e parcialmente liberadas de membranas por ação de papaína ou tripsina. Enzimas ancoradas a membranas, via âncora de GPI, são liberadas em solução com detergente de alto CMC ou por tratamento com GPI-PLC (HOOPER & TURNER, 1988). JORDÃO *et al.*, 1999 demonstraram que a tripsina de membrana de *S. frugiperda* foi liberada após o uso de papaína e detergentes e não pelo o uso de GPI-PLC, o que levou a estes autores a afirmarem que esta enzima está ligada à membrana por um peptídeo hidrofóbico. Em nosso experimento foi possível obter uma enzima tripsina-like após a solubilização do precipitado, obtido da centrifugação a 100.000 g, com o detergente Triton X-100 sugerindo que esta enzima é de membrana, entretanto, mais experimentos devem ser realizados para testar como ela está ancorada na membrana.

Para a obtenção do extrato enzimático, inicialmente foram realizados sete ciclos de extração, resultando em média 0,75 mg/mL de proteína para a Fração I e 0,15 mg/mL de proteína para Fração II (Figura 6A – extração A). Na tentativa de otimizar o processo para maior extração de proteínas e, conseqüentemente, para o aumento da atividade enzimática nas Frações I e II, foram realizados nove ciclos de congelamento e descongelamento, o que aumentou a concentração de proteína no extrato (Figura 6A – extração B).

O número de ciclo de congelamento/descongelamento não deve ser muito grande, porque pode aumentar a concentração de proteínas extraídas, mas diminuir a atividade específica das enzimas presentes nas frações. Em um processo de purificação destas enzimas, este procedimento deve ser evitado, pois a atividade específica diminui o que acarreta um baixo fator de purificação. O valor de atividade específica é utilizado no cálculo do fator de purificação e para se obter um fator alto faz-se necessário um valor crescente de atividade específica, a partir do primeiro passo da purificação. Uma baixa atividade específica indica a presença de pouca enzima, embora a concentração de proteínas totais esteja alta.

Assim, a concentração de proteína da fração I passou de 0,75 mg/mL para 2,7 mg/mL, um aumento de 360%, e a Fração II passou de 0,15mg/mL para 0,48mg/mL, um aumento de 320%, mostrando-se mais satisfatório o segundo procedimento realizado com relação à extração de proteína total.

Com relação à atividade enzimática no primeiro procedimento adotado, ou seja, nos sete ciclos de congelamento/descongelamento, a atividade da Fração I foi de 0,21 μ M/s e da Fração II foi 0,03 μ M/s (Figura 6B – Extração A). Já no segundo procedimento utilizado, ou seja, nos nove ciclos de congelamento/descongelamento, a atividade da Fração I passou de 0,21 μ M/s para 0,23 μ M/s, um aumento de 9,5%, e a Fração II passou de 0,03 μ M/s para 0,08 μ M/s, um aumento de 166% (Figura 6B – Extração B).

Apesar do aumento da atividade da Fração I ser pequeno, 9,5%, a Fração II passou a ter uma atividade 2,7 vezes maior. Assim, passamos a utilizar nove ciclos de congelamento/descongelamento, mesmo que praticamente a atividade da Fração I seria mantida, aumentaria a atividade da Fração II.

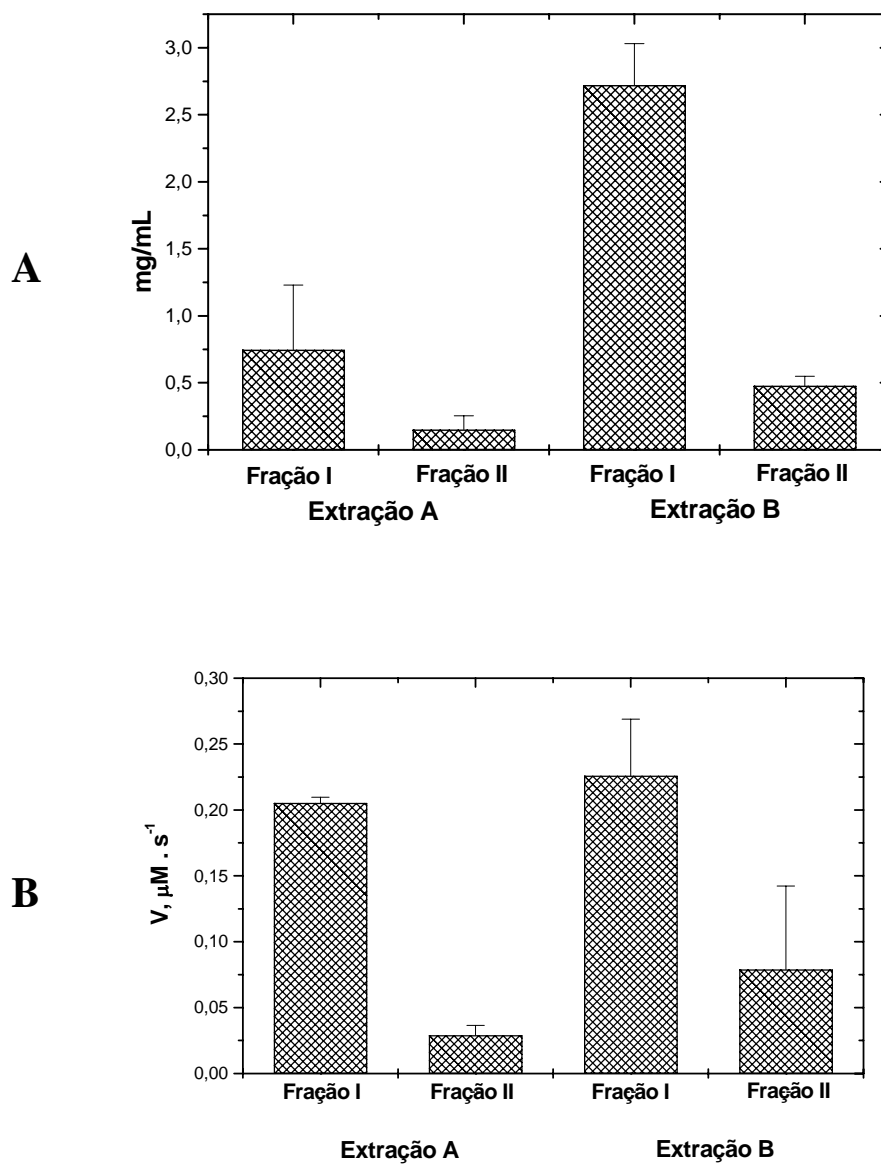


Figura 6: **A** - Determinação da concentração de proteína das Frações I e II. **B** - Determinação da atividade no extrato enzimático da Fração I e II. **Extração A** - representa sete ciclos de congelamento/descongelamento. **Extração B** - representa nove ciclos de congelamento/descongelamento.

5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Observa-se pela figura 7 semelhanças no perfil de proteínas, analisadas por eletroforese SDS-PAGE, entre a fração solúvel, Fração I (Figura 7-A) e a fração insolúvel, Fração II (Figura 7-B). Quando estas frações foram analisadas por eletroforese em presença de substrato, gelatina co-polimerizada, substrato-SDS-PAGE, tanto a fração solúvel, Fração I (Figura 7-C), quanto a fração insolúvel, Fração II (Figura 7-D), mostraram atividade proteolítica por proteínas da faixa de massa molecular acima da 60kDa. Estes resultados são compatíveis com padrão de massa molecular apresentado por serino proteases de alguns insetos, como *Melolontha melolontha* cuja massa molecular, para duas enzimas tripsina-*like* estudada, é de 56 e 63 kDa (WAGNER *et al.*, 2002).

Assim, como podemos ver no gel substrato-SDS-PAGE, onde a mancha clara indica que houve proteólise da gelatina, as proteínas com faixa de massa molecular acima de 60kDa são, então, proteases. Esta mancha grande pode ter ocorrido devido às várias proteases que agiram sobre o substrato ou a outras que, ao migrarem pelo gel, hidrolisaram a gelatina em sua passagem. Abaixo dessa faixa de 60 kDa, são encontradas outros tipos de proteínas extraídas das Frações I e II que não possuem atividade proteolítica, pois notamos suas presenças no SDS-PAGE e não no gel de substrato-SDS-PAGE.

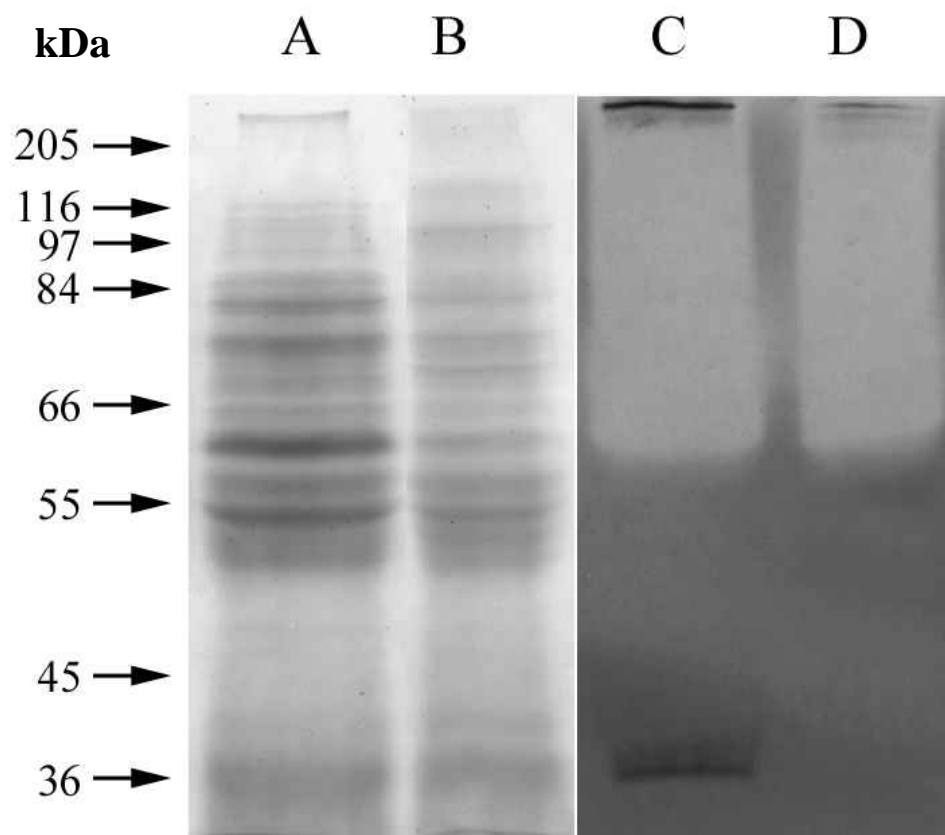


Figura 7 : **A** - Eletroforeses SDS-PAGE da Fração I. **B** - Eletroforeses SDS-PAGE da Fração II. **C** - Eletroforese substrato SDS-PAGE da Fração I. **D** - Eletroforese substrato SDS-PAGE da Fração II.

5.3. Determinação da atividade proteásica de enzimas do intestino médio de *A. gemmatalis*

Os resultados da atividade proteolítica das Frações I e II, utilizando-se caseína como substrato, estão apresentados na figura 8. Observa-se que embora a Fração I, em relação à Fração II, tenha apresentado maior concentração de proteína solúvel e maior atividade frente ao L-BApNA (Figura 6A-extração B e Figura 6B-extração B), apresentou menores valores de atividade proteásica frente à caseína (Figura 8A), pois a fração insolúvel, Fração II, embora apresentando extrato enzimático contendo menor concentração de proteína e menor atividade frente ao L-BApNA, mostrou maiores valores de atividade proteásica frente à caseína (Figura 8-B).

Entretanto, ambas as frações, contendo o extrato enzimático, apresentaram atividade proteolítica e seguiram o modelo hiperbólico de Michaelis-Menten. Estes resultados indicam a presença de proteases no extrato de intestino médio de *A. gemmatalis* da Fração I e II.

