

EDUARDO GOMES DE MENDONÇA

**PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICO-ENZIMÁTICAS DE
CISTEÍNO-PROTEASES DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA
SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2008

EDUARDO GOMES DE MENDONÇA

**PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICO-ENZIMÁTICAS DE
CISTEÍNO-PROTEASES DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA
SOJA**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2008.

Prof. Joel Antônio de Oliveira
(Co-Orientador)

Prof. Maurílio Alves Moreira

Prof^ª. Tânia Toledo de Oliveira

Prof^ª. Maria Helena Nasser Brumano

Prof^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Presidente da Banca)

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

*“Faço ciência para saber quanto
tempo posso suportar” (Max Weber)*

AGRADECIMENTOS

Sou Grato:

À Universidade Federal de Viçosa, não só pela oportunidade de cursar minha graduação e o mestrado, mas também pelo fato de ter sido minha casa durante seis anos de minha vida;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela que, através de seus professores me tornou um profissional acima de tudo humano;

Ao Bioagro, local onde desenvolvi meus experimentos e onde construí uma nova família;

À CAPES pela concessão da bolsa, sem a qual seria impossível continuar meus estudos;

Ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa no qual se insere esse trabalho;

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, meu orientador, que através da paciência, sempre soube mostrar a luz que nós estudantes insistimos em não enxergar;

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, meu sincero muito obrigado pela força, dedicação e esforço dedicados, pois foi através disso que hoje estou aqui;

À Cris, Isabel, Isis, Camilla Motta, Liliane e Cris Mayrink que foram minhas psicólogas durante todo o mestrado, sempre mostrando que existiam pessoas e coisas muito piores do que as que estavam ao meu lado e as que estavam me acontecendo. Amizade assim não é fácil de reconhecer;

Ao meu irmãozão que fiz aqui Carlos, pelos momentos de descontração, pela companhia sempre agradabilíssima, pela bagunça, confusões, segredos, confissões, choro e risadas. Valew d+ amigo;

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Fabrícia, Liliane, Camila, Lílian, Anderson, Angélica, Zaira, Rita, Gepoliano, Thiago, Fernanda, Fabrício que fizeram deste um lugar muito agradável pra se trabalhar, sempre com risadas e bom humor;

Às amigas do Laboratório de Toxicologia Luciana e Kênia, com as quais aprendi junto que tese não é trabalho, mas ensinamentos pra uma vida toda;

À Erica, que durante bom tempo foi minha família aqui em Viçosa e que me deu forças pra “escrever uma tese”. Serei sempre grato pela sua companhia, amizade, lealdade, carinho e compreensão. Obrigado também pelo presente lindo: o Pedro;

Às minhas amigas que estão distantes: Mari, Nathi, Duda, Marília, Ju, Si, Carol e Sarah, minhas irmãs por escolha, com as quais posso contar a qualquer hora, que estarão sempre com uma história divertida pra vivermos juntos;

À minha irmã Kiara, meu exemplo de perseverança, luta, esforço e vitória. Algo muito mais forte que o amor nos une, e não são alguns mil quilômetros que fazem de você ausente na minha vida.

Aos meus pais, pela simplicidade de uma vida dedicada à formação dos filhos. Deus saberá recompensá-los da maneira certa. “Amo demais”.

À minha madrinha Pepeta, minha fada-madrinha, meu anjo da guarda, minha estrela guia;

Aos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito Obrigado!!

BIOGRAFIA

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

Em Maio de 2002 iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, bacharelando-se em 5 de Maio de 2006.

Em 15 de Maio de 2006, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, defendendo dissertação em 27 de fevereiro de 2008, a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

ABREVIATURAS

- AIDS** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- Brij 35** – Éter Lauril-polioxietilénico
- CaCl₂** – Cloreto de cálcio
- Cbz-FR-pNA** – Benzil-oxi-carbonil-fenilalanil-arginil-*p*-nitroanilida
- DTT** – Ditioneitol
- E-64** – N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
- EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetraacético
- EGTA** – Ácido Etilenoglicoltetraacético
- HCl** – Ácido Clorídrico
- kDa** – Kilodalton
- K_{M app}** – Constante de Michaelis-Menten aparente
- L-BApNA** – N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilida
- Suc-FR-pNA** – Succinil-fenilalanil-arginil-*p*-nitroanilida
- TLCK** – Tosil-L-Lys-clorometil cetona
- Tris** – Tris (hidroximetil) Amino Metano
- V_{max app}** – Velocidade Máxima aparente
- Z-Arg-Arg-MCA** – Arginil-arginil-4-metil-7-coumarilamida

Sumário

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Soja	4
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	6
2.3. Enzimas digestivas de insetos	8
2.3.1. Proteases	10
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Criação da lagarta	15
4.2. Preparo da dieta artificial	15
4.3. Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático	16
4.4. Ensaio enzimático	17
4.5. Efeito de pH e temperatura	17
4.6. Determinação de parâmetros cinéticos	18
4.7. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	18
4.8. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica de cisteíno- proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> sobre L-BApNA	20
5.2. Determinação das constantes cinéticas de cisteíno-proteases de <i>A.</i> <i>gemmatalis</i> sobre o substrato L-BApNA	25
5.3. Efeito de E-64 sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	31
5.4. Efeito de EDTA sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	34
5.5. Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	37
5.6. Efeito de TLCK sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	39

5.7. Efeito de Pepstatina A sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	42
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	48

RESUMO

MENDONÇA, Eduardo Gomes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICO-ENZIMÁTICAS DE CISTEÍNO-PROTEASES DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA SOJA.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Orientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Joel Antônio de Oliveira.

Inibidores de protease que atuam em proteases específicas de insetos são candidatos para terem seus códigos genéticos inseridos em plantas geneticamente modificadas. Um primeiro passo para se alcançar isso é a caracterização das enzimas proteolíticas do intestino desses insetos. Cisteíno-proteases da Fração solúvel e da Fração insolúvel do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* foram caracterizadas utilizando o substrato L-BApNA. A Fração solúvel, chamada de Fração I, foi obtida do sobrenadante após nove ciclos de congelamento e descongelamento do intestino de *A. gemmatalis* e a Fração insolúvel, chamada de Fração II, obtida da maceração com o detergente Brij 35 do pellet resultante da Fração I. Verificaram-se dois valores de pH com pronunciada atividade em ambas as Frações, sendo eles pH 3,6 e 8,0 para a Fração I e 4,6 e 8,0 para a Fração II. Já o pico de atividade quando testada a influência da temperatura foi em 35°C para a Fração I e 60°C para a Fração II. O $K_{M\ app}$ encontrado para as Frações I e II foram de 2,28 mM e 0,44 mM respectivamente. A $V_{máx\ app}$ para as respectivas Frações foram 297,68 nM.s⁻¹ e 122,95 nM.s⁻¹. Quatro inibidores de proteases foram testados, sendo cada um deles de uma classe de protease: TLCK (inibidor de serino-protease), E-64 (inibidor de cisteíno-protease), EDTA (inibidor de metalo-protease) e Pepstatina A (inibidor de aspartil-protease). A inibição mais pronunciada foi verificada quando E-64 foi adicionado ao meio para ambas as Frações, uma vez que todas as concentrações testadas diminuíram significativamente a atividade de cisteíno-protease. Um aumento de TLCK no meio fez com que a atividade de cisteíno-protease caísse gradativamente devido à reação desse com resíduo de aminoácido histidina na tríade catalítica, o qual faz parte de tríade de cisteíno-protease também. O efeito de EDTA na atividade de

cisteíno-protease de *A. gemmatalis* sobre L-BApNA mostra a diferença entre as duas Frações analisadas. A Fração I não depende de íons divalentes como Ca^{2+} para sua atividade. Já a Fração II é cálcio-dependente, pois EDTA diminuiu significativamente sua atividade. Pespstatina A não influenciou cisteíno-proteases da Fração I, exercendo pouca influência na Fração II.

ABSTRACT

MENDONÇA, Eduardo Gomes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **BIOCHEMISTRY AND KINECTICS-ENZYMATICS PROPERTIES OF CYSTEINE-PROTEASES OF THE VELVETBEAN CATERPILLAR MIDGUT.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Joel Antônio de Oliveira.

Protease inhibitors that react with insect specific proteases are candidates to have their genetic code inserted in genetically modified plants. The first step to achieve this is the characterization of proteolytic enzymes of these insects intestines. Cysteine-protease of the soluble and insoluble fractions from the midgut of *Anticarsia gemmatalis* were characterized using the substrate L-BApNA. The Soluble Fraction, called Fraction I, was obtained from the suspension medium after nine cycles of freezing and thawing of the intestine of *A. gemmatalis*, and the Insoluble Fraction, called Fraction II, was obtained from the maceration with detergent Brij 35 of the resulting pellet of the Fraction I. Two pH values were found with high activity in both Fractions they were pH 3.6 and 8.0 for the Fraction I and 4.6 and 8.0 for the Fraction II. And the peak of activity when tested the influence of temperature was at 35°C for the Fraction I and 60°C for the Fraction II. The K_M app found for the Fractions I and II were 2.28 mM and 0.44 mM, respectively, and the V_{max} app for the respective Fractions were 297.68 nM.s⁻¹ and 122.95 nM.s⁻¹. Four protease inhibitors were tested, which one from one class of protease: TLCK (inhibitor of serine-protease), E-64 (inhibitor for cysteine-protease), EDTA (inhibitor of metallo-protease) and Pepstatin A (inhibitor of aspartyl-protease). The higher inhibition was observed when E-64 was added to the medium for both Fractions, once that all concentrations tested decreased significantly the activity of cysteine-protease. An increase of TLCK into the medium made a gradual decrease in the activity of cysteine-protease, due to the reaction with the amino acid histidine residue in the catalytic triad, which is also part of the triad of cisteine-protease. The effect of EDTA in the activity of cysteine-protease of *A. gemmatalis* on L-BApNA shows the difference between

the two Fractions analyzed. The Fraction I do not depend on the divalent ions as Ca^{2+} for its activity. However, the Fraction II is a calcium-dependent, since EDTA reduced significantly its activity. The Pespstatin A did not influenced the cysteine-proteases of the Fraction I, exerting little influence on the Fraction II.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas são capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitando ser controlados. Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (SOUZA *et al.*, 2002). O Brasil possui o maior programa mundial de uso de baculovírus para o controle de insetos, implantado no início da década de 1980 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através do emprego do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI, 1998; RIBEIRO & PINEDO, 2001). Os baculovirus são vírus com DNA dupla fita que infectam principalmente artrópodes (FREDERICI, 1986) e como são específicos aos seus hospedeiros, constituem agentes ideais para o controle de pragas, sem riscos aos vertebrados, a outros organismos não visados e ao meio ambiente (MOSCARDI & SOUZA, 2002).

Em contrapartida, as plantas desenvolvem mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. A Via dos Octadecanóides está ligada a importantes processos fisiológicos da planta, tais como: crescimento, desenvolvimento, senescência e na biossíntese de moléculas regulatórias. Vários estudos mostram que os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra infestação de insetos e patógenos. Na via dos octadecanóides, a hidroperóxido ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico que, após uma redução e três β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico, que tem atividade de fitohormônio e está envolvido na regulação dos processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a insetos e patógenos; ou seja, na indução da expressão de genes que codificam inibidores de proteases (CROFT *et al.*, 1993, GARDNER, 1991, FARMER e RYAN, 1992). É postulado que inibidores de proteases têm efeito em proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER *et al.*, 1987, RYAN, 1990). Quando ocorrem

ferimentos em folhas de plantas, ocorre rapidamente síntese de inibidores de proteases no local do ferimento, como também em folhas mais distantes (FARMER e RYAN, 1992). Diversos compostos identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam para inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, o ácido abscísico, o metil jasmonato, o ácido jasmônico e a sistemina (SILVA et al., 2002, HERDE et al., 2008)

Falhas no método tradicional de controle de insetos para reduzir as perdas da cultura tem estimulado o desenvolvimento de alternativas para controlar estas pragas (LALITHA *et al.*, 2005). Um melhor entendimento das enzimas digestivas de insetos pode ser a chave para desenvolver cultivares resistentes a insetos, pois conhecendo-se o mecanismo enzimático e catalítico bem como o sítio ativo dessas enzimas, códigos para proteínas e peptídeos poderão ser adicionados ao genoma da planta ou esses peptídeos sintéticos poderão ser pulverizados na cultura.

Uma maneira possível de controlar esses insetos é o uso de genes de plantas que codificam inibidores de protease. Inibidores de proteases de plantas têm se mostrado eficazes na inibição de proteases de insetos, paralisando o crescimento larval, quando misturados em dietas artificiais (PILON, 2006). O impedimento do desenvolvimento larval por um inibidor de protease individual não é tão amplo. O inseto co-evolui com as plantas e desenvolve mecanismos para superar esse efeito de inibição. Uma dessas adaptações refere-se ao aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes, tentando burlar esse efeito inibitório (PILON *et al.*, 2006). São necessários múltiplos inibidores de proteases para se obter êxito contra as atividades proteolíticas mais pronunciadas no intestino de insetos. Um dos primeiros passos para se alcançar isso é a caracterização das enzimas proteolíticas do intestino desses insetos.

