

FRANCINY MARTINS PILON

**PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICO-ENZIMÁTICAS DE  
SERINO E CISTEÍNO PROTEASES PRODUZIDAS POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DO TRATO INTESTINAL DE  
*ANTICARSIA GEMMATALIS*.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

FRANCINY MARTINS PILON

PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICO-ENZIMÁTICAS DE SERINO  
E CISTEÍNO PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS  
DO TRATO INTESTINAL DE *Anticarsia gemmatalis*.

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

APROVADA: 10 de Julho de 2008.

---

Prof. Joel Antônio de Oliveira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges

---

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Presidente da Banca)

A Deus.

A meus familiares.

A minha mãe Lúcia Martins Pilon.

A meu pai Odemar Pilon.

A meu irmão Anderson Martins Pilon.

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao CNPq 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, pela paciência e confiança transmitida em todos os momentos;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, meu sincero muito obrigado pela força, pelas sugestões e idéias imprescindíveis, pelo estímulo e apoio demonstrados no decorrer do curso;

À Dra. Liliane Evangelista Visôto, pela amizade, pelas sugestões e idéias imprescindíveis no projeto e nas análises bioquímicas e microbiológicas, que foram de grande importância na realização deste trabalho;

Aos estagiários: Fabrício, Fernanda, Gepoliano, Amanda e Maíra, pela dedicação e valiosa contribuição aos trabalhos desenvolvidos;

Ao meu namorado Geraldo Majella Drago, pelo incentivo, companheirismo e amor, durante todo o decorrer deste curso;

As minhas companheiras de república, Tatiana, Alejara, Vanessa, Carla e especialmente a minha grande amiga e companheira de todas as horas Rosimeire Coura Barcelos pelo incentivo, pelas críticas e sugestões durante a realização deste trabalho;

Aos amigos dos Laboratórios de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e Peptídeos e Laboratório de Toxicologia: Liliane, Eduardo, Fabrícia, Angélica, Camila, Jeanne, Fabrício, Fernanda, Thiago, Rita, Zaira, Denise, Ronnie Von, José Fausto, Luciana e Kênia pela amizade e agradável convivência;

Ao secretário Eduardo Pereira Monteiro Montes do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela atenção e amizade;

A todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

Muito

Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Franciny Martins Pilon, filha de Odemar Pilon e Lúcia Martins Pilon, nasceu em 12 de setembro de 1983, na cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo.

Em Maio de 2002 iniciou os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em ambos em março de 2007.

Em março de 2007, 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 tese em 10 de Julho de 2008, a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Soja.....	4
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	5
2.3. Enzimas digestivas de insetos.....	7
2.3.1. Proteases.....	9
2.3.1.1. Serino Proteases (EC 3.4.21).....	9
2.3.1.2. Cisteíno Proteases (EC 3.4.22).....	11
2.3.1.3. Proteases de microrganismos.....	13
2.4. Microbiota bacteriana de insetos.....	14
2.5. Importância da microbiota bacteriana de inseto.....	17
2.5.1. Função nutricional da microbiota.....	17
2.5.2. Resistência à colonização.....	18
2.5.3 Interações Multitróficas.....	18
2.5.4. Transferência Gênica Bacteriana dentro do Intestino.....	19
2.5.5 Bactérias Intestinais Transgênicas no Biocontrole.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.1.1. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Estirpes bacterianas.....	21
4.2. Avaliação do meio de cultura para indução das proteases produzidas pelas bactérias e obtenção do extrato enzimático.....	21
4.3. Estudo da atividade proteásica sobre caseína utilizando eletroforese SDS-PAGE.....	21
4.4. Determinação da concentração de proteína.....	22

4.5. Caracterização das serino proteases bacteriana.....	22
4.5.1. Atividade Amidásica.....	22
4.5.2. Atividade esterásica.....	22
4.5.3. Efeito de pH e temperatura das serino proteases bacterianas.....	22
4.5.4. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade das serino proteases bacterianas.....	23
4.5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos na atividade das serino proteases bacterianas.....	24
4.5.6. Efeito de modificadores químicos na atividade das serino proteases bacterianas.....	24
4.6. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas.....	25
4.6.1. Atividades amidásica e esterásica.....	25
4.6.2. Efeito de pH e temperatura das cisteíno proteases bacterianas.....	25
4.6.3. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade das cisteíno proteases bacterianas.....	25
4.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos na atividade das cisteíno proteases bacterianas.....	25
4.6.5. Efeito de modificadores químicos na atividade das cisteíno proteases bacterianas.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. Avaliação do meio de cultura para indução da produção de serino e cisteíno proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> .....	27
5.2. Atividade proteásica sobre caseína utilizando eletroforese SDS-PAGE.....	29
5.3. Caracterização das serino proteases bacterianas utilizando o substrato amidásico L-BApNA.....	29
5.3.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica.....	29
5.3.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de serino proteases....	32
5.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-BApNA.....	33
5.3.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de serino proteases.....	35
5.3.4.1. Efeito de EDTA.....	35