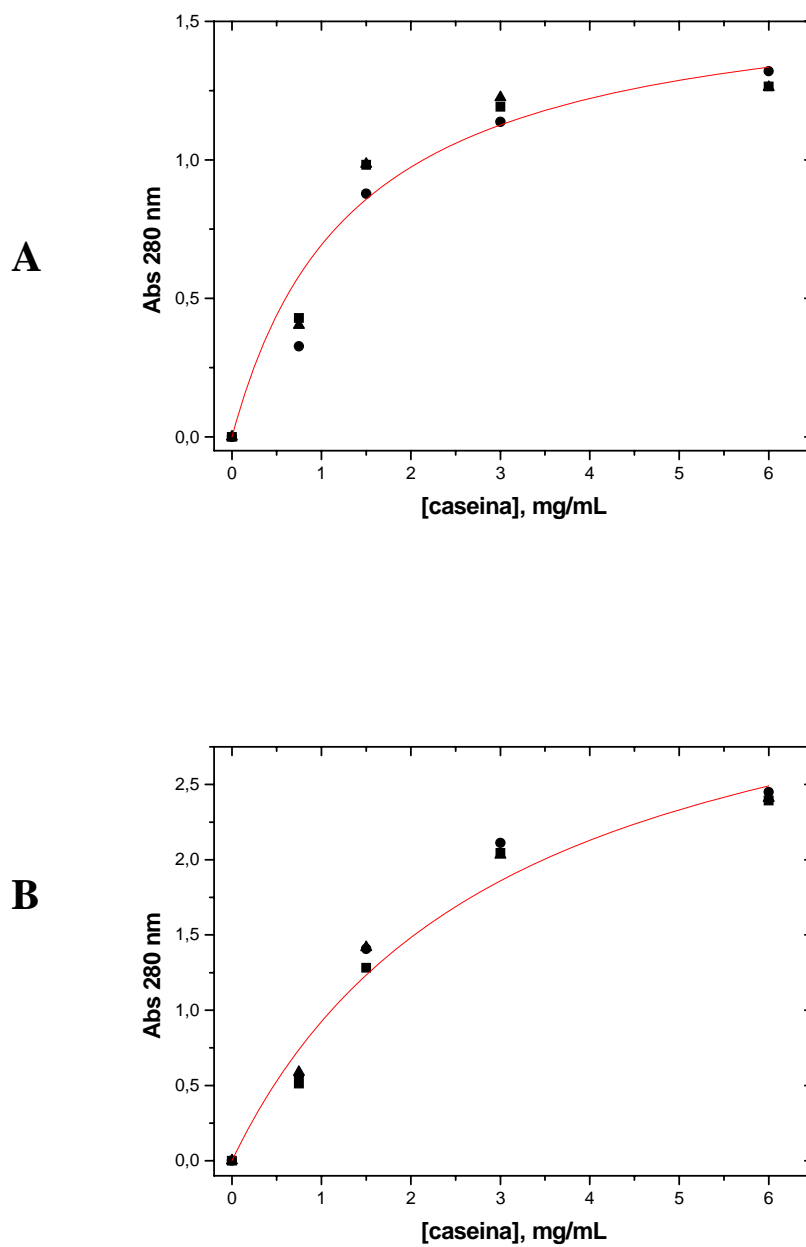


Figura 8: Hidrólise de caseína por proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – hidrólise da caseína pela Fração I B – hidrólise da caseína pela Fração II A concentração de caseína utilizada foi de 0,075 a 0,6% (m/v).

5.4. Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

Podemos verificar pela figura 9 que a atividade do extrato enzimático das Frações I e II frente ao L-BApNA foi maior numa concentração em torno de 20mM de CaCl₂ na mistura de reação, sendo que a Fração I teve um maior aumento na atividade do que a Fração II, possivelmente o Cálcio teve um papel maior na estabilização da Fração I do que na II. Tem sido relatado que os íons cálcio não exercem nenhum efeito sobre a atividade de serino proteases de insetos. JONHSTON *et al.* (1991) caracterizando a atividade de serino proteases do intestino médio de *Helicoverpa armigera* e LEMOS & TERRA (1992) em estudos com enzimas tripsina-like, solúveis e de membrana, em intestino médio de larvas de *Musca domestica* observaram que as tripsinas destes insetos não são estabilizadas ou ativadas por íons cálcio, enquanto modulador positivo da atividade de serino proteases de outros animais.

Segundo SIPOS & MERKEL (1970) e VAJDA & GARAI (1981), o íon cálcio liga-se a resíduos de aminoácidos da tripsina produzindo uma mudança conformacional, onde em temperaturas mais baixas esse complexo torna a conformação mais rígida, impedindo que ocorra autólise. Existem dois sítios de cálcio no tripsinogênio: o sítio primário, com alta afinidade pelo íon cálcio, comum ao tripsinogênio e à tripsina. A ocupação deste sítio estabiliza a proteína de uma desnaturação termal ou autólise. A coordenação do íon na estrutura da tripsina é aproximadamente octaédrico; o sítio secundário que para ligação de cálcio só existe no tripsinogênio. A ligação de cálcio neste sítio é essencial para a completa e eficiente ativação do tripsinogênio. Na tripsina, o sítio de ligação para o íon está localizado no interior da molécula e compreende resíduos de Glu 59, Glu 88, Asp 60, apesar de encontrarmos divergências entre os autores com relação aos resíduos que participam deste sítio (KOSSI AKOFF *et al.*, 1977; DE JERSEY *et al.*, 1980; CHIANCONE *et al.*, 1985). Assim, nossos resultados sugerem que as enzimas proteolíticas de *A. gemmatalis* possivelmente estejam sendo estabilizadas pelos íons cálcio, levando à mudança na conformação das moléculas de enzimas e melhorando o posicionando do centro ativo, acarretando aumento da atividade em presença de 20mM de íons cálcio.

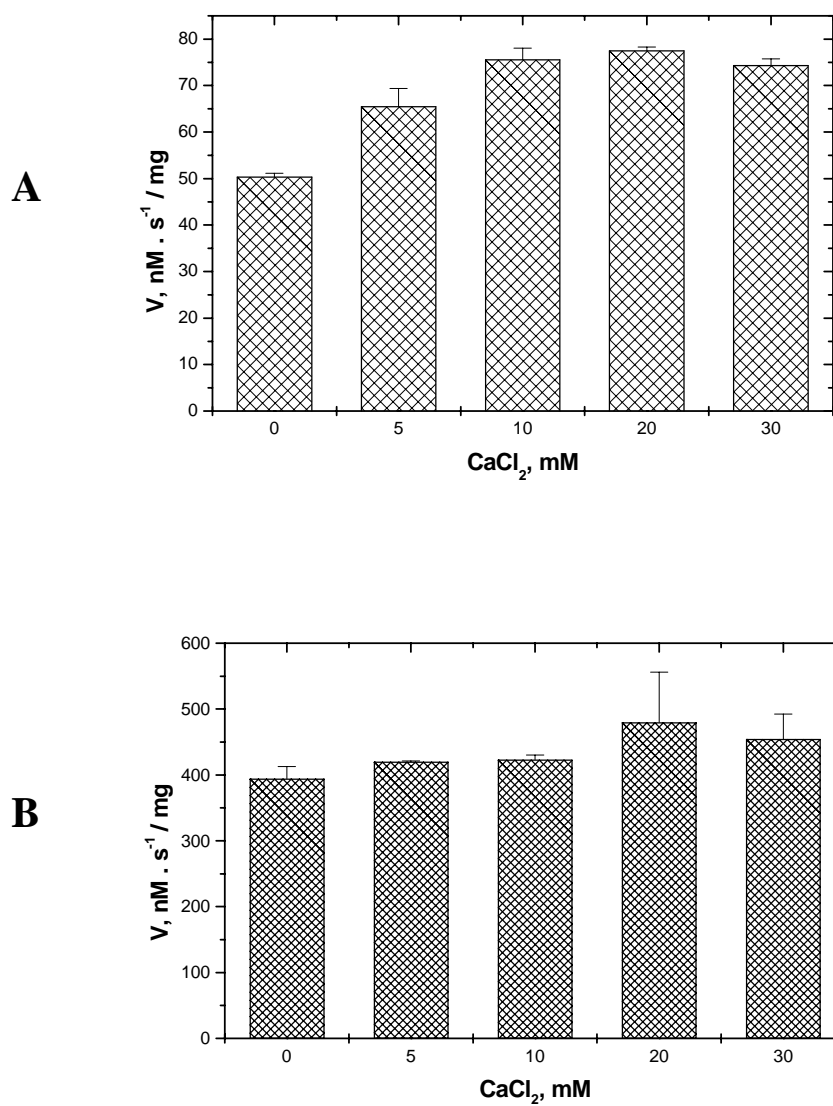


Figura 9: Efeito de íons cálcio na atividade específica de protease do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de cálcio sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da concentração de cálcio sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

A equação do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten apresenta dois parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} essenciais na caracterização de uma determinada enzima.

Quando toda concentração de enzima, no meio de reação, está sob a forma de complexo [ES], então a cinética Michaeliana fornece o parâmetro V_{max} . Portanto, V_{max} não é uma constante cinética, uma vez que depende da concentração de enzima pura e da própria constante catalítica da enzima (k_{cat}). Entretanto, é um parâmetro cinético importante, uma vez que a concentração de substrato na metade da V_{max} fornece a constante cinética K_M .

O K_M é uma constante cinética que relaciona a velocidade enzimática com a concentração de substrato. Estabelece, portanto, um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, ou seja, a concentração fisiológica de substrato. A constante de Michaelis indica também uma “adequacidade” do substrato ao centro ativo da enzima. Portanto, quanto menor o valor de K_M maior adaptação do substrato ao centro ativo da enzima.

Como o K_M é uma constante cinética característica para uma determinada enzima, seu valor numérico fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes organismos ou de diferentes estágios de desenvolvimento. Desta forma, com base no valor de K_M é possível inferir se uma determinada enzima é idêntica a uma outra enzima ou se são proteínas diferentes que catalisam a mesma reação.

Neste contexto, realizamos a caracterização cinética de proteases presentes no extrato da Fração I e II de *A. gemmatalis*, utilizando-se um substrato amida L-BAPNA e um substrato éster, L-TAME, ambos específicos de enzimas da família de serino proteases, como, por exemplo, tripsina e calicreína, com o objetivo de identificarmos a presença de serino proteases do tipo tripsina-like no extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis*.

5.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* sobre L-BApNA

A atividade dos extrato enzimáticos, Fração I e II, nos respectivos valores de pH, foi determinada a 25°C com o substrato L-BApNA. Os perfis de atividade de proteases dos extratos enzimáticos da Fração I (Figura 10A) e Fração II (Figura 10B) mostram que ambas as frações apresentam diferentes picos de atividade em diferentes valores de pH. Estes resultados sugerem diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto, observa-se pelo perfil da figura 10A que o valor máximo de atividade obtido na Fração I, na faixa de pH utilizada, dentro das condições descritas anteriormente, foi pH 8,5.

Na figura 10B temos o perfil da Fração II do extrato enzimático. Neste gráfico, notamos dois picos mais pronunciados, um menor a pH 5,5 e o outro maior a pH 8,5, sendo este último, no mesmo valor de pH apresentado pela Fração I. Estes dados mostram que a atividade foi maior no extrato tanto para a Fração I quanto para a II (pH 8,5).

Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por LEE & ANSTEE (1995) em estudos com proteases do intestino médio de *Spodoptera littoralis*, no qual o pH em que houve maior atividade foi 8,5. MARCHETTI *et al.* (1998) analisando duas tripsinas purificadas desta mesma espécie encontraram valores de maior atividade na faixa de pH 8,0 até 10. JONHSTON *et al* (1995) em estudos *Heliothis virescens* encontraram uma atividade maior em uma faixa de pH de 10-11,0; segundo os autores, este valor alto de pH pode ser devido à existência de serino proteases distintas no extrato.

O pH do intestino médio para Lepidópteras é em torno 10-10,5 este alto valor pode ser devido à adaptação dos ancestrais de lepidópteras que se alimentavam de folhas para extrair hemiceluloses das paredes celulares das plantas (TERRA & FERREIRA, 1994). McMANUS & BURGESS (1995) estudando proteases do intestino médio de larvas de *Spodoptera littura* encontraram máxima atividade nos valores de pH na faixa de 8,0 a 11, sendo o pH ótimo de 10,5. PAULILLO *et al.* (2000) analisando endopeptidases de extrato digestivo de *Spodoptera frugiperda* encontraram valores na faixa de pH de 8,5 a 10,0 para atividade de tripsina e quimotripsina. NOVILLO *et al.* (1999) purificaram duas tripsinas (I e II) de *Sesamia nonagroides* e obtiveram uma maior atividade destas proteases sobre

BapNA na faixa de pH 9,0-10 para Try I e de 8,5 a 11 para Try II. ZHU & BAKER (1999) encontraram para *Ryzopherta dominica* (Coleoptera) maior atividade na faixa de pH de 6,5 a 9,5. Em nosso trabalho, a maior faixa de atividade encontrada tanto para a fração I quanto para a II foi pH 8,5, este valor está condizente com o descrito pela literatura.

O efeito da temperatura sobre a atividade de proteases, do extrato enzimático das Frações I e II, mostra mais de um pico de atividade em diferentes valores de temperatura estudados (Figura 10). Novamente observa-se que estes dados sugerem a presença de diferentes formas de proteases no extrato enzimático.