Os códigos genéticos de inibidores de protease que agem sobre proteases de insetos específicas são candidatos para uso em plantas geneticamente modificadas. Muitos insetos utilizam cisteíno-proteases para digerir proteínas adquiridas na dieta. O crescimento e desenvolvimento destas pragas são seriamente afetados por inibidores de cisteíno-proteases. A redução da proteólise dentro do intestino desses insetos, causado pela inibição de cisteíno-protease, resulta numa carência de aminoácidos livres, levando a efeitos prejudiciais no

crescimento e desenvolvimento dos insetos, os quais mobilizarão outras proteínas e aminoácidos na tentativa de suprir a falta de atividade.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar cisteíno-proteases do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

Segundo o relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a liderança mundial desde 1964 na produção de soja é dos Estados Unidos, em termos de área colhida e produção. Esta posição, entretanto, tem sido ameaçada por seus dois concorrentes: Brasil e Argentina. Usando-se a mesma fonte desse relatório e atualizando as informações, observa-se que as áreas colhidas de soja são de 29,9 milhões de hectares nos Estados Unidos e de 20,2 milhões de hectares no Brasil. A produção conjunta de Brasil e Argentina passa a ser superior à dos Estados Unidos, a partir de 2002. A partir de 1999, a produtividade da soja no Brasil ultrapassa a dos Estados Unidos e Argentina (CONTINI *et al.*, 2006).

A FABRI (Food and Agricultural Policy Research Institute) estima que, na safra 2015-16, a produção mundial de soja alcançará 277 milhões de toneladas (um aumento de 21% sobre a safra 2005-2006). A produção mundial de soja tornar-se-á ainda mais concentrada em 2015-16. Os três maiores produtores Argentina, Brasil e Estados Unidos representarão 85% da produção mundial. No final do período o Brasil terá 34% da produção mundial enquanto EUA cairão para 30% (CONTINI *et al.*, 2006).

O Brasil deverá ultrapassar os Estados Unidos e tornar-se o maior exportador de soja em 2007-2008 segundo a FABRI. A participação dos EUA está projetada para cair para 27% em 2015/2016. A participação das exportações do Brasil deve aumentar de 38% para 51%, devendo ocorrer uma forte expansão da área de soja ao longo da próxima década (CONTINI *et al.*, 2006).

A FABRI projeta para o Brasil uma produção de 93 milhões de toneladas em 2015/2016, devido a expansão de área e conversão de pastagens, aliadas a aumento de produtividade e melhores alternativas de transporte. Isto significará 33,6% da produção mundial. O setor permanecerá orientado para exportações (CONTINI *et al.*, 2006).

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos (Tabela 1). Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam ser controlados (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>).

Tabela 1. Insetos-pragas da soja e parte da planta que atacam

Nome científico	Nome comum	Parte da planta atacada	Observações
Principais			
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Lagarta-da-soja	Fo	
<i>Euschistus heros</i>	Percevejo marrom	Va, Se	
<i>Piezodorus guildinii</i>	Percevejo verde pequeno	Va, Se	
<i>Nezara viridula</i>	Percevejo verde	Va, Se	
Regionalmente importantes			
<i>Sternechus subsignatus</i>	Tamanduá-da-soja	Ha	Tem alto potencial de dano
<i>Scaptocoris castanea</i> e <i>Atarsocoris brachiariae</i>	Percevejos-castanhos-da-raiz	Ra	Importante na região do cerrado. Têm alto potencial de dano
<i>Phyllophaga cuyabana</i> , <i>Liogenys</i> sp. e <i>Plectris</i> sp.	Corós	Ra	
Secundárias			
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Broca-do-colo	Ha	Importantes se ocorrer período seco na fase inicial da cultura
<i>Chalcodermus</i> sp.	Bicudinho	Fo	
<i>Pseudoplusia includens</i>	Falsa-medideira	Fo	
<i>Maecolaspis calcarifera</i>	Vaquinha	Fo	
<i>Megascelis</i> sp.	Vaquinha	Fo	
<i>Dichelops furcatus</i>	Barriga verde	Va, Se	
<i>Edessa meditabunda</i>		Va, Se	
Secundárias			
<i>Epinotia aporema</i>	Broca-das-axilas	Fo, Br, Va	Importância em áreas restritas
<i>Diabrotica speciosa</i>	Patriota	Fo(A), Ra(L)	Mais comum após milho "safrinha"
<i>Cerotoma</i> sp	Vaquinha	Fo, Va(A), No(L)	
<i>Aracanthus mourei</i>	Torrãozinho	Co, Fo, Pe	Ocorre no início do desenvolvimento da soja
<i>Bemisia tabaci</i> Biotipo B	Mosca branca	Fo	Tem alto potencial de dano
	Tripes	Fj	Vetores de vírus da "queima do broto"; ocorrem em áreas restritas
	Piolho-de-cobra	Pl, Pp	Importante em semeadura direta
	Caracóis e lesmas	Pl, Co, Fj	Importantes em semeadura direta
<i>Dysmicoccus</i> sp. e <i>Pseudococcus</i> sp	Cochonilhas-da-raiz	Ra	Importantes em semeadura direta
<i>Omiodes indicatus</i>	Lagarta-enroladeira	Fo	Pode ocorrer no período reprodutivo e causar pequena desfolha
	Ácaros	Fo	Causa secamento e queda das folhas
Br = brotos; Co = cotilédones; Fj = folhas jovens; Fo = folhas; Ha = hastes; No = nódulos; Pe = pecíolos; Pl = plântulas; Pp = plantas pequenas; Ra = raízes; Se = sementes; Va = vagens.			
(A) = adulto, (L) = larva.			

(Fonte: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>)

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

2.2. *Anticarsia gemmatalis*

As larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas como lagarta da soja, são consideradas pragas-chave da sojicultura, sendo economicamente importantes em função das grandes perdas que ocasionam a esta lavoura (GALLO *et al.*, 2002). Dentre as pragas da soja, a lagarta da soja *A. gemmatalis* destaca-se como o principal inseto desfolhador, podendo causar diminuição significativa na produção (GALLO *et al.*, 2002).

Durante todo o seu ciclo, a cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas. Insetos principalmente em seu estágio larval, podem atacar as plântulas e posteriormente atacar a planta durante a fase vegetativa e em alguns casos, até a floração. Com o início da fase reprodutiva da soja, outros insetos surgem e podem causar danos desde a formação das vagens até o final do desenvolvimento das sementes. Assim, os insetos representam um importante fator que afeta a planta e a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, caso não seja efetuado nenhum tratamento para o controle dessa população, que poderá tornar-se excessiva e causar perdas significativas no rendimento da cultura (TURNIPSEED & KOGAN, 1987).

Na fase adulta de *A. gemmatalis*, que dura em média 15 dias, a mariposa apresenta envergadura de 30 a 38mm e coloração variando de cinza, marrom avermelhado ou amarelado sem dimorfismo sexual. A oviposição ocorre na face inferior das folhas, podendo durar até 3 dias. Os ovos são arredondados e achatados na superfície inferior, medem de 1 a 2 mm de diâmetro e apresentam cor branca a esverdeado até a eclosão, após a qual adquirem coloração rosa. O período larval pode durar até 25 dias, podendo ocorrer 6 ínstaes. A lagarta pode atingir 48mm de comprimento e sua coloração é variável, apresentando listras longitudinais verde-escuras proeminentes e listras estreitas nas cores brancas, amarelas ou rosa. No estágio de pré-pupa, que dura em média 2 dias, as larvas

encolhem atingindo um comprimento médio de 25mm e adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais. O estágio pupal dura em média 7 dias. As pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20mm no comprimento e 4 a 6mm na largura, são encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de aproximadamente 2 cm (BARBARA, 2000).



Figura 1. Fase larval de *Anticarsia gemmatalis* (Fonte: BROWN, 2002).

Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatalis*, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja e causam prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até atingir o seu desenvolvimento máximo, para tornar-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa, a cada 24h (GALLO *et al.*, 2002).

Vários parasitóides atacam a lagarta da soja. 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, os quais se alimentam de outras lagartas. Dentre estes predadores observamos os besouros, *Calosoma sayi* Dejean, *Calleida decora* (Fabricius) e *Poecilus chalcites* (Say) (todos Coleoptera: 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 (BARBARA, 2000).

Dentre os métodos de controle biológico, o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (SOUZA *et al.*, 2002) tem sido o mais usado. O Brasil possui o maior programa mundial de uso de baculovírus para o controle de insetos, implantado no início da década de 1980 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através do emprego do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI, 1998; RIBEIRO & PINEDO, 2001). RICHTER & FUXA (1984) demonstraram que a *A. gemmatalis* foi susceptível ao nucleopoliedrovírus (NPV) e ao *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). O baculovírus anticarsia (nucleopoliedrovírus 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 de insetos

Insetos são excelentes modelos para o estudo da função intestinal principalmente porque existem espécies adaptadas a quase todos os tipos de habitat e de hábitos alimentares. Além disso, o intestino é a maior interface entre o inseto e o ambiente. Portanto é essencial o entendimento do processo digestivo para o desenvolvimento de métodos de controle biológico, como é o caso do uso de plantas transgênicas no controle de insetos fitófagos. A ocorrência de diferentes enzimas digestivas no canal digestivo de insetos é principalmente

devido à composição química da dieta ingerida por eles. É possível que todos os insetos tenham enzimas digestivas complementares àquelas utilizadas primariamente, em quantidades relativas que mudam em resposta à composição da dieta (TERRA & FERREIRA, 1994).

Cerca de dois terços de todas as espécies do mundo são da Classe Insecta. Este fenômeno tem sido explicado pela habilidade que os insetos possuem em utilizar 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 através de enzimas que degradam esses materiais, ou isolando-os em seu organismo ou mesmo eliminando-os sem que causem prejuízos. 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).

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 a digestão final dos dímeros que são transformados em monômeros por hidrolases, tais como dipeptidases, maltase e celobiase.

Estes mesmos autores propõem que a digestão inicial ocorra no espaço endoperitrófico, a digestão intermediária e a final ocorram no espaço ectoperitrófico e nas células do intestino médio, respectivamente (Figura 2).

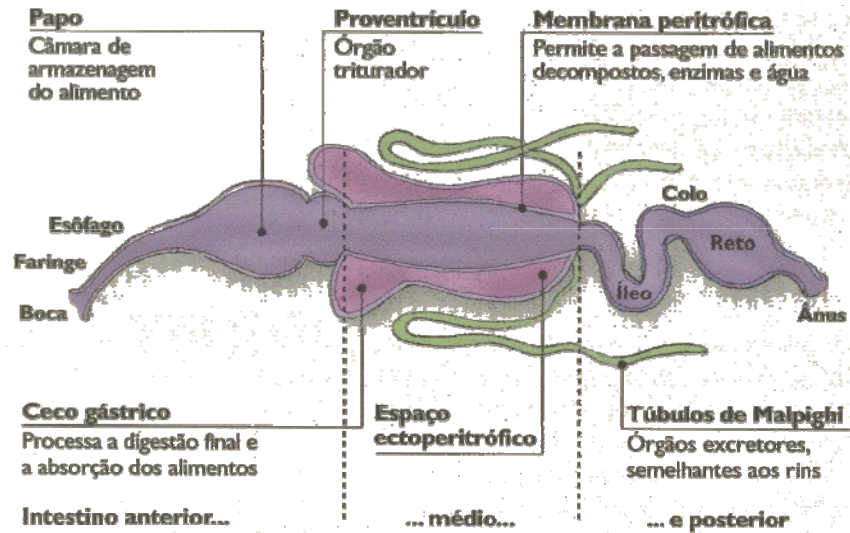


Figura 2. Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos (TERRA *et al*, 2000).

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 2) (TERRA *et al*, 2000).

O intestino médio de Lepidoptera 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 de cereais, algodão, leguminosas, dentre outras.

2.3.1. *Proteases*

As enzimas proteolíticas constituem um dos principais grupos de enzimas de importância industrial e fisiológica. Elas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. Executam uma variedade de funções, que se estende do nível celular a órgãos e organismo, produzindo sistemas de cascatas, tais como inflamação. As proteases são também responsáveis por um processo complexo que envolve a fisiologia normal da célula e as condições patológicas

anormais. Devido a isso, as proteases são alvos para desenvolvimento de agentes terapêuticos contra certas doenças, como a AIDS, além de serem utilizadas nas indústrias alimentícias e de detergentes. Devido a essa vasta diversidade de proteases, em contraste a especificidade de suas ações, elas têm atraído a atenção de diversos pesquisadores que exploram suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO *et al.*, 1998).

As proteases são classificadas de acordo com a Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB dentro do grupo 3 (hidrolases), subgrupo 4. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARETT, 1994). As proteases são subdivididas em dois principais grupos, exopeptidase e endopeptidase, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Baseado no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases (RAO *et al.*, 1998).

2.3.1.1. Cisteíno-Proteases

Cisteíno-proteases são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico do ânion sulfeto, no sítio ativo, à ligação peptídica (KUNAKBAEVA *et al.*, 2003). O sítio ativo de uma cisteíno protease é composto por um resíduo de cisteína, por um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica. A Figura 3 ilustra o ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína ao carbono da carbonila do substrato, resultando num intermediário tetraédrico. Uma ligação covalente acil-enzima é formada após a clivagem da ligação peptídica. A hidrólise do acil-enzima leva a regeneração da enzima livre (BAIRD *et al.*, 2006).