5.3.4.2. Efeito de TLCK.....	37
5.3.4.3. Efeito de Aprotinina.....	38
5.3.4.4. Efeito de Pepstatina A .....	39
5.3.4.5. Efeito de E-64 .....	40
5.4. Caracterização das serino proteases bacterianas utilizando o substrato esterásico L-TAME.....	41
5.4.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade esterásico.....	41
5.4.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de serino proteases	43
5.4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-TAME.....	45
5.4.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de serino proteases.....	49
5.4.4.1. Efeito de EDTA.....	49
5.4.4.2. Efeito de TLCK.....	50
5.4.4.3. Efeito de Aprotinina.....	51
5.4.4.5. Efeito de Pepstatina A .....	52
5.4.4.5. Efeito de E-64 .....	53
5.5. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas utilizando o substrato L-BApNA.....	54
5.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica.....	54
5.5.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de cisteíno proteases.	56
5.5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-BApNA.....	57
5.5.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno proteases.....	59
5.5.4.2. Efeito de EDTA.....	59
5.5.4.1. Efeito de E-64.....	60
5.5.4.3. Efeito de TLCK .....	61
5.5.4.4. Efeito de Aprotinina.....	63
5.5.4.5. Efeito de Pepstatina A.....	64
5.6. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas sobre L-TAME.....	65
5.6.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade esterásica.....	65
5.6.2 Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de cisteíno proteases..	66
5.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-BApNA.....	68

5.6.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno proteases.....	72
5.6.4.1. Efeito de EDTA.....	72
5.6.4.2. Efeito de E-64.....	73
5.6.4.3. Efeito de TLCK.....	74
5.6.4.4. Efeito de Aprotinina.....	75
5.6.4.6. Efeito de Pepstatina A .....	76
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7. CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fase larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	5
Figura 2. Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos.	8
Figura 3. Mecanismo catalítico cisteíno-protease.....	12
Figura 4: Eletroforeses SDS-PAGE de proteases bacterinas.....	29
Figura 5: Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	30
Figura 6: Efeito da temperatura sobre a atividade de serino proteases bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	31
Figura 7: Efeito de íons cálcio sobre a atividade de serino proteases bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	33
Figura 8: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino protease, de <i>Staphylococcus xylosus</i> , isolado do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA.....	34
Figura 9: Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	36
Figura 10: Efeito de TLCK sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	37
Figura 11: Efeito de Aprotinina sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	38
Figura 12: Efeito de Pepistatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	39
Figura 13: Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-	

BAPNA.....	40
Figura 14: Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	42
Figura 15: Efeito de temperatura sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	43
Figura 16: Efeito de íons cálcio sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	44
Figura 17: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino-protease, de <i>Bacillus cereus</i> , isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME.....	45
Figura 18: Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	49
Figura 19: Efeito de TLCK sobre as atividades de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	50
Figura 20: Efeito de Aprotinina sobre as atividades de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	51
Figura 21: Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	52
Figura 22: Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	53
Figura 23: Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BAPNA.....	54

Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	55
Figura 25: Efeito de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	57
Figura 26: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno protease, de <i>Bacillus cereus</i> , isolado do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA.....	58
Figura 27: Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	60
Figura 28: Efeito de E-64 sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	61
Figura 29: Efeito de TLCK sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	62
Figura 30: Efeito de Aprotinina sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	63
Figura 31: Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA.....	64
Figura 32: Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	65
Figura 33: Efeito de temperatura sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	66
Figura 34: Efeito de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato	

L-TAME.....	67
Figura 35: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno-protease, de <i>Bacillus cereus</i> , isolado do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME.....	68
Figura 36: Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	72
Figura 37: Efeito de E-64 sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	73
Figura 37: Efeito de TLCK sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	74
Figura 38: Efeito de Aprotinina sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	75
Figura 39: Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-TAME.....	76
Tabela 1: Sistemas-tampão utilizado na avaliação da atividade de proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> .....	23
Tabela 2 – Temperatura e Tampões de maior atividade das serino proteases bacterianas.....	24
Tabela 3– Temperatura e Tampões de maior atividade das cisteíno proteases bacterianas.....	26
Tabela 4: Atividade específica de proteases detectada nos sobrenadantes das culturas das bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	28
Tabela 5: Parâmetros cinéticos de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sobre o substrato L-BApNA.....	35
Tabela 6: Parâmetros cinéticos de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sobre o substrato L-TAME.....	46
Tabela 7: Propriedades das atividades enzimáticas de proteases presentes extratos	