A figura 11A apresenta o perfil de atividade em função da temperatura para a Fração I, onde podemos observar que o maior valor de atividade foi na temperatura de 35°C. Neste perfil também temos mais um pico, de menor atividade a 25°C. Na figura 11B, onde se encontra o perfil de atividade em função da temperatura da Fração II, é possível observarmos três picos mais evidentes a 35°C, 50°C e 60°C, sendo o de maior atividade a 50°C. Desta forma podemos observar que a temperatura ótima para a fração I foi a 35°C e para a fração II foi a 50°C. BERNADI *et al.* (1996) em estudos com tripsina purificada de *Ostrinia nubilalis* encontraram uma temperatura ótima de 53°C. Valores entre 50°C e 60°C também foram encontrados por LEE & ANSTEE (1995) em estudos das endoproteases do intestino médio de *Spodoptera littoralis*. Nossos valores de temperatura para Fração II estão condizentes com o encontrado por estes autores. MARCHETTI *et al.* (1998) encontraram para tripsina purificada de intestino de *S. littoralis* um máximo de atividade na temperatura de 30°C, o que se assemelha ao encontrado em nosso trabalho para a Fração I.

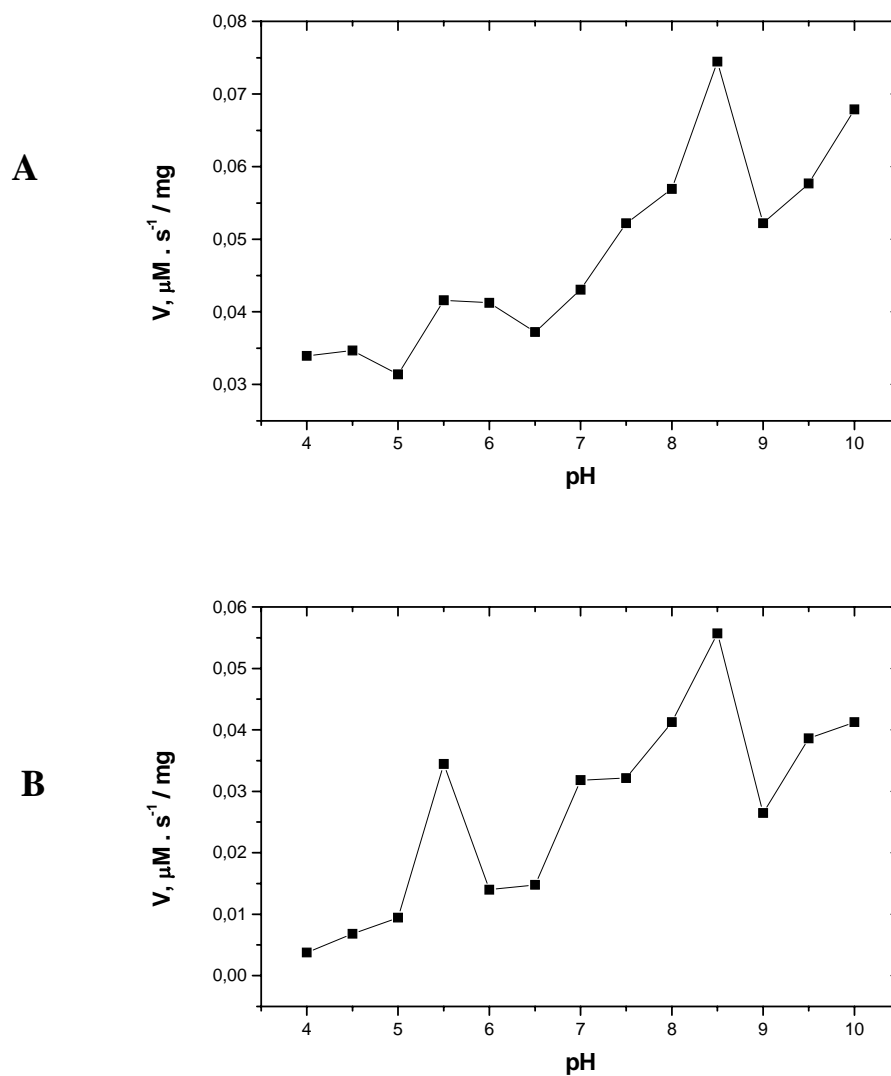


Figura 10: Efeito do pH sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito do pH sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito do pH sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

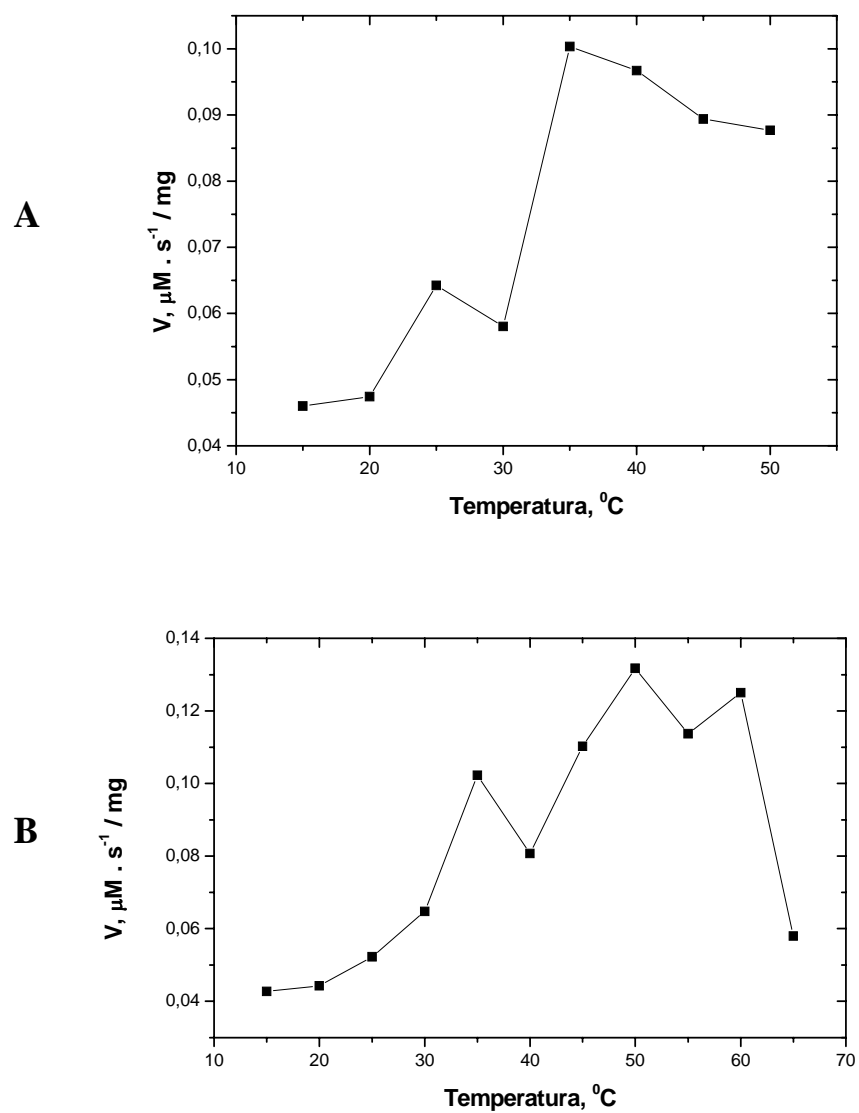


Figura 11: Efeito da temperatura sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da temperatura sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da temperatura sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.5.2. Determinação das constantes cinéticas de proteases de *A. gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA

Os parâmetros cinéticos de proteases presentes nos extratos enzimáticos das Frações I e II foram obtidos utilizando as concentrações de substrato de 0,075 a 1,2 mM para a Fração I e de 0,075 a 0,6mM para Fração II, a 35°C, em pH 8,5. Observa-se que as proteases dos extratos enzimáticos de ambas as frações, ou seja, Fração I (Figura12) e Fração II (Figura 13) apresentam curvas hiperbólicas seguindo modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentrações de substrato analisadas.

As constantes cinéticas $K_{M\ app}$ e $V_{max\ app}$ foram obtidas através de regressão não-linear, no estado estacionário, utilizando-se a equação de Michaelis–Menten. Na figura 12 e 13, temos o perfil da atividade enzimática da Fração I e II, respectivamente, sobre o substrato L-BApNA, apresentando o gráfico de Michaelis-Menten e na inserção gráfico de Lineweaver-Burk, para as concentrações utilizadas. Em ambas Frações I e II, o perfil de atividade enzimática segue a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada, uma vez que seus gráficos de atividade são curvas hiperbólicas.

Os valores de $K_{M\ app}$ e de $V_{max\ app}$ estão apresentados no Quadro I. O valor de $K_{M\ app}$ de proteases da Fração I foi 0,32 mM sendo ligeiramente maior do que o da Fração II que foi de 0,23 mM. Estes dados sugerem uma adaptação ligeiramente melhor do L-BApNA ao centro ativo de proteases da Fração II do que da Fração I. Observa-se, entretanto, que, na atividade amidásica, a etapa determinante da velocidade da reação é a etapa de acilação com formação de acil-enzima.

Estes valores estão semelhantes com os dados da literatura já mostrados para Lepidópteras, utilizando como substrato L-BApNA. JOHNSTON *et al.* (1991) encontraram para endoproteases de *Helicoverpa armigera* um valor de $K_{M\ app}$ de 0,257 mM, semelhante aos resultados deste trabalho. LEE & ANSTEE (1995) também encontraram para tripsina-like caracterizada do intestino médio de *S. littoralis* um $K_{M\ app}$ de 0,257 mM. NOVILLO *et al* (1999) encontraram valores K_{M} para duas tripsinas-like (I e II) purificadas e caracterizadas de *Sesamia nonagroides*, de 0,22 mM e de 0,17 mM. BERNADI *et al* (1996)

purificaram uma tripsina de *Ostrinia nubilalis* e obtiveram um K_M de 0,41 mM (Quadro II). LAM et al. (2000) purificaram e caracterizaram duas tripsinas de *Locusta migratória* (Orthoptera), os valores de K_M encontrado para Try I e Try IIA foi de 0,47 mM e 0,26 mM, respectivamente. Em estudos com duas tripsinas semipurificadas obtida de intestino de *Chrysomia bezziana* (Diptera), MUHARSINI et al. (2001) encontraram um $K_{M\text{ app}}$ de 0,58 mM e 0,66 mM para duas tripsinas.

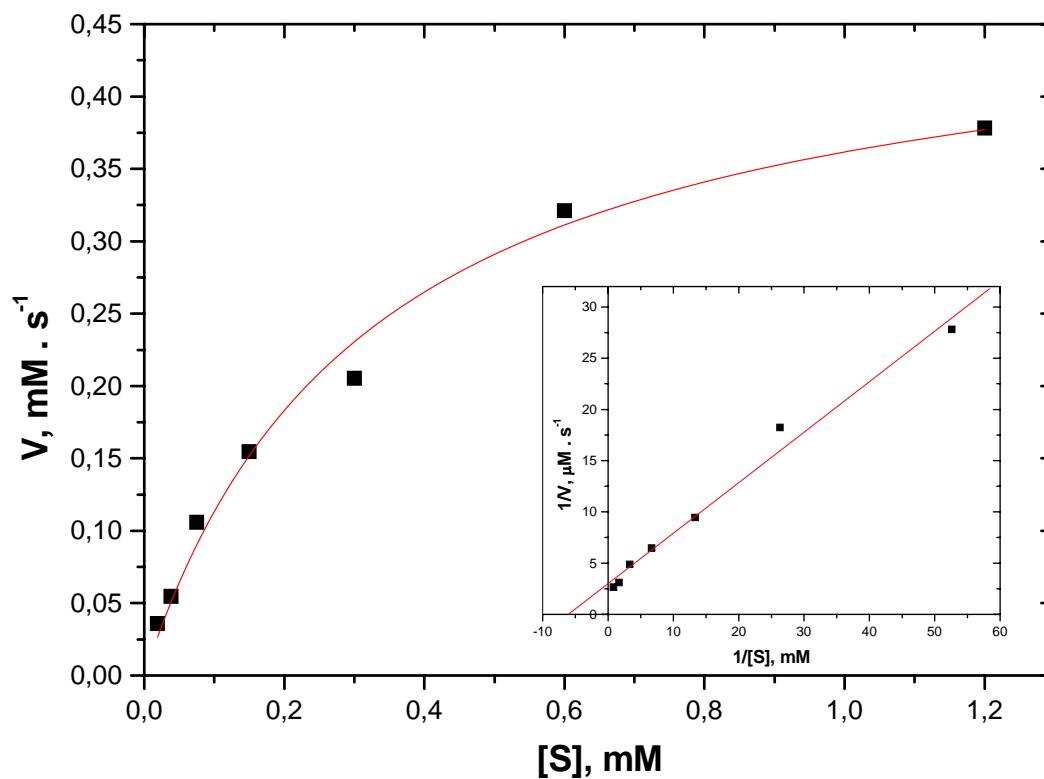


Figura 12: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração I, do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