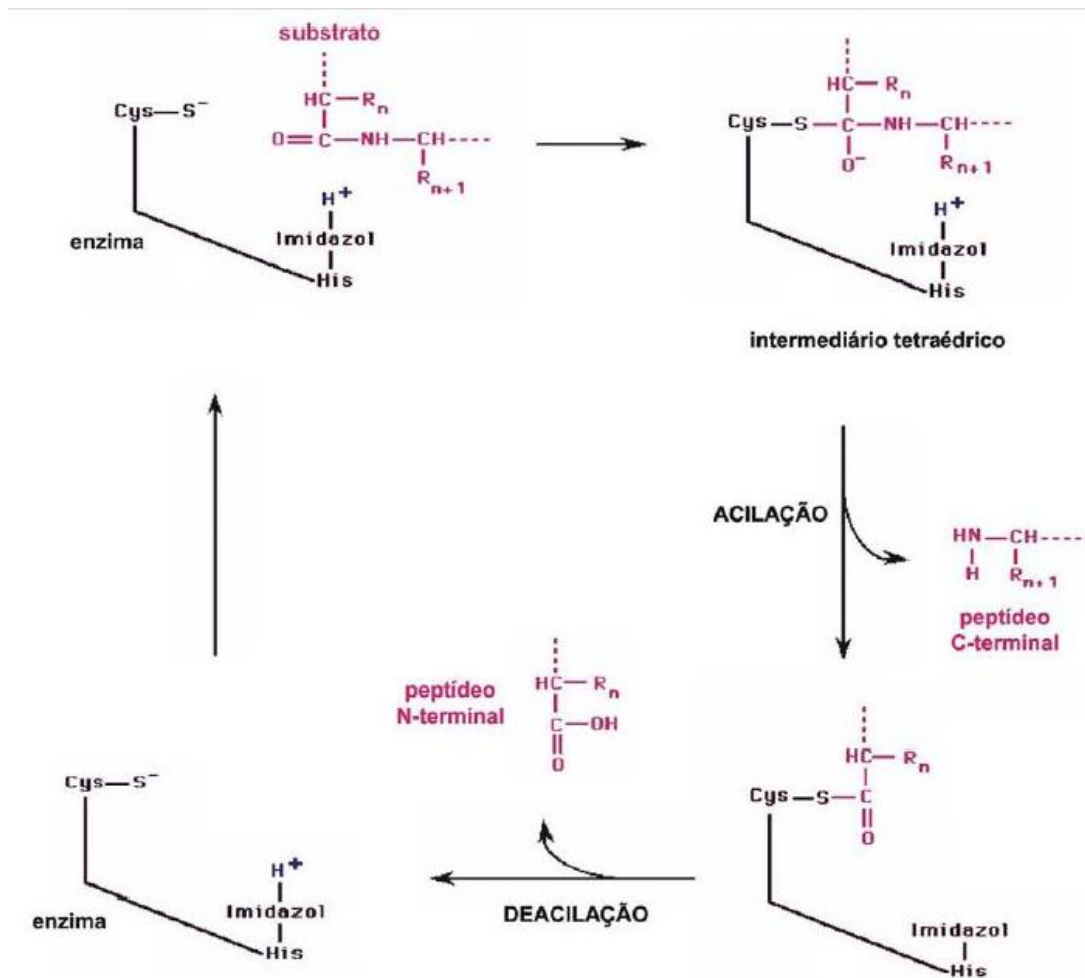


Figura 3. Mecanismo catalítico de cisteíno-proteases.

Para essas enzimas o resíduo de cisteína é essencial para a sua atividade catalítica. Cisteíno-proteases são divididas em clãs que não seguem uma identidade estrutural nem de seqüência e nem de estrutura tridimensional e provavelmente surgiram de diferentes linhas evolutivas. Sete clãs são reconhecidos dentro das cisteíno-proteases. Os clãs são divididos em famílias baseados na identidade de seqüência e similaridades (BARRETT & RAWLINGS, 2001; RAWLINGS & BARRETT, 1999). O clã CA é o maior clã das cisteíno-proteases com a família da papaína-like (C1) sendo a mais estudada. O clã CD compreende as famílias C13, C11, C14, C25 e a enzima legumaína pertencente à família C13 (MOTTRAM *et al.*, 2003). Legumaína é uma endopeptidase com especificidade para clivar o carboxiterminal de um resíduo de asparagina. Legumaína é também caracterizada por não ser afetada pelo clássico inibidor de cisteíno-protease E-64 enquanto é inibida por outras cistatinas (ALAVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 1999). As cisteíno-proteases do clã CD são especificamente

inibidas por epóxidos de azopeptídeos baseados em asparagina (ASGIAN *et al.*, 2002; EKICI *et al.*, 2004). Enquanto as cisteíno-proteases do clã CD têm selecionado substratos específicos direcionados a asparagina e aspartato no sub-sítio S1, as proteases do clã CA têm uma preferência por resíduos grandes ou hidrofóbicos no segundo resíduo no substrato (sub-sítio S2), mas tem pouca seletividade no sub-sítio S1. As cisteíno-proteases papaína-like e legumaina-like já foram descritas em muitas partes de plantas como sementes, frutos (BRUNO *et al.*, 2002), raízes (SAFADI *et al.*, 1997) e em culturas de tecidos vegetais (FISCHER *et al.*, 2000; PARISI *et al.*, 2002).

As cisteíno-proteases desenvolvem um importante papel na degradação de proteínas de reserva durante a germinação. Na germinação de sementes, o requerimento de aminoácidos para a síntese de proteínas é fornecido pela proteólise de proteínas de reserva (POMPE-NOVAK *et al.*, 2002). Cisteíno-protease têm um importante papel no sistema de defesa de plantas contra insetos herbívoros (KONO *et al.*, 2004) e estão envolvidas na morte celular programada de soja induzida por estresse oxidativo. Em mamíferos, cisteíno-proteases desenvolvem um importante papel na degradação lisossomal de proteínas e está relacionado com a invasão de células cancerígenas e com a apresentação de antígenos às células do sistema imune (ALAVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 1999; GIANOTTI, 2008). Cisteíno-proteases de parasitas da malária e da schistosomose são considerados potentes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra essas infecções parasitárias (McKERROW *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo geral caracterizar cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade de cisteíno-protease de duas frações do intestino médio de *A. gemmatalis*;
2. Caracterização cinética destas proteases com o substrato sintético L-BApNA para atividade amidásica;
3. Estudo da ação de vários inibidores de proteases sobre a atividade de cisteíno-proteases do intestino médio;
4. Determinar o efeito de íons Ca^{2+} na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Criação da lagarta

Ovos de *A. gemmatalis* foram mantidos no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 50cm revestida internamente com folhas de papel sulfite A4.

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

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

Após a eclosão dos ovos iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO *et al.*, 1985) colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

4.2. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial é composta de feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água nas proporções mostradas no Quadro 1. Ágar e água foram autoclavados por 15 min à pressão de $1,5\text{ kgf/cm}^2$. A essa mistura foram adicionados os outros ingredientes e misturados, com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida adicionou-se ácido ascórbico

(6g), ácido sórbico (3g), nipagin (metilparabeno) (5g), formol 40% (6mL) e 10mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantotenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25mg), riboflavina (0,50mg), piridoxina (0,25mg), ácido fólico (0,25mg), biotina (0,02mg), inositol (20mg), água (1L) até formar uma pasta homogênea que foi então transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4°C.

Quadro 1 - Composição da dieta artificial (PILON, 2004).

INGREDIENTES	CONCENTRAÇÃO (g/100 g de mistura)
Feijão mulatinho (cozido)	4,8
Levedo de cerveja	2,4
Gérmen de trigo	3,8
Proteína de soja	3,8
Caseína	1,9
Agar-agar	1,34
Ácido ascórbico	0,23
Ácido sórbico	0,11
Solução vitamínica	0,38
Nipagin	0,19
Formol 40%	0,23

4.3. Extração do intestino e obtenção do extrato enzimático

Após dissecação de 50 larvas de 5º instar os intestinos foram colocados em 10ml de solução de HCl 10^{-3} M a 4 °C, mantendo sempre a proporção de 5 intestinos por ml de solução. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C. Após os ciclos, o extrato foi centrifugado em tubos plásticos do tipo Falcon a 23.500 g por 10 min a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005).

O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a 0°C para análises posteriores, chamado de Fração I. O precipitado foi solubilizado

com 10mL da solução de HCl 10^{-3} M contendo 0,5% do detergente Brij 35, centrifugado a 23.500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi então retirado e mantido a 0°C para análises futuras e denominado Fração II.

4.4. Ensaio enzimático

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA). Foram adicionados 500 μ L da solução de L-BApNA 1,2mM, 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 (contendo CaCl_2 20mM e Ditioneitol (DTT) 5mM), 100 μ L do inibidor de serino-protease benzamidina 12mM e ao final 100 μ L do extrato enzimático. O experimento foi realizado em três repetições.

4.5. Efeito de pH e temperatura

O efeito de pH na atividade enzimática foi determinado utilizando-se tampões MacIlvaine nos valores de pH 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6; 7,0; 7,6 e tampões Tris-HCl nos valores de pH 8,0; 8,6 e 9,0. Todas as soluções tampão continham DTT 5mM e CaCl_2 20mM.

A atividade do extrato enzimático foi determinada misturando-se 100 μ L do extrato enzimático, 500 μ L da solução de L-BApNA 1,2 mM, 100 μ L de Benzamidina 12mM e 500 μ L de tampão correspondente ao pH desejado, para completar 1,2 mL. A leitura da absorvância em 410nm foi feita durante 2,5min (OLIVEIRA, *et al.*,2005). Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

Para a avaliação do efeito da temperatura na atividade, foi utilizado banho-maria nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C e espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada. O efeito da temperatura foi realizado misturando-se 100 μ L do extrato enzimático, 500 μ L da solução de L-BApNA 1,2 mM, 100 μ L de Benzamidina 12mM e 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo CaCl_2 20mM e DTT 5mM. Após 5 minutos de incubação da mistura na temperatura desejada, a leitura da absorvância em 410nm foi feita durante 2,5min. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

4.6. Determinação de parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos $K_{M\ app}$ e $V_{max\ app}$ foi realizada na temperatura de melhor atividade de cada Fração, ou seja, a 35°C para a Fração I e a 60°C para a Fração II, em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo CaCl₂ 20mM e DTT 5mM, com o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,075 a 1,5 mM. Inibidor de serino-proteases benzamidina foi acrescentado na concentração final de 1mM, impedindo a atividade de serino-proteases, as quais possuem afinidade pelo mesmo substrato, eliminando a interferência destas nos ensaios.

As velocidades iniciais foram determinadas a 410 nm para L-BApNA, em função do tempo (2,5 minutos) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 8800 M⁻¹.cm⁻¹. 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 Sigma Plot.

4.7. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*

No estudo de modificadores químicos na atividade de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis*, foram utilizados 500µL da solução de L-BApNA 1,2 mM como substrato, 100 µL de Benzamidina, 100 µL do extrato enzimático e 500µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (contendo 20mM de CaCl₂ e 5 mM de DTT) adicionado de: EDTA (25 - 100mM) – inibidor de metalo-proteases e proteases ativadas por metais por ser quelante de Ca⁺⁺ e outros metais divalentes, TLCK (0,005 - 1mM) – inibidor irreversível de serino-protease tripsina-like, Pepstatina A (0,05 - 10µM) – inibidor de aspartil-protease, E-64 (1 - 100µM) – inibidor de cisteíno-protease.

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

4.8. 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 a 35°C para a Fração I e a 60°C para a Fração II, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, em concentrações de CaCl₂ variando de 5 a 30 mM. Para cada ensaio foram misturados 500µL de L-BApNA 1,2mM, 100µL da solução de Benzamidina 12mM, 100µL de extrato enzimático e 500µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo a concentração de cálcio necessária para atingir a concentração desejada. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A atividade dos extratos enzimáticos, Fração I e II, nos respectivos valores de pH foi determinada a 25°C, com o substrato L-BApNA. A escolha da temperatura de 25°C foi feita por ser esta a temperatura ambiente e esta ser a primeira determinação da caracterização enzimática feita. Os perfis de atividade de proteases dos extratos enzimáticos da Fração I (Fig 4A) e Fração II (Fig. 4B) mostram que ambas as frações apresentam dois picos de atividade em diferentes valores de pH, ou seja, pH 3,6 e 8,0 para a Fração I e pH 4,6 e 8,0 para a Fração II. Estes resultados sugerem diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto, observa-se pelo perfil da Figura 4A que o maior valor de atividade obtido na Fração I, na faixa de pH utilizada, dentro das condições descritas anteriormente, foi em pH 3,6 e que a atividade da Fração II, tanto em pH 4,6 como em 8,0 possuem mesmo valor de atividade. A Fração I também possui uma pronunciada atividade em pH 8,0, coincidindo com o perfil da Fração II. Assim, todas as análises foram realizadas em pH 8,0.