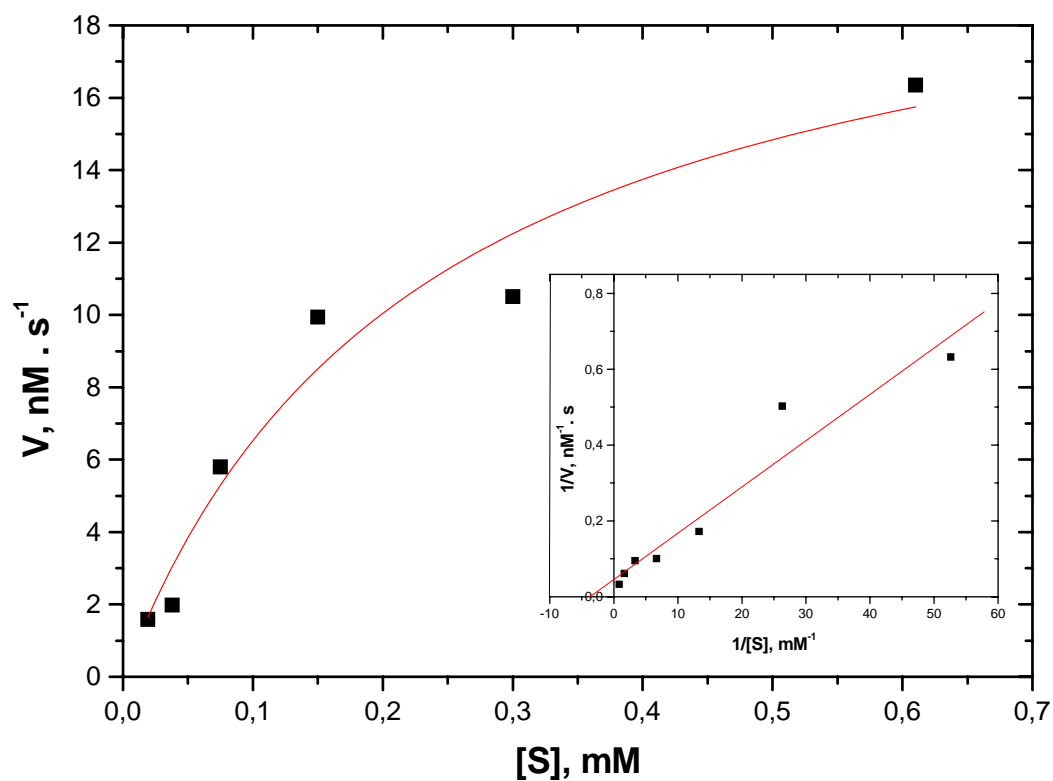


Figura 13: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração II, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M\text{app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

5.5.3. Efeito de pH e temperatura na atividade esterásica de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* sobre o L-TAME.

A atividade específica de proteases de *A. gemmatalis* das Frações I e II, em diferentes valores de pH sobre L-TAME, está apresentada na figura 14. Observa-se pelo perfil da figura 14-A que o maior pico de atividade obtido na Fração I, foi pH 8,0. Neste perfil, podemos notar um pico entre pH 4-5,0 que pode ter ocorrido devido a influência do sistema de tampão nestes valores pH na estabilidade do substrato esterásico utilizado. Na figura 14-B, temos o perfil da Fração II do extrato enzimático de proteases de *A. gemmatalis*. Este gráfico apresenta a existência de um único pico a pH 8,0. Observa-se por estes dados que o pH ótimo de atividade de proteases de *A. gemmatalis* presentes no extrato da Fração I e II é 8,0.

Este mesmo valor de pH ótimo foi verificado em estudos realizados com proteases de outras espécies de Lepidópteras. BROADWAY (1989) determinou atividade de proteases tripsina-like no extrato enzimático de *Pieris rapae* e também obteve maior valor de atividade a pH 8,0 (Quadro II). LEE & ANSTEE (1995) analisando atividade de proteases em extrato enzimático de *Spodoptera littoralis* sobre o L-TAME observaram também pH ótimo 8,0 (Quadro II).

A figura 15 apresenta o perfil de atividade esterásica de proteases de *A. gemmatalis* em diferentes temperaturas sobre a atividade de proteases das Frações I e II. Na figura 15^A, temos o perfil para a Fração I onde podemos observar que o maior valor de atividade foi na temperatura de 30°C, caindo pouco a 35°C e 40°C. Na figura 15B, observa-se um pico mais evidente a 50°C e um ombro a 40°C com atividade menor para a Fração II. Desta forma, verificamos que a temperatura ótima para a fração I foi 30°C e para a II 50°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade de protease presentes em extrato de *Spodoptera littoralis* foi analisados por LEE & ANSTEE (1995). Estes autores encontraram picos de atividade a 50°C, semelhante ao obtido na Fração II e a 60°C.

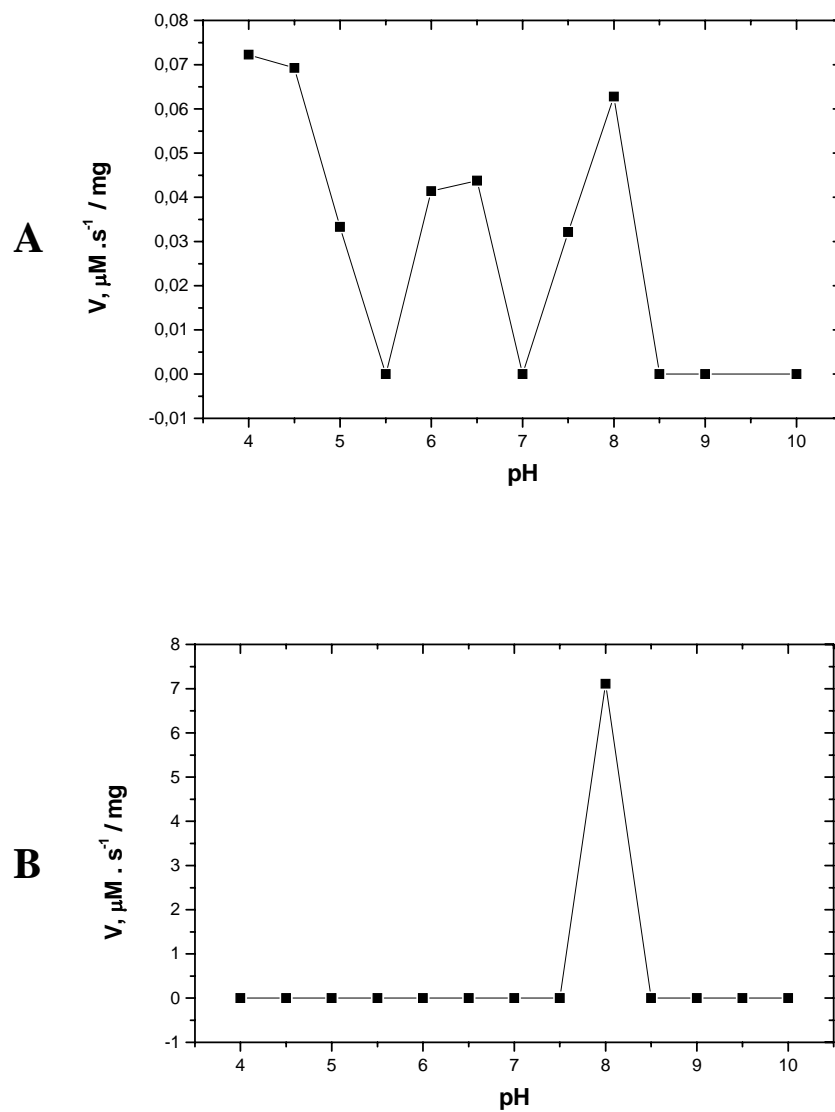


Figura 14: Efeito do pH sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A** – Efeito do pH sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre o L-TAME. **B** – Efeito do pH sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre o L-TAME.

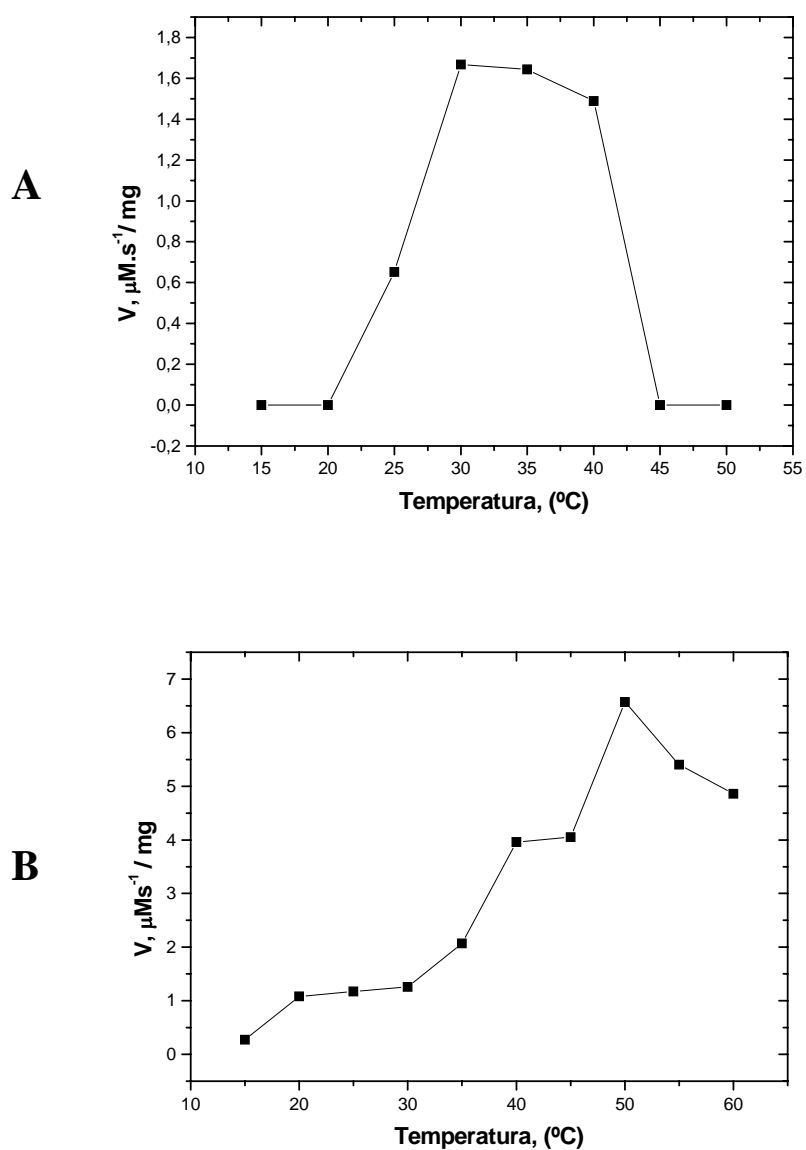


Figura 15: Efeito da temperatura sobre a atividade específica do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da temperatura sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre o L-TAME. B – Efeito da temperatura sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre o L-TAME.

5.5.4. Determinação dos parâmetros cinético de proteases de *A. gemmatalis* sobre o L-TAME

A atividade esterásica de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* também foi determinada utilizando-se L-TAME como substrato. As figuras 16 e 17 apresentam os perfis de atividade pelo gráfico de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk, obtidos para as Frações I e II, respectivamente. A atividade esterásica seguiu cinética Michaeliana, apresentando curva hiperbólica, na faixa de concentração de substrato analisada, em ambas as Frações I e II.

Os parâmetros cinéticos $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$ estão apresentados no Quadro I. A Fração I apresentou $K_{M \text{ app}}$ com valor de 52,5 μM , enquanto para a Fração II este valor foi maior, ou seja, 95,4 μM . Estes dados sugerem uma melhor adaptação do L-TAME ao centro ativo de serino proteases presentes na Fração I do que na Fração II.

LEE & ANSTEE (1995) determinaram parâmetros cinéticos de proteases presentes em extrato de *Spodoptera littoralis* sobre o substrato L-TAME e observaram $K_{M \text{ app}}$ 59 μM . Este valor é semelhante ao obtido na Fração I do extrato enzimático de *A. gemmatalis*.

Quando comparamos os valores de $K_{M \text{ app}}$ obtidos entre o substrato amida, L-BApNA, com aqueles obtidos para o substrato esterásico, L-TAME (Quadro I), observa-se que proteases presentes na Fração I e na II possuem maior afinidade pelo substrato L-TAME do que pelo L-BApNA, uma vez que o $K_{M \text{ app}}$ para L-BApNA foi em torno de 10^{-3} M, enquanto o $K_{M \text{ app}}$ para o L-TAME foi em torno de 10^{-6} M.

Assim, esta maior eficiência do “binding” enzima-substrato (L-TAME), substrato éster, pode estar relacionada ao mecanismo da reação catalisada por serino proteases. Estas, durante a atividade amidásica apresentam a etapa de acilação, com formação de acil-enzima, lenta e a etapa de deacilação, com formação de produto, rápida. Por outro lado, durante a atividade esterásica, a etapa de acilação é rápida e a deacilação é lenta. Portanto, a etapa determinante da velocidade da reação de hidrólise de substratos amidas por enzimas tripsina-like é a etapa de acilação com formação de acil-enzima, enquanto que a etapa

determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a desacilação, com conseqüente formação de produto (INAGAMI, 1971; FASTREZ & FERSHT, 1973).

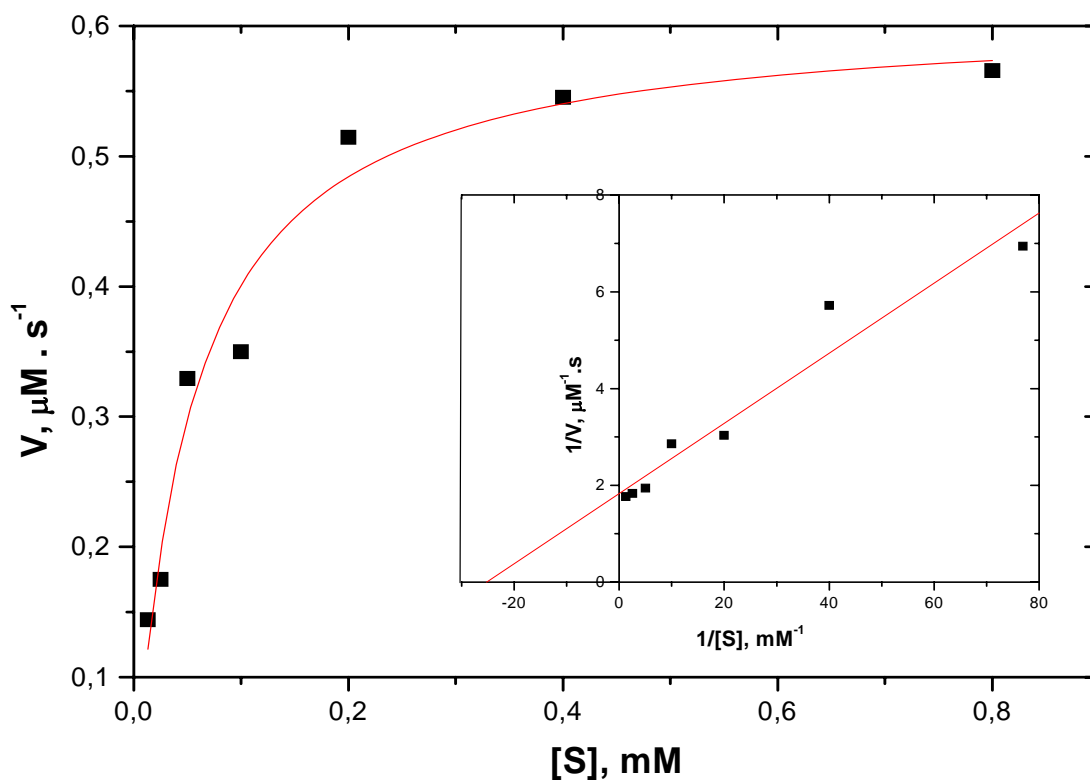


Figura 16: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração I, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

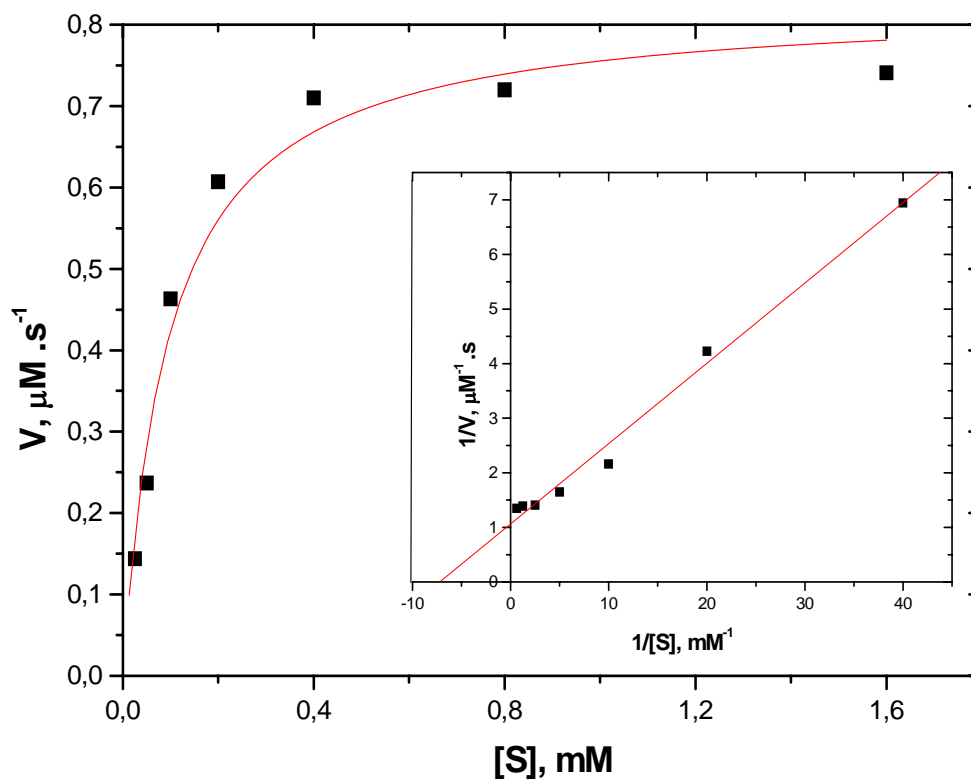


Figura 17: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases, da Fração II, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

Quadro I: Propriedades cinéticas de proteases do intestino médio *A. gemmatalis*.

Extrato	substrato	K_M app*	V_{max} app*
Fração I	L-BApNA	0,32 mM #	0,48 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
	L-TAME	52,5 μM	0,61 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
Fração II	L-BApNA	0,23 mM	21,8 $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$
	L-TAME	95,4 μM	0,82 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$

* Os parâmetros cinéticos foram determinados, no estado estacionário, através de regressão não linear, utilizando para análise dos resultados o programa de computação Enzifitter (LEATHERBARROW, 1987).

Todos os valores foram obtidos a partir de uma série de três repetições para cada experimento realizado.

Quadro II: Propriedades da atividade enzimática do intestino médio de Lepidópteras:

Espécie	Substrato	pH ótimo	K_{M app}	V_{max app}	Referências	
<i>Spodoptera littoralis</i>	L-BApNA	8,5	0,257 mM	0,31 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$	LEE & ANSTEE, 1995.	
	L-TAME	8,0	59 μM	4,81 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$		
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Fração I)	L-BApNA	8,5	0,32 mM	0,48 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	Presente trabalho.	
	L-TAME	8,5	52,5 μM	0,61 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$		
	(Fração II)	L-BAPNA	8,0	0,23 mM	21,8 nM. s^{-1}	Presente trabalho.
		L-TAME	8,0	95,4 μM	0,82 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	
<i>Pieris rapae</i>	L-TAME	8,0	-	-	BROADWAY, 1989.	
<i>Helicoverpa armigera</i>	L-BApNA	10,0	0,257 mM	-	JONHSTON <i>et al</i> , 1991.	
<i>Spodoptera litura</i>	L-BApNA	10,5	-	-	McMANUS & BURGESS, 1995.	

5.6. Efeito de modificadores químicos na atividade de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

5.6.1. Efeito de EDTA

As figuras 18 A e B apresentam o efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e quelante de íons Ca^{+2} , na atividade das Fração I e II, respectivamente, sobre o L-BAPNA. Na Fração I, ocorreu queda na atividade após 75mM de EDTA na mistura de reação, enquanto que, na Fração II, ocorreu decréscimo nos valores de atividades com o aumento da concentração de EDTA. Como a atividade foi determinada em presença de 20mM de íons cálcio na mistura de reação, possivelmente o EDTA, agente quelante de cálcio, agiu seqüestrando estes íons.

De acordo com a figura 9, a atividade de enzimas presentes nas Frações I e II aumentou em presença de 20mM de CaCl_2 . Vários autores têm mostrado que serino proteases possuem sítios de ligação para cálcio, o que acarreta mudança conformacional da enzima com conseqüente otimização no posicionamento do centro ativo (SIPOS & MERKEL, 1970; VAJDA & GARAI, 1981).

Assim, nossos dados sugerem que íons cálcio estejam se ligando a resíduos de aminoácidos da estrutura da enzima, os quais estão sendo seqüestrados por EDTA causando conseqüente diminuição de sua atividade catalítica. Estes dados novamente suportam a hipótese de que proteases de *A. gemmatalis* apresentam maior eficiência de hidrólise em presença de íons cálcio, conforme já havia sido demonstrado anteriormente (Figura 9).

LEE & ANSTEE (1995) estudando atividade de proteases em extrato de larvas de *Spodoptera Littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e WAGNER *et al.* (2002) em estudos com extrato de intestinos de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidae) sobre o efeito de íons cálcio na atividade de tripsina em presença de EGTA e/ou EDTA, demonstraram que esta enzima sofreu pequena diminuição da atividade (5%), o que levou a estes autores sugerirem que o cálcio possa ter uma função nas enzimas destes insetos.

Estes dados sugerem que proteases de *A. gemmatalis*, no presente trabalho, possuem sítios de ligação para o íon cálcio como já verificado em outras enzimas tripsina-like, nas quais este íon atua como co-fator enzimático.

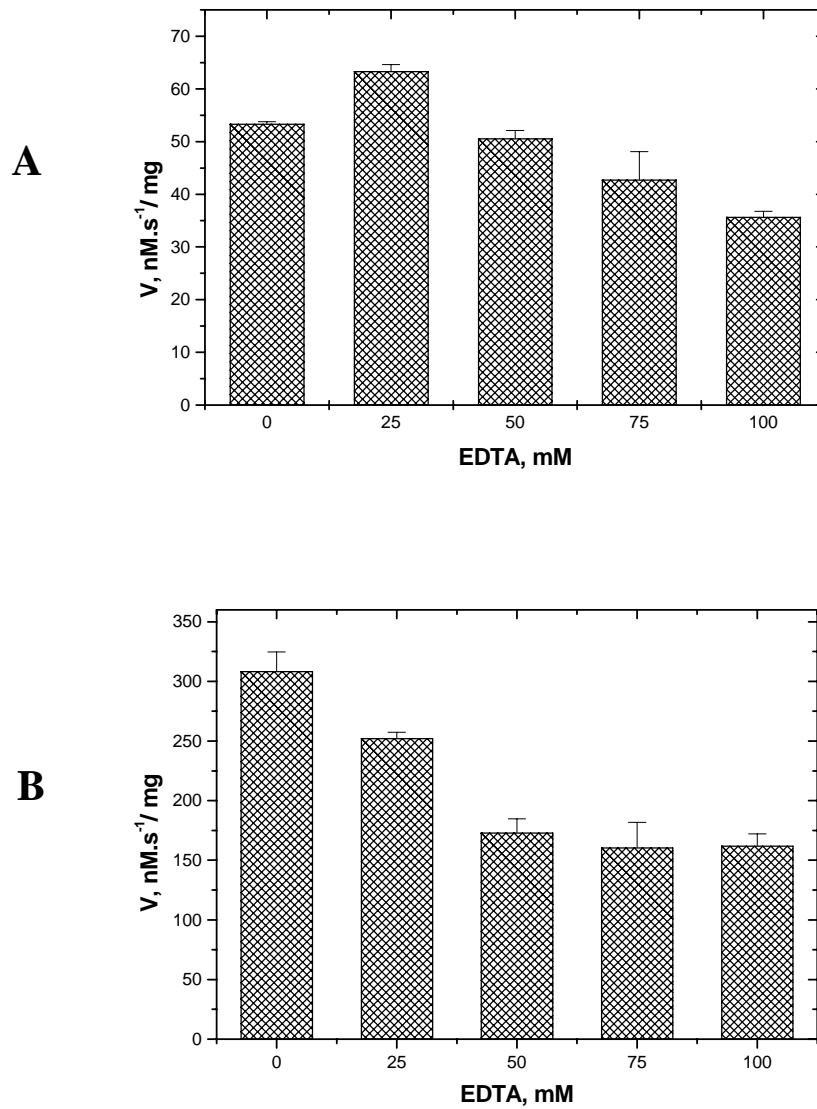


Figura 18: Efeito de EDTA sobre a atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade específica da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade específica da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.6.2. Efeito de PMSF

Nossos dados sugerem a presença de serino proteases no extrato enzimático de *A. gemmatalis* tanto na fração solúvel, Fração I, quanto na insolúvel, Fração II, uma vez que ocorreu queda na atividade quando determinada em presença de um inibidor competitivo (PMSF) de serino protease. O PMSF é um clássico inibidor competitivo de enzimas da classe das serino proteases. O seu efeito sobre a atividade de proteases de *A. gemmatalis* apresentado na figura 19 mostrou que tanto na Fração I quanto na Fração II ocorreu uma diminuição na atividade frente ao substrato L-BApNA, em concentração de PMSF superior a 400 μ M.