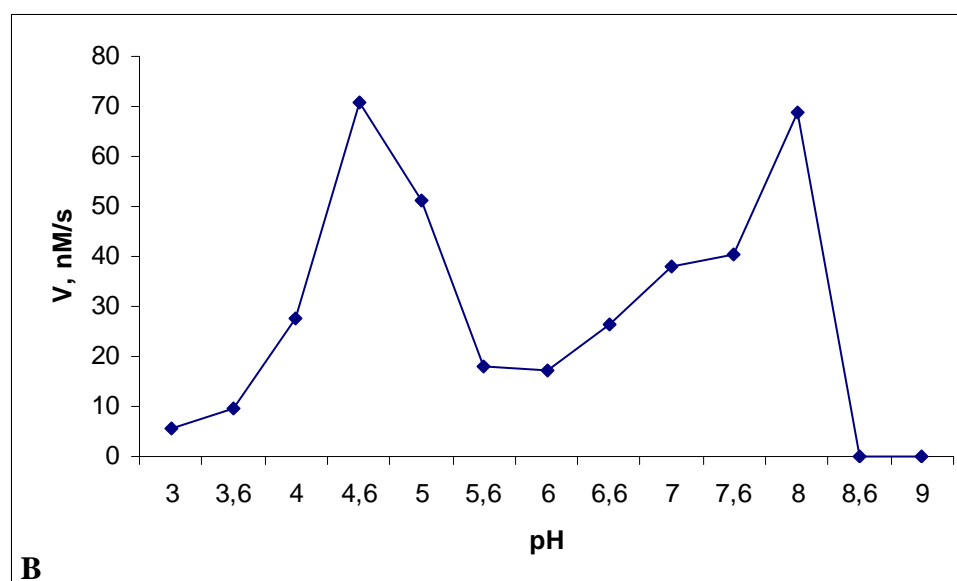
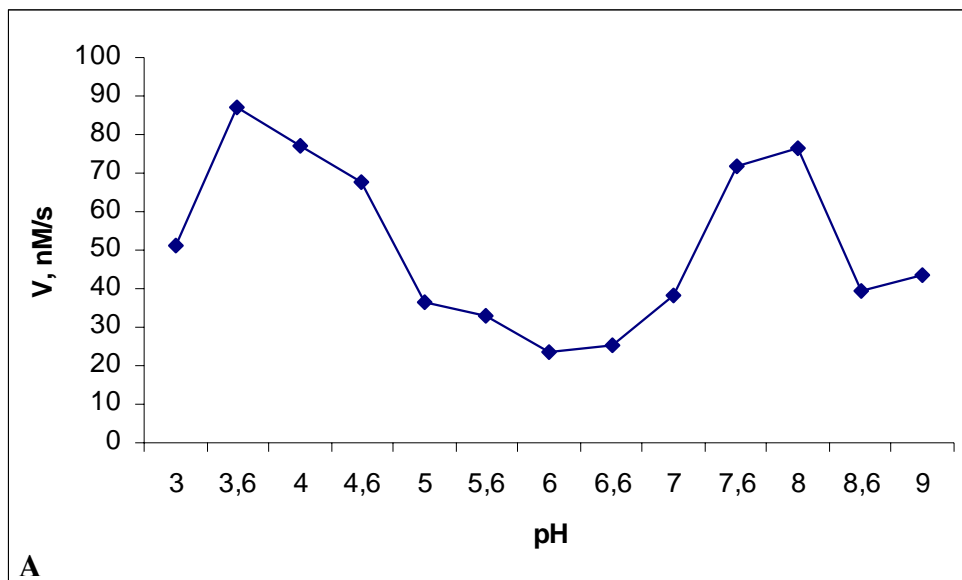


Figura 4: Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno-protease do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito do pH sobre a atividade da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. B – Efeito do pH sobre a atividade da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

Analisando o efeito de pH sobre a atividade de cisteíno-proteases, nossos dados, em pH ácido, estão semelhantes com aqueles encontrados por VISESSANGUAN *et al.* (2003) em estudos com a cisteíno-protease Catepsina L purificada de músculos de linguado *Atheresthes stomias*, no qual o pH em que houve maior atividade foi 5,0. FAHMY *et al.* (2004) analisando cisteíno-protease de trigo (*Triticum aestivum*) encontraram valores de maior atividade na faixa de pH 3,5 até 4,5. MOHAMED *et al.* (2005) em estudos com *Fasciola gigantica* encontraram um pico de atividade em pH 5,5. ARANISHI *et al.* (1997) estudando Catepsina B purificadas de carpas *Cyprinus carpio* encontraram máxima atividade nos valores de pH na faixa de 5,5 a 6,5, sendo o pH ótimo de 6,0. VALASAKI *et al.* (2007) trabalhando com proteases de *Lactobacillus helveticus* acharam uma faixa de pH de atividade entre 6,0 e 8,0 com máxima atividade em pH 7,0.

O pH do intestino médio para Lepidopteras 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). Portanto os valores aqui encontrados com pico de atividade em pH 8,0 para ambas as Frações estão próximos ao pH fisiológico de lepidopteras. PEREIRA *et al.* (2001) purificaram uma cisteíno-protease de *Carica candamarcensis* L. obtendo em sua caracterização um maior valor de atividade em pH 8,0. Nossos resultados de cisteíno-protease de *A. gemmatalis* utilizando como substrato L-BApNA estão, portanto, dentro da faixa de pH obtida em outros estudos.

O efeito da temperatura sobre a atividade de cisteíno-proteases, do extrato enzimático da Fração I, mostra mais de um pico de atividade em diferentes valores de temperatura avaliados (Fig. 5).

A Figura 5A 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 existe mais um pico, de menor atividade a 20°C. Na Figura 5B, onde se encontra o perfil de atividade em função da temperatura da Fração II, observamos um aumento da atividade conjuntamente com o aumento da temperatura. Como observado na Figura 5B, a maior temperatura testada foi 60°C. Mesmo o perfil tendo uma tendência de continuar aumentando, temperaturas maiores do que esta não foram testadas devido à temperatura ambiente onde esses insetos são encontrados assim como a

temperatura fisiológica do inseto, uma vez que temperaturas acima de 60°C são impraticáveis nas condições em que vivem. Desta forma podemos observar que a temperatura de maior atividade para a Fração I foi a 35°C e para a Fração II foi a 60°C. Novamente observa-se que estes dados sugerem a presença de diferentes formas de cisteíno-proteases no extrato enzimático.

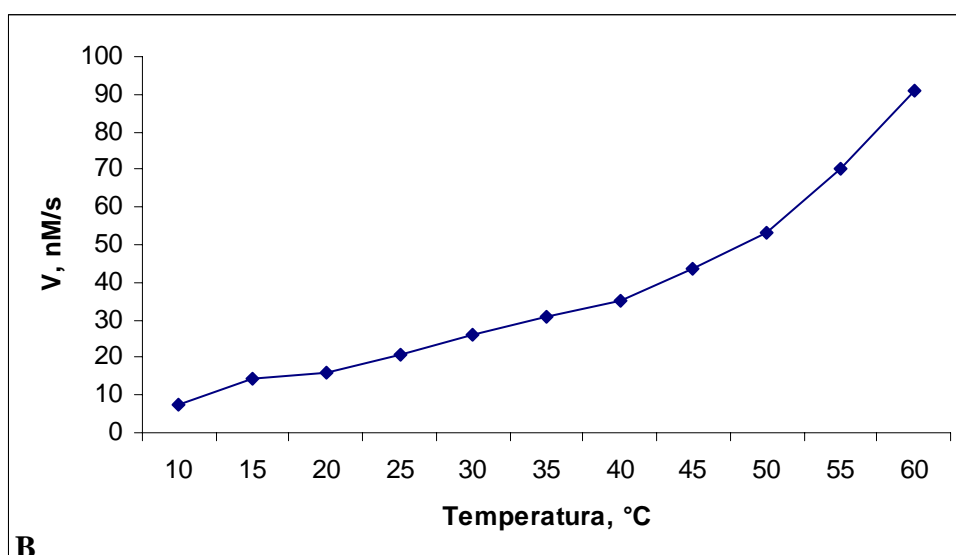
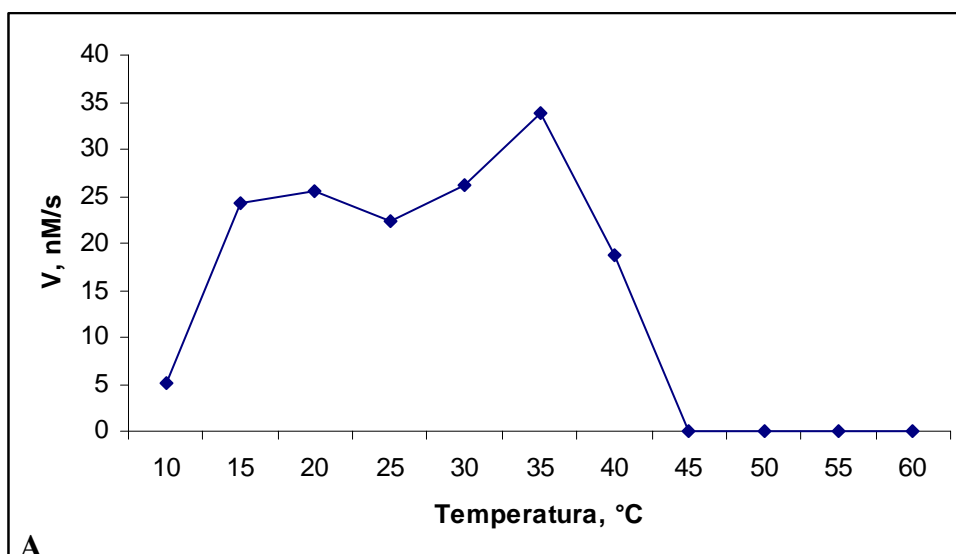


Figura 5: Efeito da temperatura, em pH 8,0, sobre a atividade de cisteíno-protease do extrato enzimático obtido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A** – Efeito da temperatura sobre a atividade da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da temperatura sobre a atividade da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA.

VALASAKI *et al.* (2007) em estudos com cisteíno-proteases extracelulares purificadas de *Lactobacillus helveticus* encontraram uma temperatura ótima de 60°C utilizando como substratos Cbz-FR-pNA e Suc-FR-pNA. Estes valores de atividade foram obtidos utilizando substratos sintéticos *p*-nitroanilidas, como L-BApNA por nós utilizado. Valores entre 40°C e 50°C foram também encontrados por ARANISHI *et al.* (1997) em estudos de cisteíno-protease Catepsina B de carpas *Cyprinus carpio*. Nossos valores de temperatura para Fração II estão semelhantes com o encontrado por estes autores. VISESSANGUAN *et al.* (2003) encontraram para catepsina L purificada dos músculos de linguado um máximo de atividade na temperatura de 60°C o que se assemelha ao encontrado em nosso trabalho para a Fração II. O perfil de atividade dessa catepsina se assemelha muito com o perfil do presente trabalho, aumentando a atividade até 60°C. VISESSANGUEN *et al.* (2003) testaram outras temperaturas maiores que 60°C, demonstrando uma queda na atividade após este valor.

Assim, optamos por determinar os parâmetros cinéticos da Fração I na temperatura de 35°C e da Fração II na temperatura de 60°C.

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

Os parâmetros cinéticos de cisteíno-proteases presentes nos extratos enzimáticos das Frações I e II, foram obtidos utilizando-se as concentrações de substrato variando de 0,075 a 1,5 mM para a Fração I e de 0,05 a 1,0 mM para Fração II em pH 8,0. O perfil para a Fração I foi realizado a 35°C e o para a Fração II a 60°C. Observa-se que essas cisteíno-proteases dos extratos enzimáticos de ambas as frações, ou seja, Fração I (Fig. 6) e Fração II (Fig. 7) apresentam curvas hiperbólicas seguindo modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentrações de substrato analisadas.

O valor de $K_{M\ app}$ de cisteíno-proteases da Fração I foi 2,28 mM sendo maior do que o da Fração II que foi de 0,44 mM. K_M é uma constante que mede a afinidade da enzima pelo substrato e nos dá uma indicação da concentração fisiológica do substrato dentro da célula, além de ser entendida também na sua dedução clássica como a concentração de substrato na qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima da enzima. O K_M aparente ($K_{M\ app}$) é a constante

obtida em condições fisiológicas, ou seja, quando se determina seu valor na presença de outros componentes celulares da célula, imitando o ambiente no qual a enzima é encontrada. Já K_M é determinada quando se tem a enzima purificada. Dessa forma, como foi utilizado extrato enzimático para se determinar a atividade de cisteíno-proteases, obtivemos o $K_{M\text{ app}}$ de ambas as Frações Estes dados sugerem uma adaptação melhor do L-BApNA ao centro ativo de cisteíno-proteases da Fração II do que da Fração I.

De acordo com VALASAKI *et al.* (2007), que purificaram duas cisteíno proteases de *Lactobacillus helveticus*, a cisteíno-protease cálcio independente Lmm-protease-*Lh* possui K_M de 2,83mM sobre o substrato Suc-FR-pNA. Este valor de K_M foi semelhante ao obtido neste trabalho para a Fração I, o qual utilizou também um substrato *p*-nitroanilida . O produto formado, tanto do substrato L-BApNA como do Suc-FR-pNA, é *p*-nitroanilina e determinado em 410nm. A cisteíno-protease cálcio dependente Hmm-protease-*Lh* apresentou K_M de 0,72mM sobre o substrato Suc-FR-pNA, valor também semelhante ao obtido na Fração II para substratos *p*-nitroanilida.

MOHAMED *et al.* (2005) encontraram um K_M de 0,6mM para cisteíno-protease do parasita *Fasciola gigantica* sobre o substrato BApNA, e PEREIRA *et al.* (2001) encontraram K_M de 1,47mM para cisteíno-protease de *Carica candamarcensis* sobre o mesmo substrato. Os valores de K_M aqui encontrados estão, portanto, dentro da faixa de valores de K_M obtidos por outros autores para cisteíno-proteases, utilizando substratos *p*-nitroanilidas, semelhantes aos de outros autores aqui citados.

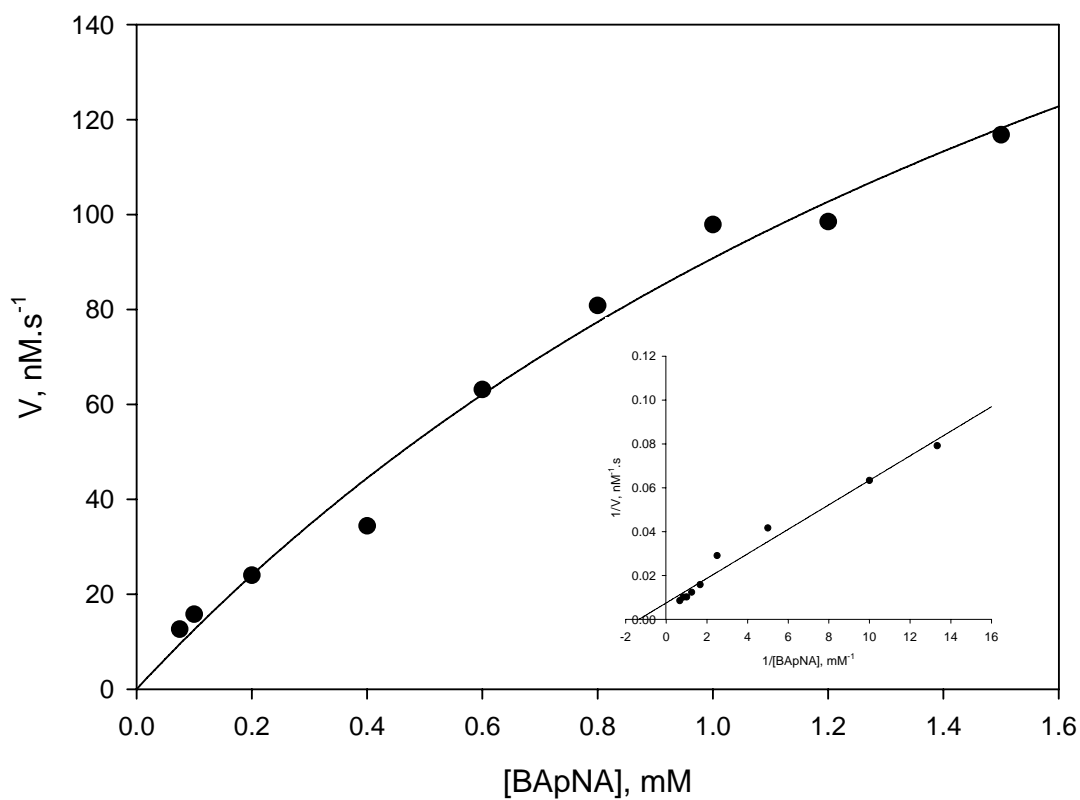


Figura 6: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno-protease, da Fração I, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BAPNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

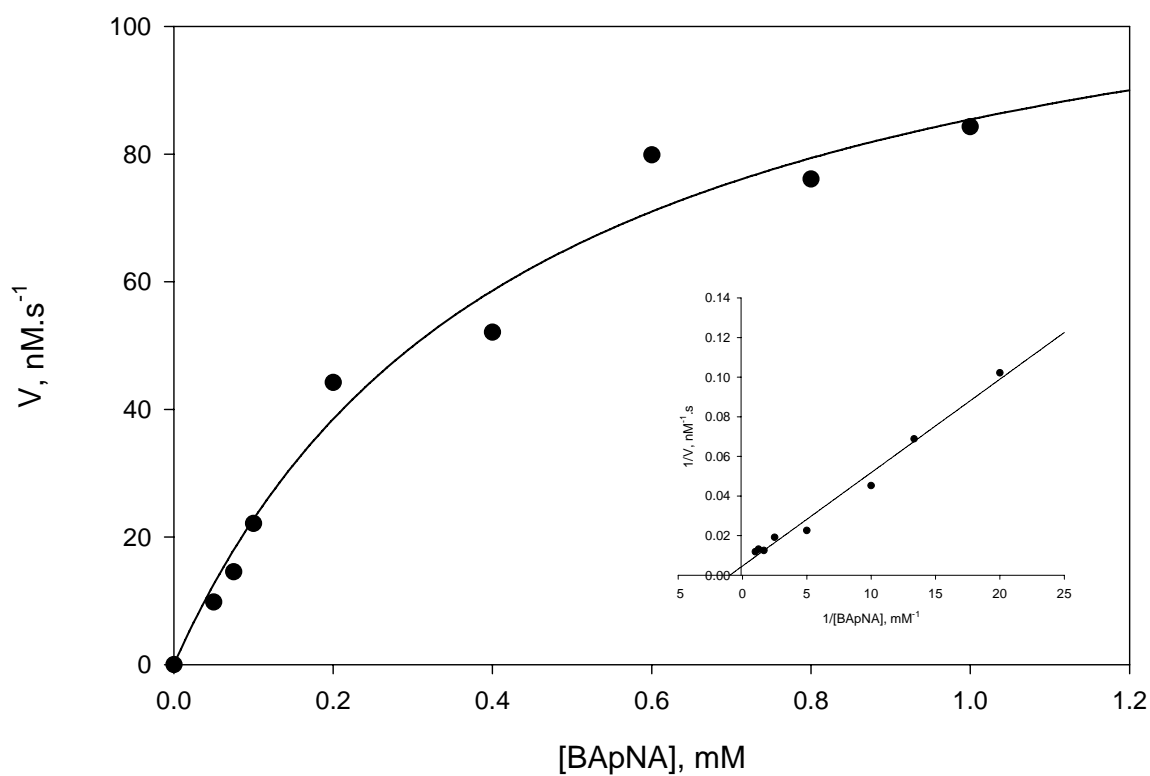


Figura 7: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno-protease, da Fração II, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

O Quadro 2 mostra valores de K_M e V_{max} obtidos de enzimas do intestino médio de *A. gemmatalis* utilizando como substrato L-BApNA. Como L-BApNA é o mesmo substrato de serino e cisteíno-proteases, provavelmente estas classes de enzimas possuem o sítio de especificidade S_1 muito semelhante. Percebe-se que o valor de K_M de cisteíno-proteases é bem maior do que o de serino proteases (OLIVEIRA *et al.* 2005, XAVIER *et al.* 2005), mostrando que o substrato utilizado L-BApNA tem mais afinidade por enzimas do tipo tripsinas-*like*.

Portanto, as serino-proteases são as principais enzimas presentes no intestino de *A. gemmatalis*, seguidas pelas cisteíno-proteases. Porém, dessa mesma forma, as serino-proteases são também alvo primário de inibidores de proteases produzidos pela planta em resposta ao ataque do inseto, sendo posteriormente bloqueadas as cisteíno-proteases.

Quadro 2: Propriedades da atividade enzimática do intestino médio de *A. gemmatalis*:

Espécie	Classe protease	Substrato	pH ótimo	K_M app	V_{max} app	Referências
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Fração I)	Cisteíno- protease	L-BApNA	8,0	2,28 mM	297,68 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Fração II)	Cisteíno- protease	L-BApNA	8,0	0,44 mM	122,95 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Fração I)	Serino- protease	L-BApNA	8,5	0,32 mM	0,48 μM. s ⁻¹	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2005
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Fração II)	Serino- protease	L-BAPNA	8,0	0,23 mM	21,8 nM. s ⁻¹	XAVIER <i>et al.</i> 2005

5.3. Efeito de E-64 sobre a atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

Os peptídeos epóxidos são um grupo de inibidores irreversíveis baseados no composto E-64 isolado por HANADA *et al.* (1978) de um extrato de *Aspergillus japonicus*. A inibição de proteases da família da papaína por E-64 resulta da ocupação de subsítios da enzima seguido por alquilação da cisteína da tríade catalítica pelo grupo trans epóxido (SALVESEN & NAGASE, 2001).

A Figura 8 apresenta o perfil do efeito de E-64 sobre cisteíno-proteases do intestino de *A. gemmatalis* utilizando como substrato L-BApNA. Em ambos os casos houve uma diminuição significativa ($p < 0,01$) de atividade quando comparado com o controle. A diminuição foi praticamente constante nas duas Frações, demonstrando que pequenas concentrações de E-64 são suficientes para inibir a atividade dessa protease, mostrando que são cisteíno-proteases papaína-like.

E-64 é um inibidor irreversível típico de cisteíno-proteases. Porém nem em altas concentrações ele consegue suprimir totalmente a atividade de cisteíno-proteases aqui analisadas, pois uma certa quantidade de enzima permanece com o centro ativo indisponível para ligação da molécula de E-64. Dessa forma uma parte das moléculas enzimáticas permanece livre e com uma atividade residual. Esse é o motivo pelo qual não se obteve uma inibição completa dessas enzimas.

ARANISHI, *et al.* (1997) e VISESSANGUAN *et al.* (2002) mostraram que 0,1mM de E-64 inibiu completamente cisteíno-proteases purificadas de carpas e de nematóides. ARANISHI, *et al.* (1997) mostram o efeito inibitório na atividade de catepsina B de carpas com o aumento da concentração de E-64 utilizando o substrato Z-Arg-Arg-MCA. A enzima foi parcialmente inibida da concentração $1,0 \times 10^{-11}$ M até $1,0 \times 10^{-7}$ M e completamente inibida acima dessa concentração ($5,0 \times 10^{-6}$ M até $1,0 \times 10^{-5}$ M).

ZHAO *et al.* (1998) trabalhando com a lagarta do algodão *Helicoverpa armigera*, mostraram que, tanto o extrato bruto como a enzima purificada de ovos dessa Lepdoptera, tiveram suas atividades inibidas por E-64 e por outros inibidores de cisteíno-protease. Outra evidência da perda de atividade de cisteíno-protease por E-64 é mostrada por D'AVILA-LEVY *et al.* (2003). A adição de

20 μ M de E-64 levou a atividade da cisteíno-protease cálcio dependente do tripanosoma *Crithidia deanei* a valores próximos de zero.

Nossos dados mostram uma concordância com aqueles encontrados por esses autores, pois a faixa de concentração de E-64 aqui estudada está na região de inibição parcial, mostrando uma cisteíno-protease papaína-*like* no intestino de *A. gemmatalis*.

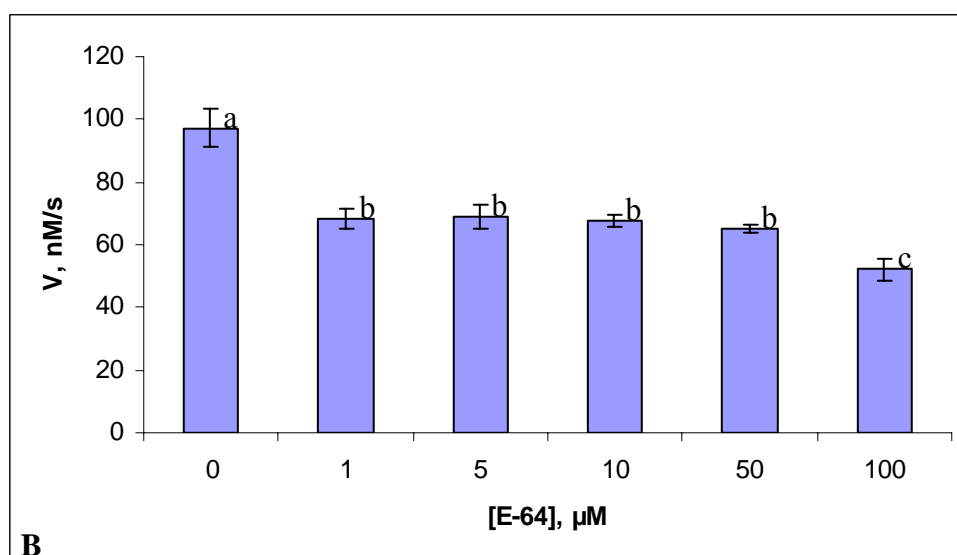
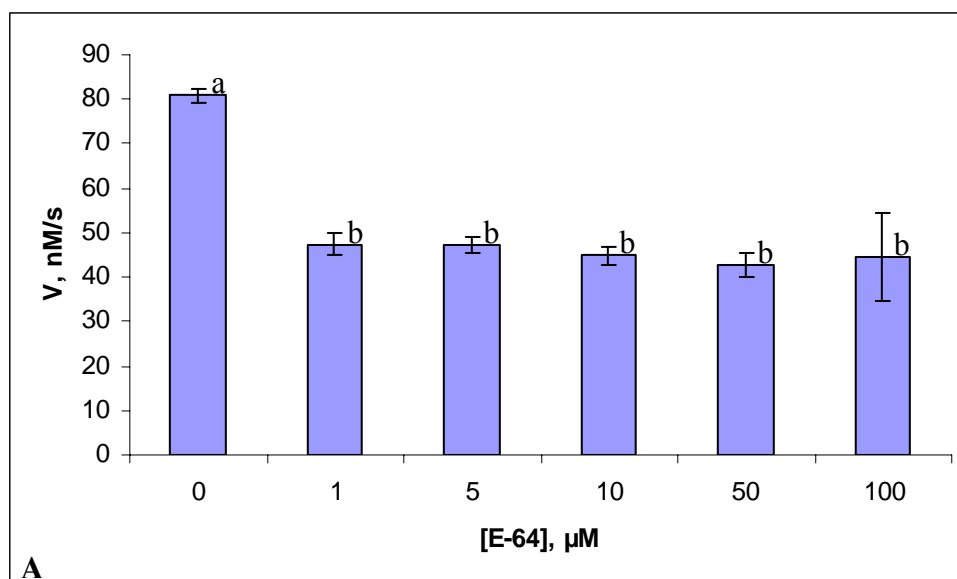


Figura 8: Efeito de E-64 na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A** – Efeito da concentração de E-64 sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de E-64 sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4. Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

As Figuras 9 A e B apresentam o efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo-proteases e quelante de íons Ca^{+2} , na atividade das Frações I e II respectivamente, sobre o L-BApNA. Na Fração I não ocorreu queda significativa ($p>0,01$) na atividade em nenhuma das concentrações de EDTA utilizadas na mistura de reação, mostrando que esses íons não são importantes para aumentar a atividade da enzima. Enzimas serino-proteases como tripsina possuem sítios de ligação para cálcio, aumentando a atividade enzimática como também ajudando a proteger a molécula de autólise (OLIVEIRA *et al.* 1993). Porém, pelos nossos resultados parece que íons cálcio não exercem estas mesmas propriedades em cisteíno-proteases de *A. gemmatalis* da Fração I.