As serino proteases são as enzimas mais estudadas; nossos dados estão condizentes com os encontrados, na literatura, para experimentos que também utilizaram o PMSF na caracterização de serino proteases de vários insetos. BENARDI *et al.* (1996) em estudos com uma tripsina purificada de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera), ZHU & BAKER (1999) em estudos com *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera) e LAM *et al.* (2000) com *Locusta migratoria* (Orthoptera) demonstraram que a tripsina sofria uma forte inibição quando avaliada a atividade com o substrato BApNA e o inibidor PMSF. O mesmo foi encontrado para estudos com *Lymantria díspar* (Lepidoptera), nos quais foi observado 95% de inibição, da enzima purificada, com a utilização de 1mM de PMSF (VALAITIS *et al.*, 1995).

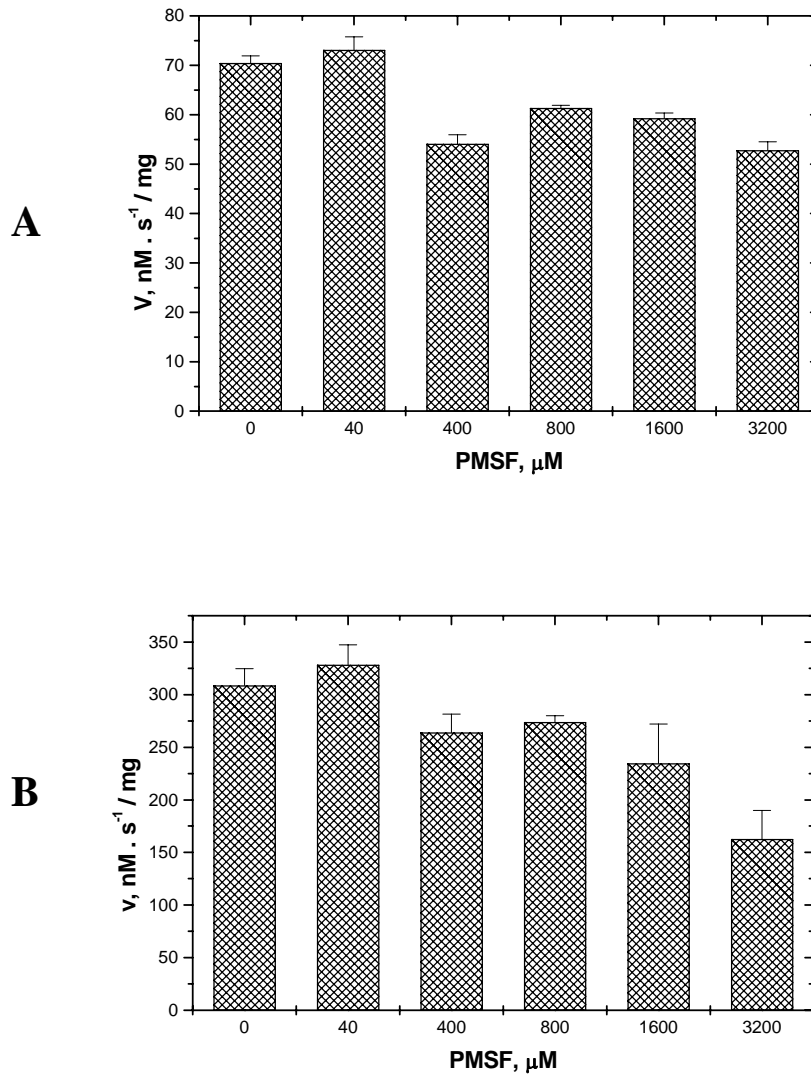


Figura 19: Efeito de PMSF na atividade específica de proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de PMSF sobre a atividade específica de proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de PMSF sobre a atividade específica de proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.6.3. Efeito de TLCK

Quando analisamos o efeito de TLCK sobre a atividade de proteases de *A. gemmatalis*, observamos que tanto a Fração I (Figura 20-A) quanto a Fração II (Figura 20-B) apresentaram diminuição crescente nos valores de atividade sobre L-BApNA, substrato amidásico específico de tripsina, com o aumento da concentração de TLCK. Este substrato sintético L-BApNA possui uma ligação amida que é análoga à ligação peptídica existente nas proteínas. O TLCK é uma cetona que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina exercendo, assim, efeito de inibidor irreversível sobre a enzima (SHAW *et al.*, 1965).

Em estudos com enzimas tripsina-like de *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) (GATEHOUSE *et al.*, 1999), *R. dominica* (ZHU & BAKER, 1999), *L. migratoria* (LAM *et al.*, 2000), *S. nonagroides* (NOVILLO *et al.*, 1999), *O. nubilalis* (BERNADI, *et al.*, 1996), *L. dispar* (VALAITIS *et al.*, 1995), os autores demonstraram que estas proteases, quando analisadas utilizando como substrato o L-BapNA e na presença do inibidor TLCK, tiveram suas atividades fortemente inibidas.

Assim, de acordo com o relatado da literatura, nossos resultados sugerem que proteases presentes nas Frações I e II contêm enzimas tripsina-like e que estas possivelmente estejam sofrendo alquilação de resíduos de histidina da tríade catalítica de seus centros ativos causando conseqüente diminuição da atividade amidásica sobre o L-BApNA.

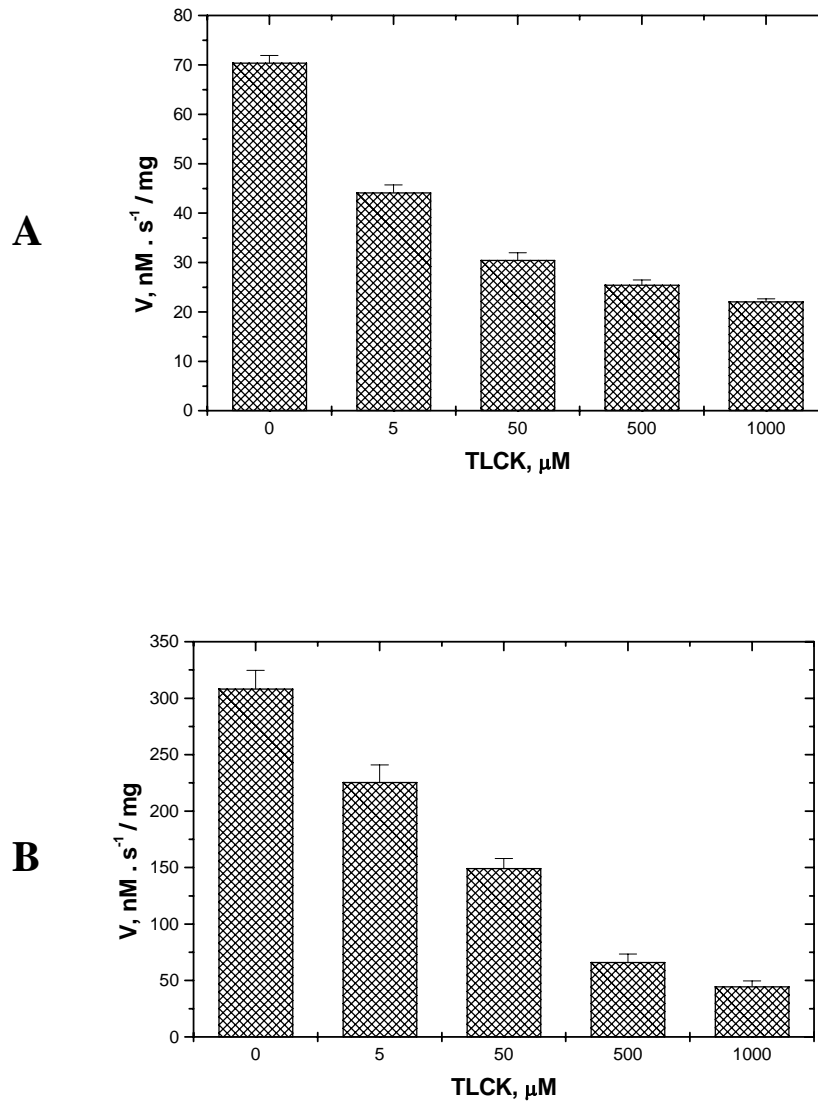


Figura 20: Efeito de TLCK na atividade específica de proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de TLCK sobre a atividade específica de proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da concentração de TLCK sobre a atividade específica proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.6.4. Efeito de Aprotinina

Quando analisamos o efeito de aprotinina na atividade de proteases de *A. gemmatalis* sobre o L-BApNA, verificamos que em concentrações mais elevadas, ou seja, acima de 1,92 μM , resultou em queda da atividade de enzimas da Fração I (Figura 21A) e da Fração II (Figura 21B).

A aprotinina é um peptídeo inibidor natural de serino protease, originário de órgãos internos bovinos, como pâncreas, pulmão e glândulas parótidas, apresentando massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa. Atua como inibidor competitivo de serino proteases.

Nossos dados, novamente, sugerem a presença de enzimas tripsina-like no extrato enzimático de *A. gemmatalis* tanto da fração solúvel, Fração I, quanto da insolúvel, Fração II, uma vez que em presença de um inibidor competitivo protéico de serino protease, ocorreu queda na atividade de proteases presentes no extrato de *A. gemmatalis*. Este resultado também está de acordo com o encontrado na literatura para tripsina-like de *O. nubilalis* que sofreu inibição em experimentos utilizando o substrato L-BapNA e o inibidor aprotinina (BERNADI *et al.*, 1996) e com o encontrado para duas tripsina-like (P_I e P_{II}) purificadas de *S. littoralis*, tanto P_I quanto P_{II} foram fortemente inibidas por aprotinina na concentração de 10 μM (MARCHETTI *et al.*, 1998).

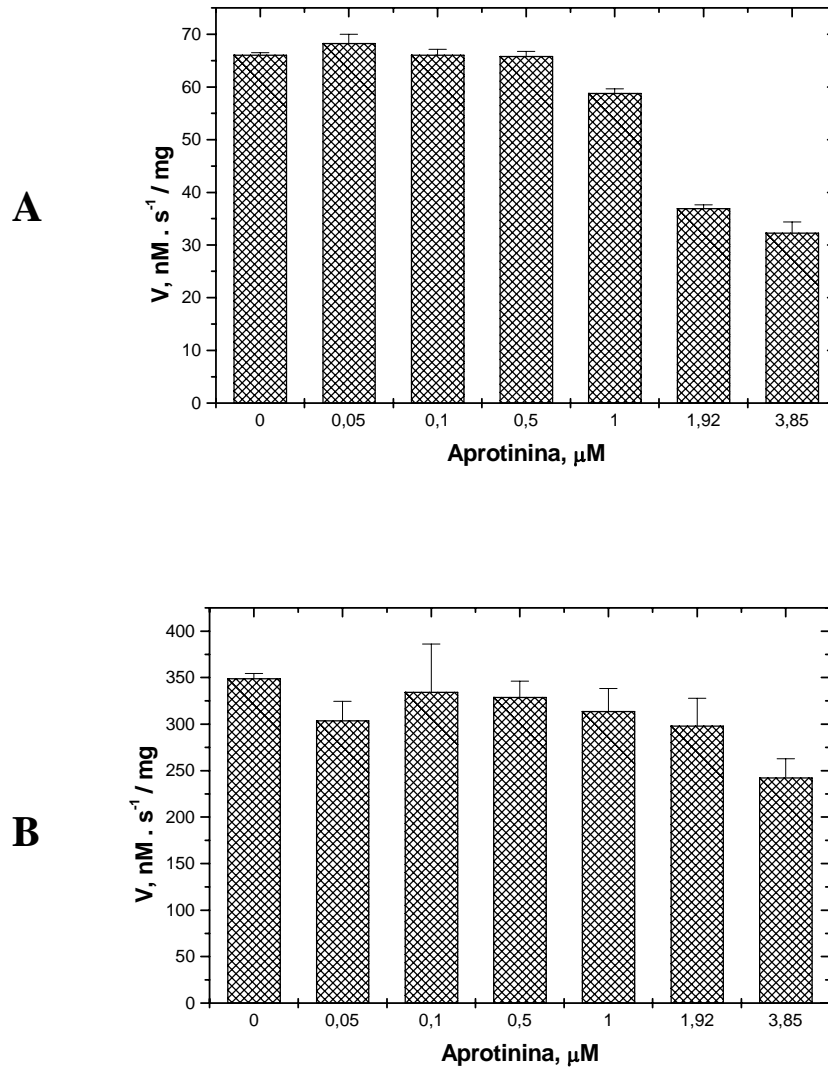


Figura 21: Efeito de aprotinina na atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de aprotinina sobre a atividade específica de proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da concentração de aprotinina sobre a atividade específica de proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

5.6.5. Efeito de Benzamidina

A benzamidina é uma amidina aromática, inibidor sintético competitivo de tripsina, apresentando K_i de 1,0 mM (MARES-GUIA *et al.*, 1981). A Benzamidina, quando presente no meio de reação em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S_1 , da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e, por interação eletrostática, entre seu grupamento amidina e entre um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico presente na porção do fundo do bolso do sítio S_1 (MARES-GUIA *et al.*, 1981, OLIVEIRA *et al.*, 1993).