ARANISHI *et al.* (1997) obtiveram resultados semelhantes. Trabalhando com Catepsina B de carpas *Cyprinus carpio*, demonstraram que o EGTA e EDTA não tiveram efeito sobre essa cisteíno-protease quando acrescentados à mistura de reação. Porém quando EDTA era adicionado juntamente com um agente sulfidrílico, como por exemplo 2-mercaptoetanol ou cisteína, essa atividade aumentava, sendo esses dois últimos reagentes potentes ativadores de cisteíno-protease. Para se medir a atividade de cisteíno-proteases o ensaio enzimático deve conter obrigatoriamente um agente redutor para garantir que a cisteína da tríade catalítica esteja na forma reduzida, impedindo-a de formar ponte dissulfeto, estando livre para catalisar a reação. Nossos resultados estão de acordo, pois todos os nossos testes continham um agente redutor (DTT).

FAHMY *et al.* (2004) também encontraram que EDTA não afetou a atividade de cisteíno-protease de trigo *Triticum aestivum*. Já KAMATA *et al.* (1995) e VISESSANGUAN *et al.* (2003) reforçam a idéia de que EDTA é um ativador de cisteíno-protease, pois as atividades de cisteíno-proteases do nematóide *Nippostrongylus brasiliensis* e de catepsina L foram aumentadas na presença de EDTA, respectivamente. VISESSANGUAN *et al.* (2003) ainda mostram que EDTA usado conjuntamente com um agente ativador de grupo tiol (também chamados de agentes redutores ou sulfidrílicos) aumentam a atividade de cisteíno-protease.

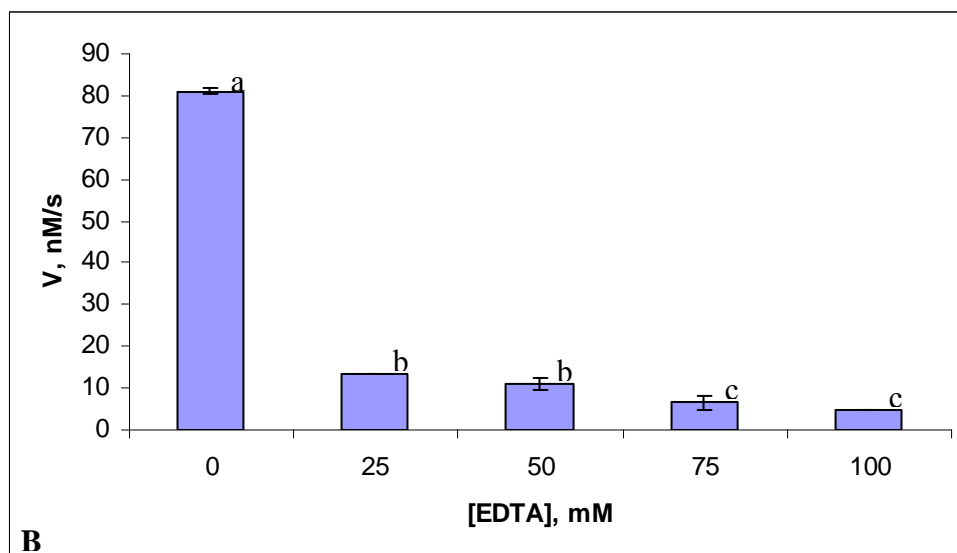
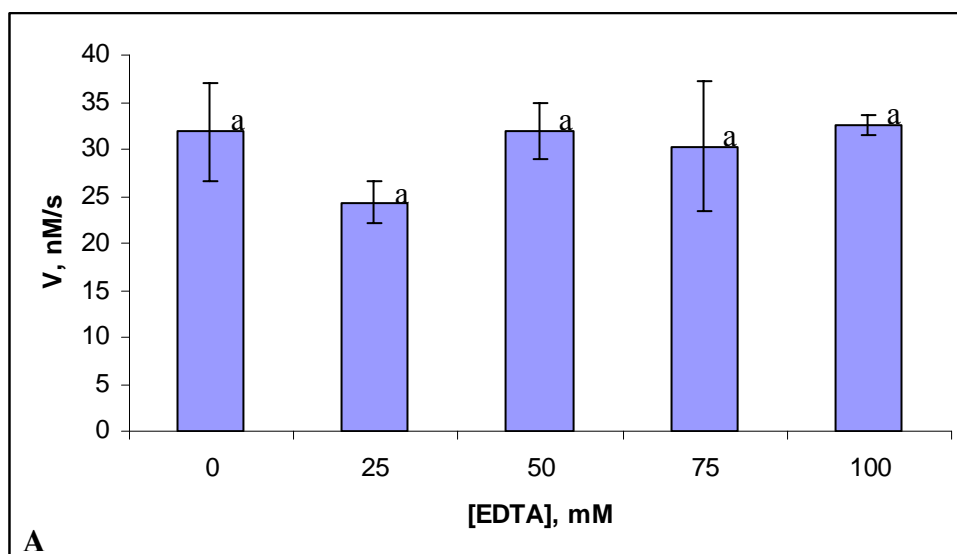


Figura 9: Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno-protease do extrato enzimático do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A** – Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na Fração II ocorreu decréscimo nos valores de atividades com o aumento da concentração de EDTA (Figura 9B), sendo significativamente diferentes ($p < 0,01$) os valores entre a atividade na ausência de EDTA e as atividades nas concentrações de 25, 50, 75 e 100mM de EDTA. Isso demonstra a necessidade de íons, provavelmente Ca^{2+} , para a atividade das cisteíno-proteases da Fração II do extrato do intestino médio de *A. gemmatalis*. Provavelmente as cisteíno-proteases da Fração II sejam estruturalmente diferentes daquelas da Fração I porém conservando o centro ativo, uma vez que os dados sugerem que as proteases da Fração II possuem sítios de ligação para cálcio. Neste caso o cálcio poderia estar protegendo contra autólise como também aumentando a atividade dessas cisteíno-proteases presentes na Fração II semelhante à suas propriedades em tripsinas (serino-proteases).

Dessa mesma forma D'AVILA-LEVY *et al.* (2003) mostraram ser a cisteíno-protease do tripanossomo *Crithidia deanei* cálcio dependente. O uso de EGTA aboliu completamente a atividade dessa protease e o de EDTA reduziu para 30% sua atividade. Além disso, testes com concentrações crescentes de CaCl_2 mostraram que a atividade foi aumentada nas concentrações de 5, 10 e 20 mM desse sal. A cisteíno-protease descrita por D'AVILA-LEVY *et al.* (2003) apresenta algumas características de calpaína. Calpaína refere-se a uma família cálcio dependente de cisteíno-proteases citosólicas expressas em mamíferos e que formam um heterodímero compreendendo uma subunidade catalítica de 80kDa e uma subunidade regulatória de 30kDa. Pouco é conhecido sobre a identidade de substratos *in vivo* para calpaínas e suas implicações fisiológicas são ainda indefinidas. Vários homólogos atípicos de calpaínas estão sendo detectados em alguns organismos como insetos, nematóides, fungos e leveduras (SORIMACHI *et al.* 1997). D'AVILA-LEVY *et al.* (2003) ainda acrescentam que a quantidade de cálcio que essas proteases requerem pode ser uma condição fisiologicamente relevante.

Comprovando a existência de cisteíno-proteases cálcio independentes e cálcio dependentes em um mesmo organismo, VALASAKI *et al.* (2007) encontraram esses resultados com cisteíno-proteases purificadas de *Lactobacillus helveticus*, sendo denominadas Lmm-protease-Lh e Hmm-protease-Lh respectivamente.

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

Podemos verificar pela Figura 10A que a atividade do extrato enzimático da Fração I frente ao L-BApNA foi significativamente menor ($p < 0,01$) em todas as concentrações de cálcio testadas. FAHMY *et al.* (2004) e MOHAMED *et al.* (2005) obtiveram um efeito inibitório de íons cálcio sobre atividade de cisteíno-proteases. MOHAMED *et al.* (2005) obtiveram uma diminuição de 83% da atividade de cisteíno-protease de trigo usando 2mM de CaCl_2 e FAHMY *et al.* (2004) uma diminuição de 21% da atividade de cisteíno-protease do platelminto *Fasciola gigantica*. Em contrapartida, ARANISHI *et al.* (1997) não observaram efeito inibitório de íons cálcio na atividade de cisteíno-protease de carpas *Cyprinus carpio*.

Já a atividade da Fração II (Fig. 10B) foi maior para todas as concentrações, não apresentando atividade na ausência de cálcio. Mais uma vez encontramos que as cisteíno-proteases da Fração II, ou seja, enzimas de membrana sensíveis ao EDTA, são cálcio-dependentes. Não houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre as concentrações 10, 20 e 30mM de CaCl_2 nas atividades enzimáticas da Fração II. Portanto, as enzimas da Fração II devem estar sendo estabilizadas por íons cálcio, além de ter suas atividades aumentadas. Possivelmente estas enzimas possuem sítios de ligação para íons Ca^{2+} os quais podem ter função de proteger contra autólise e melhorar a conformação do centro ativo aumentando a atividade em presença deste íon.

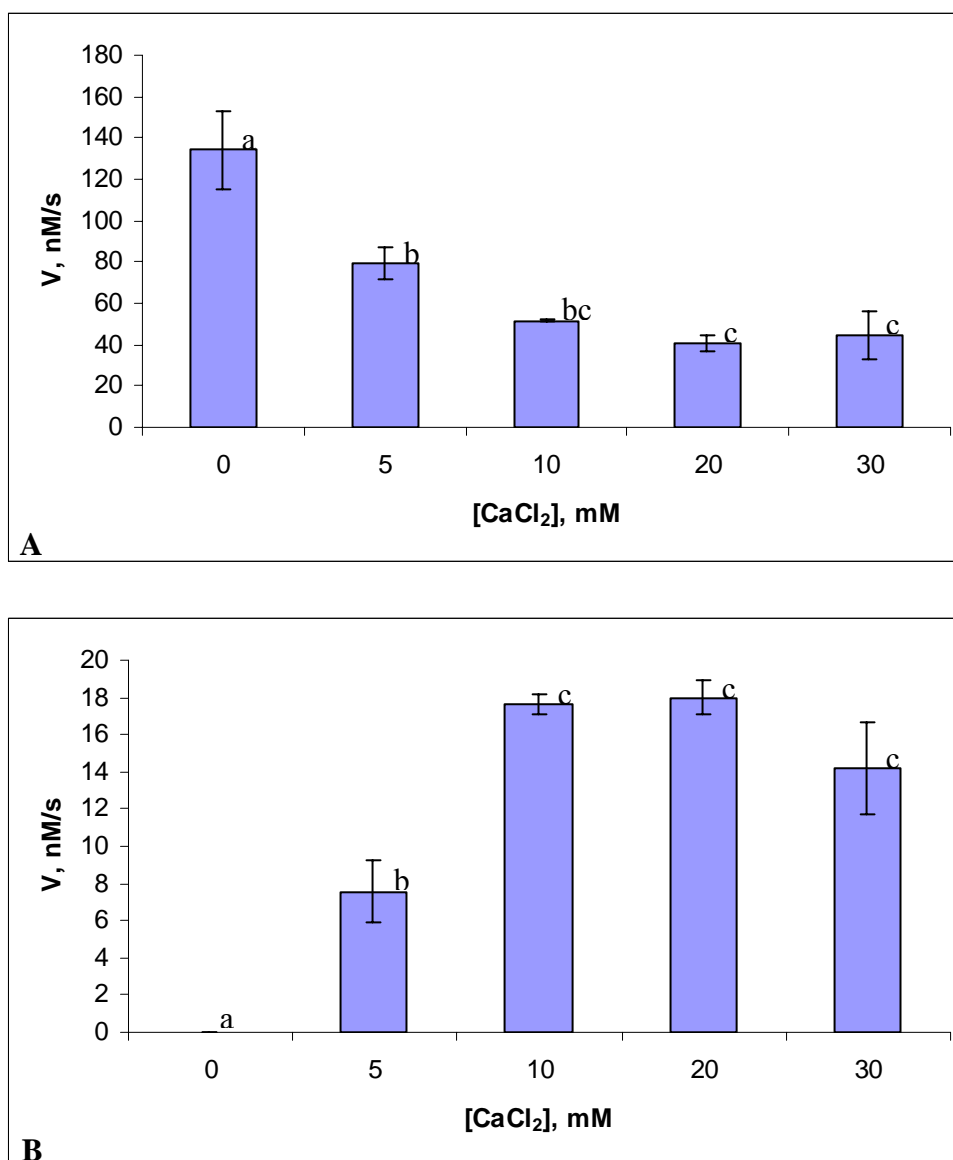


Figura 10: Efeito de íons cálcio na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A – Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

D'AVILA-LEVY *et al.* (2003) isolou uma cisteíno-protease cálcio-dependente do tripanosoma *Crithidia deanei*. O aumento da concentração de Ca^{2+} no meio de reação aumentou a atividade da enzima, chegando a uma atividade máxima em 5mM de CaCl_2 e quando na ausência de íons Ca^{2+} a enzima não apresentou atividade. Estes resultados são semelhantes aos obtidos na Fração II. VALASAKI *et al.* (2007) também caracterizaram uma cisteíno-protease cálcio-dependente de *Lactobacillus helveticus*. Esses resultados, conjugados com o efeito de EDTA sobre atividade de cisteíno-proteases de membrana (Fração II), mostram a exigência de íons Ca^{2+} para a atividade catalítica, devendo estar presente na concentração de 10mM.