A figura 22 apresenta o perfil do efeito da benzamidina sobre a atividade de proteases do extrato intestinal de *A. gemmatalis*. Observa-se que ocorreu uma pronunciada diminuição da atividade de enzimas presentes tanto na Fração I (Figura 22-A) quanto na Fração II (Figura 22-B) sobre o L-BApNA, a partir de 100mM de Benzamidina na mistura de reação.

Em estudos com serino proteases de *L. migratoria* (LAM *et al.*, 2000), *R. dominica* (ZHU & BAKER, 1999), duas trpsina-like purificadas de *S. nonagroides* (NOVILLO *et al.*, 1999) e com *O. nubilalis* (BERNADI *et al.*, 1996) foi verificado, por estes autores, que estas proteases sofreram forte inibição quando utilizado o inibidor benzamidina e o mesmo substrato L-BapNA, confirmando ser estas proteases tripsina-like.

Com base em nossos dados e de acordo com o encontrado na literatura, podemos sugerir existência de enzimas tripsina-like no extrato do intestino de *A. gemmatalis* tanto na Fração I quanto na Fração II, uma vez que ocorreu queda na hidrólise do substrato L-BApNA em presença do inibidor competitivo de tripsina, a benzamidina.

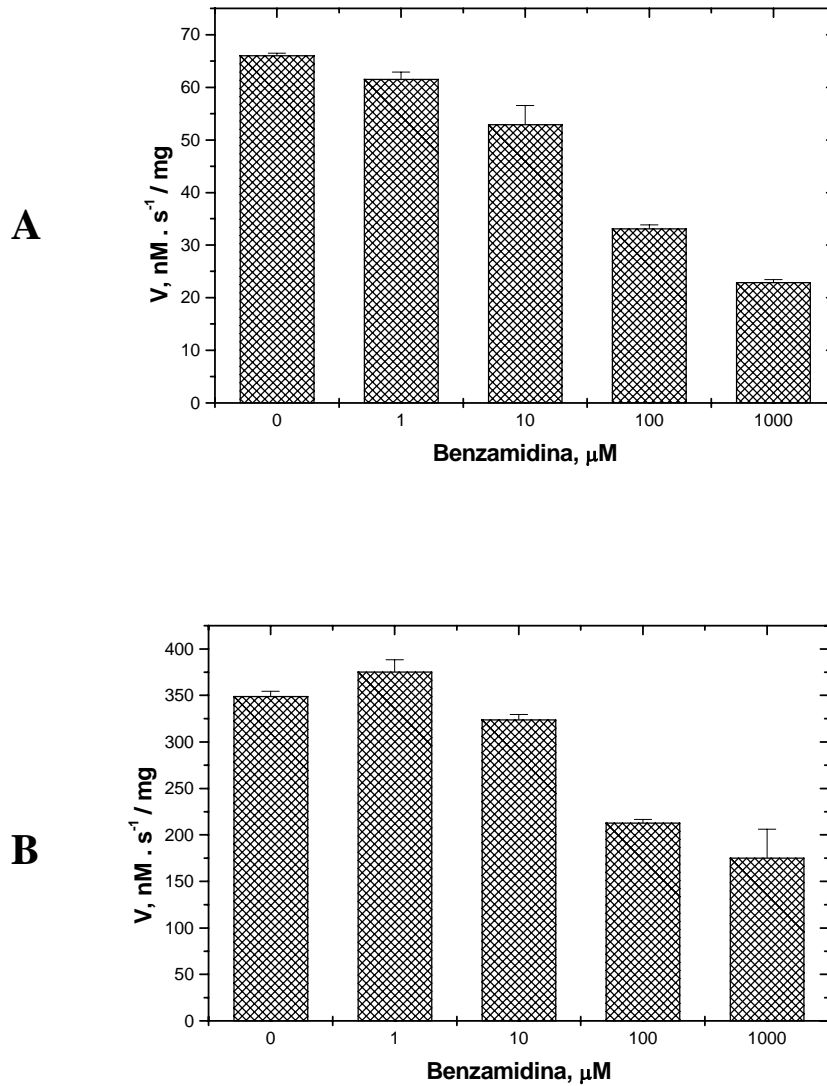


Figura 22: Efeito de benzamidina na atividade específica do extrato enzimático do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de benzamidina sobre a atividade específica de proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito da concentração de benzamidina sobre a atividade específica de proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

FARMER & RYAN (1992), trabalhando com tomate, propuseram um modelo no qual plantas atacadas por insetos ou patógenos respondem a este estresse biótico através do aumento de produção de inibidores de proteases, pela Via das Lipoxigenases.

Em nosso laboratório, realizamos estudos envolvendo a caracterização bioquímica e fisiológica do mecanismo de resposta de plantas de soja ao ataque de *A. gemmatalis*. Quando realizamos os experimentos de inibição enzimática, enzima tripsina e substrato L-BApNA, observamos que ocorreu resposta local e sistêmica da planta de soja, através do aumento significativo da produção de inibidores de proteases pela planta (SILVA *et al.*, 2002 e FORTUNATO, 2001).

No presente trabalho, realizamos caracterização bioquímica e cinética do extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis* da fração solúvel, Fração I, e da Fração insolúvel, Fração II. As enzimas presentes em ambas as frações apresentaram atividade proteásica sobre caseína, substrato protéico, atividade amidásica sobre o L-BApNA, substrato amida e atividade esterásica sobre o L-TAME, substrato éster. Como enzimas da família de serino proteases apresentam especificidade para estes mesmos substratos, nossos resultados mostraram que o extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis* contém enzimas proteolíticas tripsina-like.

Quando determinamos o efeito de inibidores clássicos de serino proteases na atividade enzimática das Frações I e II, ocorreu queda na hidrólise do L- BApNA, substrato específico de tripsina, em ambas as frações. Estes resultados mostram que existem enzimas proteolíticas nas Frações I e II que sofrem inibição por inibidores de serino proteases.

Assim, os resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de serino proteases sobre a atividade de enzimas da Fração I e II mostram que tanto o extrato enzimático fração solúvel quanto da fração insolúvel, de intestino médio de *A. gemmatalis* contém enzimas da família de serino proteases.

Desta forma, é possível que os inibidores de proteases produzidos por plantas durante o ataque de insetos-praga, conforme verificado por FARMER & RYAN (1992), FORTUNATO (2001) e SILVA *et al.* (2002), estejam inibindo proteases intestinais do inseto, o que provavelmente comprometerá sua fisiologia, levando-o à morte.

Entretanto, para melhor esclarecer esta hipótese é necessário o conhecimento de todo o sistema de proteases do inseto, o que permitirá inferir que tipo de inibidores a planta produz em resposta ao ataque de pragas. A realização destes estudos requer a purificação da(s) enzima(s) de insetos, sua caracterização química-estrutural e cinética com subsequente envolvimento da síntese e uso de peptídeos inibidores. Assim, através da caracterização de todos os parâmetros cinético-enzimáticos das proteases do inseto poderá propor-se que tipos de substâncias inibidoras devem ser induzidos na resposta de defesa da planta.

Portanto, nossos resultados mostram que um mecanismo promissor de controle de pragas agrícolas que evita o uso de agrotóxico, os quais causam sérios danos à natureza e ao homem, poderá vir a ser a pulverização das culturas com peptídeos potentes inibidores de proteases de insetos ou a introdução de genes que expressam potentes inibidores de proteases em plantas tornando-as resistentes a insetos –praga.

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, realizamos caracterização bioquímica e cinética do extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis* da fração solúvel, Fração I e da fração insolúvel, Fração II. Através do experimento com gel substrato-SDS-PAGE, foi possível de se determinar que as proteínas com faixa de massa molecular acima de 60kDa são proteases encontradas tanto na Fração I quanto na Fração II. Abaixo dessa faixa são outros tipos de proteínas extraídas e presentes nas Frações I e II que não possuem atividade proteolítica, pois notamos suas presença no SDS-PAGE e não no gel de substrato-SDS-PAGE.

Na análise do efeito de íons cálcio na atividade proteolítica sobre o substrato L-BapNA, observou-se que a atividade de enzimas presentes nas Frações I e II aumentou em presença de 20mM de CaCl_2 . Com relação ao efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e quelante de íons Ca^{+2} , na Fração I verificou-se uma maior diminuição na atividade com a concentração de 75mM de EDTA na mistura de reação, enquanto na Fração II ocorreu decréscimo nos valores de atividades a partir da concentração de 50mM de EDTA.

Quando determinamos o efeito de inibidores clássicos de serino proteases, PMSF, TLCK, benzamidina e aprotinina, na atividade enzimática das Frações I e II, foi possível verificar-se queda na hidrólise do L- BApNA, substrato específico de tripsina, em ambas as frações. Desta forma, estes resultados mostram que existem enzimas proteolíticas nas Frações I e II que sofrem inibição por inibidores de serino proteases.

A atividade proteolítica das enzimas presentes em ambas as frações apresentou atividade proteásica sobre caseína, substrato protéico, atividade amidásica sobre o L-BApNA, substrato amida e atividade esterásica sobre o L-TAME, substrato éster. Como enzimas da família de serino proteases apresentam especificidade para estes mesmos substratos, nossos resultados mostraram que o extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis* contém enzimas proteolíticas tripsina-like.

O pH no qual foi possível se detectar maior atividade, utilizando o substrato L-BApNA, foi a 8,5 para ambas Frações. O efeito da temperatura foi testado com o mesmo substrato sendo que a Fração I mostrou uma maior atividade à 35⁰C e a Fração II a 50⁰C. O pH no qual se obteve maior atividade para Fração I e II com substrato L-

TAME foi 8,0. O efeito da temperatura na atividade testado com L-TAME para a Fração I se detectou uma maior atividade a 30⁰C e para a Fração II a 50⁰C.

Os valores de K_{Mapp} obtidos utilizando L-BApNA foram de 0,32 mM para a Fração I e de 0,23 mM para a fração II e com substrato L-TAME de 52,5 μ M para a Fração I e de 95,4 μ M para a Fração II.

Assim, os resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de serino proteases sobre a atividade de enzimas da Fração I e II mostram que, tanto o extrato enzimático da fração solúvel quanto da fração insolúvel, de intestino médio de *A. gemmatalis* contêm enzimas da família de serino proteases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.R.; MARZOCHI, M.C.A.; GIOVANNI DE SIMONE, S. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmaniam major*. **Brazilian of Journal Medical and Biological Research**. 26: 167-171, 1993.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**. 71: 441-451, 1981.
- BARBARA, K.A. "Featured Creatures – Velvetbean Caterpillar". University of Florida. Number: EENY-151. September 2000. <http://creatures.ifas.edu/field/velvetbean.Htm> Acesso em outubro de 2001.
- BARILLAS, C.V.; NORIEGA, F.G., WELLS, M.A. Early trypsin activity is part of signal transduction system that activate transcription of the ate trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect of Biochemistry and Molecular Biology**. 25(2): 241-246, 1995.
- BATE, N.J.; SIVASANKAR, S.; MOXON, C.; RILEY, J.M.C.; THOMPSON, J.E.; ROTHSTEIN, S.J. Molecular characterization of on Arabidopsis gene encoding hidroperoxidase lyase, a cytochrome p450 that is wounding-inducible. **Plant Physiology**. 117:1393-1400, 1998.
- BEACH, R.M. & TODD, J.W. Foliage consumption and developmental parameters of the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) reared on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**. 81: 310-316, 1988.
- BELL, E., MULLET, J.E. Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. **Mol. Gen. Genet**. 230: 456-462, 1991.
- BERNADI, R.; TEDESCHI, G.; RONCHI, S.; PALMIERI, S. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like from larvae of european corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Insect of Biochemistry and Molecular Biology**. 25: 883-889, 1996.

- BODE, W. & HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase. **European Journal of Biochemistry**. 204: 433-451, 1992.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa – Minas Gerais, editora UFV.487-533, 1999.
- 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, 1976.
- BROADWAY, R.M. Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**. 21: 1597-1604, 1989.
- BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**. 41(2): 107-116, 1995.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**. 32(10): 827-833, 1986.
- CARTER, P. & WELLS, J.A. Dissecting the catalytic triad of serine protease. **Nature**. 332: 564-568.
- CHIANCONE, E., DRAKENBERG, T. TELEMAN, O. FORSEN, S. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. **Journal of Molecular Biology**. 185: 201-207, 1985.
- CONCONI, A.; MIQUEL, M.; BROWSE, J.; RYAN, C.A. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. **Plant Physiology**. 111: 797-803, 1996.
- CRAIK, C.S.; ROCZNAK, S.; LARGMAN, C.; RUTTER, W.J. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. **Science**. 237: 909-913, 1987.
- CREELMAN, R.A.; BELL, E.; MULLET, J.E. Involvement of lipoxygenase like enzyme in abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiology**. 99: 1258-1260, 1992.

- CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Reviews Plant Molecular Biology**. 48: 355-381, 1997.
- CRHISTELLER, J.T. & SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and costelytra zealandica trypsin. **Insect Biochemistry**. 19: 233-241, 1989.
- CROFT, K.P.C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. **Plant Physiology**. 101: 13-24, 1993.
- DE JERSEY, J.; LAHUER, R.S.; MARTIN, R.B. Term luminescence as a probe of the calcium binding site of trypsin and chymotrypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 205: 536-542, 1980.
- DUAN, X.; XIAOGANG, L.; QUINGZHONG, X; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**. 14: 494-498, 1996.
- ELPIDINA, E.; VINOKUROV, K.S.; GROMENKO, V.A.; RUDENSKAYA. Y.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; ZHUZHNIKOV, D.P. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 48: 206-216, 2001.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Recomendações técnicas para cultura da soja na região central do Brasil**. Londrina. 245p. 2001.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Manejo de pragas da soja**. Circular Técnica da EMBRAPA – CNPSo, 5, 44p., 1981.
- 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.
- FASTREZ, J. & FERSHT, A.R. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. **Biochemistry**. 12: 2025-2034, 1973.

- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**. 86: 1539-1542, 1990
- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**. 4: 129-134, 1992.
- FARMER, E.E.; WEBER, H. VOLLENWEIDER, S. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. **Planta**. 206: 167-174, 1998.
- FOISSAC, X.; EDWARDS, M.; DU, J.P.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparva lugens*: Delphacidae) – identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32: 967-978, 2002.
- FORTUNATO, F.S. Viçosa: Mecanismo de resposta de plantas de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatilis* pela via das lipoxigenases. UFV, 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- FRANCO, O.L.; MELO, F.R.; SILVA, M.C.M.; GROSSI de SÁ, M.F. Resistência de plantas a insetos: inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**. 11:36-40, 1999.
- GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. Biotechnology in agriculture, nº 7: Plant genetic manipulation for crop protection. **CAB International**. 155-181, 1992.
- GATEHOUSE, A.M.R.; DAVISON, G.M.; NEWELL, C.A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W.D.O.; BURGESS, E.P.J.; GILBERT, R.J.C.; GATEHOUSE, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato north, *Lacanobia oleoracea*: growth room trials. **Molecular Breed**. 31: 49-63, 1997.
- GORMAM, M.J.; ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 30: 35-46, 2000a.

- GORMAM, M.J.; ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene**. 251: 9-17, 2000b.
- GORMAM, M.J. & PASKEWITZ, S.M. Serine proteases as mediators of mosquito immune response. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 31: 257-262, 2001.
- GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E.N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme and Microbial Technology**. 18: 162-183, 1996.
- 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**. 330:160-163, 1987.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, 76: 249- 253,1989.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**. 7: 201-219, 1988.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, **EMBRAPA-CNPSO**, 10, Documentos, 23p, 1985.
- HOOPER, N.M.& TURNER, A.J. Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. **Biochemical Journal**. 250: 865-869, 1988.
- HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, e trombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37 (12): 1393-1399, 1959.
- INAGAMI, T. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K., MURACHI, T.; NARITA, K., ed. **Proteins structure and Function**. Tokio, Kodanska, 1972, p. 1-83.

- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; VISSER, B., STIEKEMA, W.J. Trypsin inhibitors activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to Insect Attack, Wounding and virus Infection. **Planta**. 195: 29-35, 1994.
- JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. 43 (10): 885-895, 1997.
- JONHSTON, K.A.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, J.H. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry**. 21:389-397, 1991.
- JORDÃO, B.P.; CAPELLA, A.N.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**. 45: 29-37, 1999.
- JOUANIN L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**. 131:1-11, 1998.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**. 51: 376-382, 1974.
- KENNEDY, A.R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology Therapeutic**. 78 (3): 167-209, 1998.
- KOSSIAKOFF, A.A.; CHAMBERS, J.L.; KAY, L.M.; STROUD, R.M. Structure of Bovine Trypsinogen at 1,9 Å Resolution. **Biochemistry**. 16 (4): 654-664, 1977.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II – General properties. **Journal of Genetics and Physiology**., 30:291-310, 1947.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-685,1970.

- LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 30: 85-94, 2000.
- LASKOWSKI, M. J. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Reviews Biochemistry**. 49: 593-626, 1980.
- LEATHERBARROW, R.J. Enziffiter manual. **Biosoft. London**, 13-42,1987.
- LEE, M.J. & ANSTEE, J.H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* includes a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 25(1): 49-61, 1995.
- LEITE, M.C. Novas fronteiras de produção e o intermodal de transporte. **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**. 51-58, 1999.
- LEMOS, F.J.A. & TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 22, 613-619, 1992.
- MACRÌ, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A. Lipoxygenase activity of plasmalemma and its relation to plant cell senescence and stress response. **Acta Phytopathology et Entomology. Hungarica**. 30: 81-87, 1995.
- MACK, A.J.; PETERMAN, T.K.; SIEDOW, J.N. Lipoxygenase isozymes in Higher plants: biochemical properties and physiological role. **Isozymes: Current Topics in Biological Research**.13: 127-154, 1987.
- MARANA, S.R.; LOPES, A.R., JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. **Biochemical and Biophysical Research**. 290: 494-497, 2002.
- MARCHETTI, S.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PITOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 28: 449-458, 1998.

- MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A.F.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. **The Journal of Biological Chemistry**. 256: 1661-1668, 1981.
- MATOS, T.G.T.; GIUGLIANO, L.G.; RIBEIRO, B.M.; BÁO, S.N. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. 28:195-201, 1999.
- McMANUS, M.T., BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**. 41 (9):731-738, 1995.
- MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae *Chrysomya bezziana*, the old Screwworm fly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 31: 1029-1040, 2001.
- NORIEGA, F.G.; WANG, X-Y, PENNINGTON, J.E., BARILLAS, C.V.; WELLS, M.A. Early trypsin a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*; isolation, aminoterminal sequence determination and cloning and sequencing of the gene. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 26(2): 119-126, 1996.
- NORIEGA, F.G. & WELLS, M.A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**. 45: 613-120, 1999.
- NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 29: 177-184, 1999.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant Cell Physiology**. 22(5): 911-918, 1986.
- OLIVEIRA, M.G.A.; ROGANA, E.; ROSA, J.C.; REINHOLD, B.B.; ANDRADE, M.H.; GREENE, L.J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. **The Journal of Biological Chemistry**. 268 (36): 26893-26903, 1993.

- PARÉ, P.W. & TUMLINSON, J.H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by Insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**. 114: 1161-1167, 1997.
- PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M. 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.
- PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**. 253: 895-898, 1991.
- PERONA, J.J. & CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**. 4: 337-360, 1995.
- PÓLGAR, L. & HALÁSZ, P. Currents problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteases. **Biochemical Journal**. 207: 1-10, 1982.
- PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.P.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 22: 41-47, 1992.
- RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62: 597-635, 1998.
- RAWLING, N.D. & BARRET, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**. 290(1): 205-218, 1993.
- REDDY, P.S., KUMAR, T.C., REDDY, M.N., SARADA, C., REDDANNA, P. Differential formation of octadecadienoic acid and octadecatrienoic acid products in control and injured/infected potato tubers. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1483: 294-300, 2000.
- REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 12: 707-719, 2000.

- REYMOND, P. & FARMER, E.E. Jasmonato and salicylate as global signals for defence gene expression. **Currents Opinions in Plant Biology**. 1: 404-411, 1998.
- RIBEIRO, B.M. & PINEDO, F.J. R. Baculovirus Recombinante para Controle de Praga- Construção de um Baculovirus *Anticarsia Gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (Agmpnv) Geneticamente Modificado para Controle da Lagarta da Soja, *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**. 22: 50-58, 2001.
- RICHTER, A.R. & J.R. FUXA. Pathogen-pathogen and pathogen-insecticide interactions in velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. 77: 1559-1564, 1984.
- ROBERTS, P. & GUILLEBEAU, P. "Velvetbean caterpillar- *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)." The University of Georgia Entomology: Georgia IPM- integrated pest management. 1999. <http://www.gaipm.org/top50/velvetbean.html>. Acesso em outubro de 2001.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. **Zoologia de invertebrados**. Sexta edição. São Paulo. Roca. p 804-840, 1996.
- RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. **Annuals Reviews Phytopathology**. 28:245-449, 1990.
- RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1477: 112-121, 2000.
- RYAN, C.A. & JANDENDORF, A. Self Defense by Plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**. 92:4075, 1995.
- SANTOS, C. D.; RIBEIRO, A.F.; TERRA W.R. Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. **Canadian Journal of Zoology**. 64:490-500, 1986.
- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, J.N. The lipoxygenase isozymes in soybean *Glicine max* (L.) Merrill] Leaves – Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiology**. 107: 535-543, 1995.

- SARAVITZ, D.M. & SIEDOW, J.N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**. 110: 287-299, 1996.
- SESSA, D.J. & WOLF, W.J. Bowman– Birk inhibitors in soybean seed coats. **Industrial Crops and Products**. 14:73– 83, 2001.
- SEKIYA, J.; KAJIWARA, T.; MUNESHIKA, K.; HATANAKA, A. Distribution of lipoxygenases and hidroperoxide lyase in the leaves of various plant species. **Phytochemistry**. 22(9): 1867-1869, 1983.
- SIEDOW, J. N. Plant Lipoxygenase: structure and function. **Annual Revision Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 42: 145-188, 1991.
- SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BATISTA, R. B.; PIRES, C. V.; XAVIER, L. P.; PIOVESAN, N. D.; OLIVEIRA, J. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Arquivos do Instituto Biológico**. 60(1): 67-74, 2002.
- SILVA-FILHO, M.C. & FALCO, M.C. Interação Planta-inseto – Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases Produzidas pelas Plantas. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**. 12: 38-42, 2000.
- SIPOS, T. & MERKEL, J. R. Temperature-dependent activation of trypsin by calcium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 31(4): 522-527, 1968.
- SIPOS, T. & MERKEL, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. **Biochemistry**. 9(14): 2766-2775, 1970.
- SIVASANKAR, S.; SHELDRIK, B.; ROTHSTEIN, S.J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiology**. 122: 1335-1342, 2000.
- SOUZA, M.L. Utilização de microrganismo na agricultura – uso de agentes microbianos na agricultura brasileira. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**. n 21, julho/ agosto 2001.

- STEPHENSON, L.C., BUNKER, T.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete sub cellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiology**. 116: 923-933, 1998.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. As pragas também morrem pela boca. **Pesquisa Fapesp**. 54: 20-27, 2000.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 109 B (1): 1-62, 1994.
- TERRA, W.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B.P.; DILLON, R.J. Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 153-186, 1996a.
- TERRA, W.; FERREIRA, BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 206-235, 1996b.
- VAJDA, T. & GARAI, A. Comparison of the effect of calcium (II) and manganese (II) ions on trypsin autolysis. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 15: 307-315, 1981.
- VALAITIS, A.P. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 25(1): 139-149, 1995.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. (Eds.) **The Biochemistry of Plants**. Orlando: Academic Press, 9: 53-97, 1987.
- XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitor in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 4(1): 1-6, 1992.
- XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Proteinase inhibitors. In: CHEEKE, P.R. (ed). **Toxicants of Plant Origin**. Boca Raton, CCR Press. v. 3, p 1-27, 1989.

- WAGNER, W.; MÖHRLLEN, 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 (7): 803-814, 2002.
- WAN, X.S.; WARE, J.H.; ZHANG, L.; NEWBERNE, P.M.; EVANS, S.M.; CLARK, L.C.; KENNEDY, A.R. Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. **Prostate**. 41(4): 243-252, 1999.
- WANG, C., ZIEN, C.A., AFITLHILE, M., WELTI, R., HILDEBRAND, D.F. WANG, X. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 12: 2237-2246, 2000.
- WATERS, D.J. & BARFIELD, C.S. Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species. **Environmental Entomology**. 18: 1006-1010, 1989.
- WATSON, J.R. Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Huebner). **Journal of Economic Entomology**. 9: 521-528, 1916.
- WILSON, I.; VOGEL, J.; SOMERVILLE, S. Signalling pathways: A common theme in plants and animals? **Current Opinion in Biology**. 7(3):175-178, 1997.
- ZHANG, L.; WAN, X. S., DONAHUE, J. J., WARE, J. H., KENNEDY, A. R. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical, and head and neck cancer cells. **Nutr. Câncer**. 33 (2): 165-173, 1999.
- ZHU, Y-C. & BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzyme and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 29:1053-1063, 1999.
- ZHUANG, H.; HAMILTON-KEMP, T.R.; ANDERSEN, R.A.; HILDEBRAND, D.F. Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. **Plant Physiology**. 100: 80-87, 1992.

ZIMMERMAN, D. C.; COUDRON, C. A. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. **Plant Physiology**. 63: 636-541, 1979.