Segundo SIPOS & MERKEL (1970) e VAJDA & GARAI (1981) o íon cálcio se liga 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, é comum ao tripsinogênio e a tripsina. Pelo fato de L-BApNA ser substrato para cisteíno e para serino-protease, a estrutura do centro ativo deve ser semelhante e conter sítios de ligação de cálcio. Assim, nossos resultados sugerem que as enzimas proteolíticas do tipo cisteíno-protease de *Anticarsia gemmatalis*, ligadas à membrana (Fração II) possivelmente estejam sendo estabilizadas pelos íons cálcio, levando a uma mudança na conformação das moléculas de enzimas e melhorando o posicionamento do centro ativo, acarretando assim aumento da atividade em presença de 10 a 30mM de íons cálcio.

5.6. Efeito de TLCK sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

Quando analisamos o efeito de TLCK sobre a atividade de cisteíno-protease do intestino médio de *A. gemmatalis*, observamos que tanto a Fração I (Fig.11A) quanto a Fração II (Fig. 11B), apresentaram diminuição crescente nos valores de atividade sobre L-BApNA com o aumento da concentração de TLCK. Na Fração I, o controle não apresentou diferença significativa com a menor concentração de TLCK utilizada. Porém todas as outras concentrações foram significativamente menores do que o controle ($p < 0,01$). A Fração II apresentou

comportamento semelhante ao mostrado para a Fração I, diferindo na concentração de 5 μ M de TLCK. Desde a menor concentração houve diferença significativa entre os tratamentos, além de todos esses, na Fração II, serem significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O 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). TLCK é geralmente classificado como inibidor de serino protease porque tem uma afinidade para resíduos de histidina em proteínas. Porém, a tríade catalítica de cisteíno-proteases possui uma histidina semelhante à tríade catalítica de serino-proteases. Como o substrato BApNA possui um resíduo de Arg se ligando ao sítio S₁ de serino-proteases e de cisteíno-proteases, o TLCK que também possui o resíduo de Lys ligando-se ao sítio S₁ do centro ativo de serino-proteases, também pode estar se ligando ao sítio S₁ de cisteíno-proteases. Este resultado acontece com outras enzimas como calicreínas. Dessa forma, sua hidrólise pode ser impedida não somente por inibidores de cisteíno-proteases mas também por inibidores de serino protease, o qual é susceptível a resíduos de histidina (BARICOS *et al.* 1988; BARRETT & KIRSCHKE, 1981; EVANS & ETHERINGTON, 1978; ARANISHI, *et al.* 1997). ARANISHI, *et al.* (1997) trabalhando com Catepsina purificada de carpas, demonstraram que essa cisteíno protease sofreu interferência negativa na presença de TLCK.

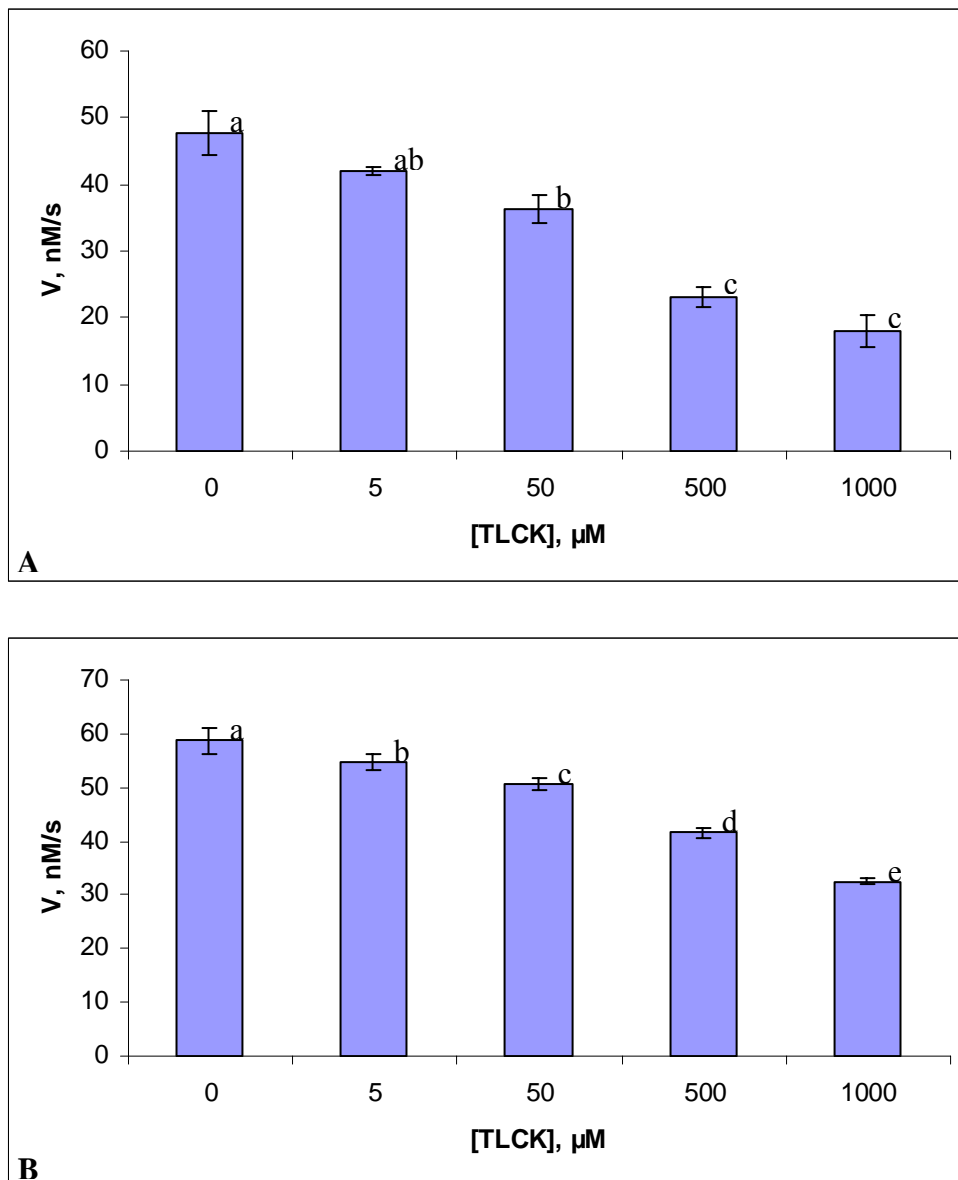


Figura 11: Efeito de TLCK na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A** – Efeito da concentração de TLCK sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de TLCK sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Assim, de acordo com o relatado na literatura, nossos resultados sugerem que cisteíno-proteases presentes nas Frações I e II estão possivelmente sofrendo alquilação de resíduos de histidina da tríade catalítica de seus sítios ativos causando conseqüente diminuição da atividade amidásica sobre o L-BApNA tal como demonstrado para tripsina.

5.7. Efeito de Pepstatina A sobre atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*

A Pepstatina A inibe as aspartil-proteases já caracterizadas, ou seja, pepsina, quimosina, catepsina D e renina. É um pentapeptídeo secretado por espécies de *Streptomyces* que contêm dois resíduos de estatina [(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid] que é um aminoácido raro (SALVESEN & NAGASE, 2001).

Quando analisamos o efeito de Pepstatina A na atividade de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis* sobre o L-BApNA verificamos que não houve efeito significativo ($p > 0,01$) em todas as concentrações analisadas na atividade da Fração I (Fig 12A). Na Fração II (Fig 12B), as concentrações 0,005, 0,5 e 10 μM diferiram significativamente ($p < 0,01$) do controle e das demais concentrações analisadas.

Analisando as atividades da Fração II em porcentagem do maior valor obtido, a atividade do controle, ou seja, na ausência de Pepstatina A e no valor de 76,39 nM/s, torna-se 100%. Os demais valores passam a ser de 91,32% para a concentração 0,005 μM de Pepstatina A, 99,18% para 0,05 μM , 91,32% para 0,5 μM , 97,51% para 1 μM e 91,32% para 10 μM . Talvez pelo fato da coincidência de três atividades terem dado o mesmo valor, a estatística acusou como diferente os demais resultados. KAMATA *et al.* (1995) e VISESSANGUAN *et al.* (2003) estudando cisteíno-proteases de nematóides e linguado respectivamente obtiveram valores de 98% e 56,9% na presença de Pepstatina A e mesmo assim disseram que suas enzimas estudadas não sofreram influência desse inibidor de aspartil-protease.

Nossos dados estão de acordo com FAHMY *et al.* (2004), pois Pepstatina A não influenciou a atividade de cisteíno-protease de trigo, obtendo um valor de 116% de atividade quando adicionado 1 μg desse inibidor. Pepstatina A também

não afetou a atividade de cisteino-proteases do extrato bruto de ovos da lagarta do algodoeiro (*Helicoverpa armigera*) nem mesmo quando essa enzima foi purificada por ZHAO *et al.* (1998).

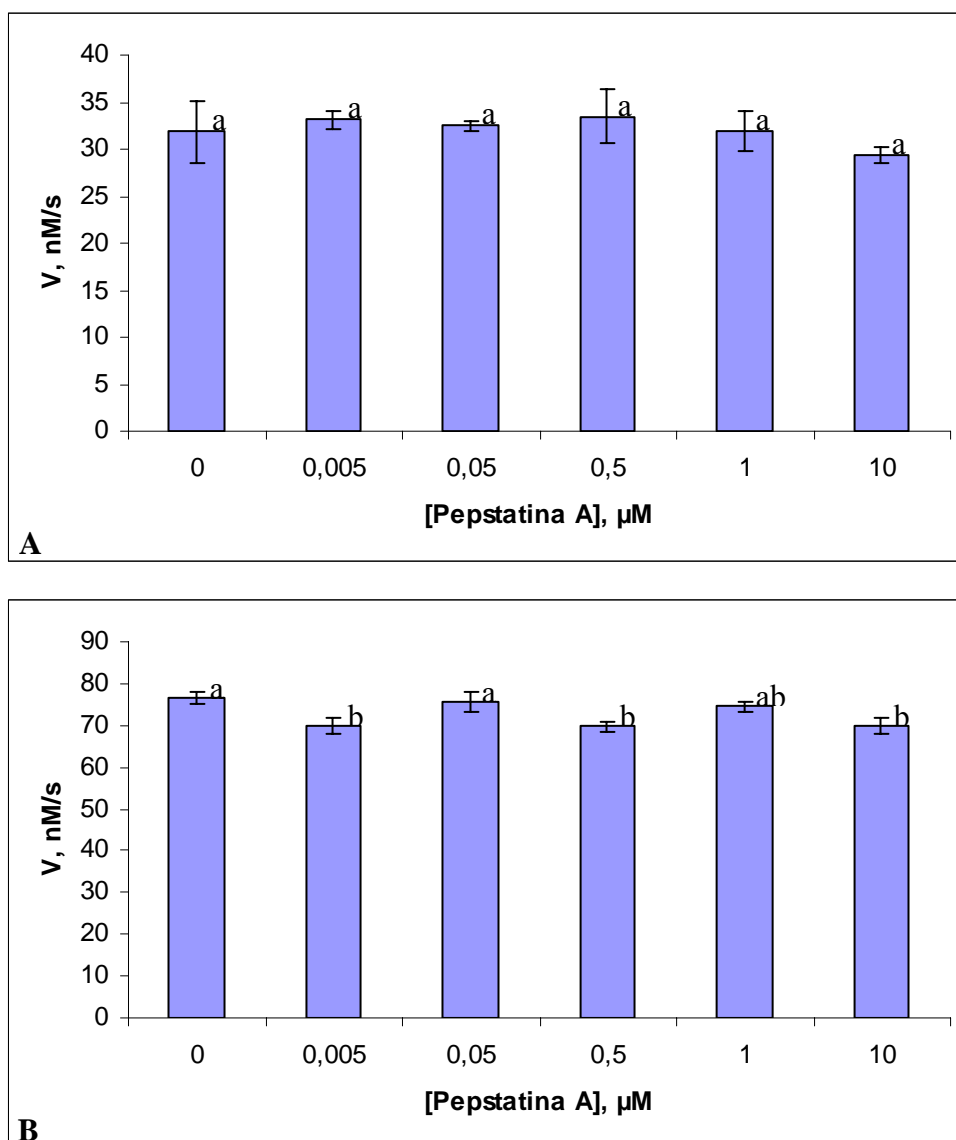


Figura 12: Efeito de Pepstatina A na atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. **A – Efeito da concentração de Pepstatina A sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração I do extrato enzimático sobre L-BApNA. **B** – Efeito da concentração de Pepstatina A sobre a atividade de cisteíno-proteases da Fração II do extrato enzimático sobre L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.**

Já foi demonstrada a presença de tripsinas-*like* (PILON *et al.* 2006, OLIVEIRA *et al.* 2005, XAVIER *et al.* 2005) no intestino de *A. gemmatalis* e também demonstrado que esta classe é importante no processo de interação planta-inseto. Durante o ataque de plantas de soja por insetos ocorre resposta da planta através de aumento de inibidores de tripsina-*like* (FORTUNATO *et al.* 2007, FORTUNATO *et al.* 2004, SILVA *et al.* 2002, SILVA *et al.* 2004). Assim, parece que o sistema de proteases tripsina-*like* e papaína-*like* são importantes na digestão pela *A. gemmatalis*.

Possivelmente inibidores de serino-protease produzidos pela planta estão inibindo as serino-proteases presentes no intestino do inseto, comprometendo a biodisponibilidade de aminoácidos necessários à biossíntese de proteínas durante o processo de seu crescimento e desenvolvimento. Dessa forma o inseto poderia responder através da síntese de maior quantidade de serino como também de cisteíno-proteases. No processo de defesa da plantas pela Via das Lipoxigenases, a qual produz inibidores de proteases quando atacada por insetos, seria promissor não somente a utilização de inibidores de proteases do tipo serino-proteases mas também de cisteíno-proteases, numa associação de inibidores para maior proteção da planta ao ataque de insetos praga.

6. CONCLUSÕES

- No presente trabalho realizamos caracterização bioquímica e cinética de cisteíno-proteases do extrato enzimático do intestino médio de *A. gemmatalis* da fração solúvel, Fração I e da fração insolúvel, Fração II.
- O pH no qual foi possível detectar maior atividade, utilizando o substrato L-BApNA foi 8,0 para ambas Frações. Um segundo pico foi verificado nos dois perfis, sendo o pH 3,6 para a Fração I e 4,6 para a Fração II. O efeito da temperatura foi testado com o mesmo substrato sendo que a Fração I mostrou uma maior atividade a 35⁰C e a Fração II a 60⁰C.
- Os valores de K_{Mapp} e V_{max} obtidos utilizando L-BApNA foi de 2,28 mM e 297.68 nM.s⁻¹ para a Fração I e de 0,44 mM e 122.95 nM.s⁻¹ para a fração II.
- Na análise do efeito de EDTA na atividade de cisteíno-protease, ficou provada a existência de dois grupos dessa enzima. A Fração I contém cisteíno-proteases que não dependem de íons divalentes, como Ca²⁺, para sua atividade. Já a Fração II contém cisteíno-proteases cálcio-dependentes, uma vez que em todas as concentrações de EDTA utilizadas a atividade foi significativamente (p<0,01) menor do que a atividade na ausência de EDTA.
- Já o efeito de íons Ca²⁺ nos confirma a necessidade desses íons para a atividade de cisteíno-proteases da Fração II, ou seja, essas cisteíno-proteases de membrana são cálcio-dependentes. E na atividade de cisteíno-proteases da Fração I, íons Ca²⁺ diminuíram a atividade, sendo essas cisteíno-proteases do extrato solúvel cálcio-independentes.
- O efeito de E-64 sobre ambas as Frações causou uma diminuição significativa (p<0,01) na atividade de cisteíno-proteases sobre o substrato L-BApNA. O efeito de TLCK na atividade dessas proteases ajuda a identificar o mecanismo catalítico utilizado na hidrólise do substrato. Apesar de ser um inibidor clássico de serino-protease, TLCK bloqueia histidina na tríade catalítica, provando ser esse aminoácido parte integrante

dessa catálise, uma vez que a atividade de ambas as Frações foi diminuída por esse inibidor.

- Pepstatina A não influencia a atividade de cisteíno-protease da Fração I. A Fração II sofreu algumas quedas de atividade na presença desse inibidor de aspartil-protease.
- Assim, os resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de 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 cisteíno-proteases.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVAREZ-FERNANDEZ, M., BARRETT, A.J., GERHARTZ, B., DANDO, P.M., NI, J., ABRAHAMSON, M. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. **Journal of Biological Chemistry** 274, 19195–19203. 1999.
- ARANISHI, F.; HARA, K.; KIYOSHI OSATOMI, K.; ISHIHARA, T. Purification and Characterization of Cathepsin B from Hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpi*. **Comp. Biochem. Physiol.** 117B:579–587, 1997.
- ASGIAN, J.L., JAMES, K.E., LI, Z.Z., CARTER, W., BARRETT, A.J., MIKOLAJCZYK, J., SALVESEN, G.S., POWERS, J.C. Aza-peptide epoxides: a new class of inhibitors selective for clan CD cysteine proteases. **Journal of Medicinal Chemistry** 45, 4958–4960. 2002.
- BAIRD, I.R.; MOSI, R.; OLSEN, M.; CAMERON, B.R.; FRICKER, S.P.; SKERLJ, R.T. '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. **Inorganica Chimica Acta** 359, 2736–2750. 2006.
- BARBARA K. A. Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) University of Florida. Number: EENY-151. September 2000. <http://creatures.ifas.edu/field/velvetbean>. Htm Acesso em outubro de 2004.
- BARICOS, W.H.; ZHOU, Y.; MASON, R.W.; BARRETT, A.J. Human kidney cathepsins B and L. **Biochem. J.** 252:301–304, 1988.
- BARRETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol.**, v. 244, p. 1-15, 1994.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Journal of Biological Chemistry** 382, 727–733. 2001.
- BROWN, S.L.; The University of Georgia. Image Number: 1432034. Abril de 2002. www.forestryimages.org. Acesso em Março de 2006.
- BRUNO, M.A., PARDO, M.F., CAFFINI, N.O., L'ÓPEZ, L.M.I. Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). **Acta Farm Bonaerense** 21, 51–56. 2002.
- CONTINI, E.; GASQUES, J.G.; SAAB, A.A.; BASTOS, E.T.; SILVA, L.F. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Acessória de Gestão Estratégica. Projeções do Agronegócio Mundial e Brasil 2006/07 a 2016/17. Dezembro de 2006. 61p.

- CROFT, K.P.C., JÜTTNER, F., SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiol.**, 101:13-24, 1993.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 420:1–8, 2003.
- EKICI, O.D., GOETZ, M.G., JAMES, K.E., LI, Z.Z., RUKAMP, B.J., ASGIAN, J.L., CAFFREY, C.R., HANSELL, E., DVORAK, J., MCKERROW, J.H., POTEMPA, J., TRAVIS, J., MIKOLAJCZYK, J., SALVESEN, G.S., POWERS, J.C. Aza-peptide Michael acceptors: a new class of inhibitors specific for caspases and other clan CD cysteine proteases. **Journal of Medicinal Chemistry** 47, 1889–1892. 2004.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. of Biochem. and Bioph.** v. 95, p. 271-278, 1961.
- EVANS, P.; ETHERINGTON, D.J. Characterization of cathepsin B and collagenolytic cathepsin from human placenta. **Eur. J. Biochem.** 83:87–97, 1978.
- FAHMY, A.S.; ALI, A.A.; MOHAMED, S.A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). **Bioresource Technology**, 91:297–304. 2004.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell.**, 4: 129-134, 1992.
- FISCHER, J., BECKER, C., HILLMER, S., HORSTMANN, C., NEUBOLN, C.B., SCHLERETH, A., SENYUK, V., SHUTOV, A., MÜNTZ, K. The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental pattern, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. **Plant Molecular Biology** 43, 83–101. 2000.
- FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; SILVA, C.H.O.; GUEDES, R.N.C.; MOREIRA, M.A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). ACEITO PARA PUBLICAÇÃO. **Journal of Pest Science**, 2007.
- FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; ALMEIDA, F.T.; PILON, A.M.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A. Effect of the *Anticarsia gemmatilis* injury on the

- lipoxigenases activity from soybean leaves. **Bioscience Journal**, 20: 37-46, 2004.
- FREDERICI, B.A. Ultrastructure of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FREDERICI, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC Press, 1986. v.1, p.61-88.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p., 2002.
- GARDNER, W.H. Recent investigation into the lipoxigenase pathway of plants. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1084: 221-239, 1991.
- GIANOTTI, A. Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular. São Carlos, SP, UFSCAR. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. 2008.
- HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. **Agric. Biol. Chem.** 42: 523-528. 1978.
- HERDE, M.; GÄRTNER, K.; KÖLLNER, T.G.; FODE, B.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J.; GATZ, C. & THOLLD, D. Identification and regulation of TPS04/GES, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. **The Plant Cell**, Vol. 20: 1152–1168, 2008.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature.**, 300:160-160, 1987.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 10, Documentos, 23p, 1985.
- KAMATA, I.; YAMADA, M.; UCHIKAWA, R.; MATSUDA, S.; ARIZONO, N. Cysteine protease of the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* preferentially evokes an IgE/IgG1 antibody response in rats. **Clin. Exp. Immunol.**102: 71-77, 1995.
- KIRSCHKE, H.; LANGNER, J.; WIEDERANDERS, B.; ANSORGE, S.; BOHLEY, P.; HANSON, H. Cathepsin H: An endoaminopeptidase from rat liver lysosome. **Acta Biol. Med. Germ.** 36:185–199, 1977.

- KONO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal** 37, 370–378. 2004.
- KUNAKBAEVA, Z., CARRASCO, R., ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure** 626, 209–216. 2003.
- LALITHA, S.; SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; NIELSEN, S.S. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 140, 227–235. 2005.
- 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.
- McKERRROW, J.H., ENGEL, J.C., CAFFREY, C.R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 7, 639–644. 1999.
- MOHAMED, S.A.; FAHMY, A.S.; MOHAMED, T.M.; HAMDY, S.M. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 142 :192 – 200, 2005.
- MOSCARDI, F. & SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotechnol. Ciênc. Desenv.**, v.24, p.22-29, 2002.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.
- MOTTRAM, J.C., HELMS, M.J., COOMBS, G.H., SAJID, M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends in Parasitology** 19, 182– 187. 2003.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochem. and Physiol.** v. 140(B), p. 369-380, 2005.
- OLIVEIRA, M.G.A.; ROGANA, E.; ROSA, J.C.; REINHOLD, B.B.; ANDRADE, M.H.; GREENE, L.J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 Is Part Of The Substrate Activation Binding Site Of Bovine Trypsin.. **The Journal of Biological Chemistry**, 268: 26893-26903, 1993.

- PARISI, M., MORENO, S., FERNANDEZ, G. Characterization of a novel cysteine peptidase from tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 38, 608–612. 2002.
- PEREIRA, M.T.; LOPES, M.T.P.; MEIRA, W.O.; SALAS, C.E. Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for This Enzyme. **Protein Expression and Purification** 22:249–257, 2001.
- PILON, A. M. ; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. . Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 23-29, 2006.
- PILON, A. M. Resposta bioquímica e fisiológica da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) ao inibidor de protease benzamidina. Viçosa, MG: UFV. 60p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pestic. Bioch. Physiol.** 86, 26-29. 2006.
- POMPE-NOVAK, M., POLSAK-PRIJATELJ, M., POPOVIC, T., STRUKELJ, B., RAVNIKAR, M. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60, 71–78. 2002.
- 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.
- RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research** 27, 325–331. 1999.
- RIBEIRO, B.M. & PINEDO, F.J. R. Baculovirus Recombinante para Controle de Praga- Construção de um Baculovirus *Anticarsia Gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (Agmnpv) Geneticamente Modificado para Controle da Lagarta da Soja, *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**. 22: 50-58, 2001.
- RIBEIRO, B.M.R. & PINEDO, F.J.R. Baculovirus recombinante para controle de praga. **Biotecnol. Ciênc. Desenv.**, v. 22, p.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.

- RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 28:425-449, 1990.
- SAFADI, F., MYKLES, D.L., REDDY, A.S.N. Partial purification and characterization of a Ca²⁺-dependent proteinase from *Arabidopsis* roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 348, 143–151. 1997.
- SALVESEN, G.S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. & BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. Oxford: Oxford University Press, 2001. cap 5, p. 105-130.
- SHAW, E.; MARES-GUIA, M.; COHEN, W. Evidence for an active center histidine in trypsin with the use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from N-alpha-tosyl-L-lysine. **Biochemistry**, 4: 2219-2224, 1965.
- 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 gemmatilis* Hübner.). **Arq. Inst. Biol.**, v.69, n.1, p.67-74. 2002.
- SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L.P.; PIOVESSAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSE, I.C.; MOREIRA, M. A. . Função Fisiológica de Lipoxigenases de Folhas de Soja submetidas ao ataque de Lagarta (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, 69: 67-74, 2002.
- SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; PIRES, C.V.; OLIVEIRA, J.A.; PILON, A.M.; PIOVESSAN, N.D.; MOREIRA, M.A. Função Bioquímica da Via das Lipoxigenases em Plantas de Soja Submetidas ao Ataque de Mosca Branca (*Bemisia argentifolii*). **Ciência e Agrotecnologia**, 28: 409-416, 2004.
- SIPOS, T. & MERKEL, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. **Biochemistry**. 9: 2766-2775, 1970.
- SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Structure and physiological function of calpains. **Biochem. J.** 328:721-732, 1997.
- SOUZA, M.L. Utilização de microrganismo na agricultura – uso de agentes microbianos na agricultura brasileira. **Biotechnologia – Ciência e Desenvolvimento**. n 21, julho/ agosto 2001.
- Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003. Manejo de Insetos-Pragas. Janeiro, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/manejoi.htm>> Acesso em: 10 de Abr. 2007.

- TERRA, W.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. **Digestive enzymes**. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 206-235, 1996.
- 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.R. & FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. As pragas também morrem pela boca. **Pesquisa Fapesp**. v. 54, p.20-27, 2000.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 109B(1): 1-62, 1994.
- TURNIPSEED, S.G.; KOGAN, M. Integrated control of insect-pests. In: WILCOX, J.R. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison: Agronomy. p.779-817, 1987.
- 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.
- VALASAKI, K.; STAIKOU, A.; THEODOROU, L.G.; CHARAMOPOULOU, V.; ZACHARAKI, P.; PAPAMICHAEL, E.M. Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. **Bioresource Technology**, 2007.
- VISSANGUAN, W.; BENJAKUL, S.; AN, H. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** 134:477-487, 2003.
- XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V.; DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Europ Journal of Biochem**. v.102, p.147-153, 2005.