do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> (produzidas pelos insetos) e proteases presentes em extratos de bactérias isoladas do seu trato intestinal.....	48
Tabela 8: Parâmetros cinéticos de cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sobre o substrato L-BApNA.....	59
Tabela 9: Parâmetros cinéticos de cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> sobre o substrato L-TAME.....	70
Tabela 10: Propriedades das atividades enzimáticas de proteases presentes extratos do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> (produzidas pelos insetos) e proteases presentes em extratos de bactérias isoladas do seu trato intestinal.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BANA:  $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginina- $\beta$ -naftilamida
- BHI: infusão cérebro coração
- BSA :Albumina do soro bovino
- EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
- EGTA :ácido etilenoglicoltetraacético
- E-64 : N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
- kDa : kilodalton
- $K_{M\ app}$ : constante de Michaelis-Menten aparente
- L-BApNA: N-benzoil-L-argininil *p*-nitroanilida
- L-TAME: N $\alpha$ -tosil-L-arginil metil éster
- LeuNA: L-leucina- $\beta$ -naftilamida(Leu-NA)-hidrolizado
- MM: massa molecular
- Suc-FR-pNA :succinil-fenilalanil-arginil-*p*-nitroanilida
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
- TLCK: 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona
- Tris: Tris (hidroximetil) amino metano
- $V_{\max\ app}$  : Velociade máxima aparente
- Z-Arg-Arg-MCA :arginil-arginil-4-metil-7-coumarilamida

## RESUMO

PILON, Franciny Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008.

**Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.**  
Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon, Joel Antônio de Oliveira, Liliane Evangelista Visôto e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra infestação de insetos e patógenos. A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes ao ataque de insetos é uma estratégia promissora. Porém, para que isso ocorra é importante que a planta expresse uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais. Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto, a bioquímica de sua digestão e a microbiota local. Recentemente foram isoladas diversas bactérias proteolíticas do intestino da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Todas foram capazes de produzir quantidades significativas de proteases quando cultivadas em meio de cultura adequado. Neste contexto o presente trabalho fundamentou-se em caracterizar as serino e cisteíno proteases provenientes de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*, isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. As culturas bacterianas foram inoculadas em meio de cultura infusão cérebro coração (BHI) acrescidos de 0,1% de soro albumina bovina (BSA) mantidas a 37°C, a 200 rpm em agitador. Os extratos enzimáticos foram obtidos através de centrifugação das culturas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Todas as serino e cisteíno proteases foram capazes de hidrolisar a caseína, e os substratos sintéticos L-BApNA e L-TAME. Verificou-se pronunciada atividade das serino proteases em pH 8,5 para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. gallinarum*, e em pH 7,5 para *E. mundtii* e temperaturas de maior atividade a 25°C para *B. cereus*, a 30°C para *S. xylosum* e *E. mundtii* e 35°C para *E. gallinarum* sobre os substratos L-BApNA e L-TAME. Para as cisteíno proteases de todas as bactérias verificou-se maior atividade em pH 7,5 frente os substratos L-BApNA e L-TAME. O efeito da temperatura para as cisteíno proteases bacterianas sobre os substratos L-BApNA e L-TAME mostraram maior atividade a 35°C para *B. cereus* e *S. xylosum*, 25°C para *E. mundtii* e 30°C para *E. gallinarum*. Os valores de  $K_{Mapp}$  para serino proteases

utilizando L-BApNA foram de 0,15 mM, 0,12 mM, 0,14 mM, e 0,26 mM respectivamente, para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*. Os valores de  $K_{Mapp}$  determinados nos ensaios com o substrato L-TAME foram de 12,4  $\mu$ M, 48,4  $\mu$ M, 18,2  $\mu$ M e 45,2  $\mu$ M, respectivamente, para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*. Para cisteíno proteases utilizando L-BApNA os valores de  $K_{Mapp}$  obtidos foram de 0,67 mM, 0,63 mM, 0,67 mM, e 0,270 mM, respectivamente para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, e com substrato L-TAME foram de 0,11 mM, 0,13 mM, 0,12 mM e 0,16 mM respectivamente, para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*. Na análise do efeito de íons cálcio na atividade proteolítica frente os L-BApNA e L-TAME, observou-se que as atividades das serino e cisteíno proteases presentes nos extratos bacterianos aumentaram em presença de  $CaCl_2$ . O efeito de vários inibidores de proteases também foi avaliado, usando L-BApNA e L-TAME como substratos. Com relação ao efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e quelante de íons  $Ca^{+2}$ , verificou-se uma diminuição na atividade amidásica e esterásica com o aumento da concentração de EDTA na mistura de reação para as serino e cisteíno proteases bacterianas. Os inibidores de serino proteases TLCK (irreversível) e Aprotinina (competitivo) diminuíram significativamente a atividade das serino proteases bacterianas. O inibidor de cisteíno proteases E-64 não influenciou as serino proteases bacterianas, o contrário foi observado para as cisteíno proteases produzidas pelas bactérias, onde ocorreu queda na atividade amidásica e esterásica frente o inibidor E-64. Um aumento de TLCK no meio fez com que a atividade das cisteíno proteases bacterianas diminuísse gradativamente, fato atribuído à reação desse inibidor com resíduo de aminoácido histidina na tríade catalítica de cisteíno proteases. A Aprotinina, não influenciou as cisteíno proteases bacterianas. Pespstatina A, inibidor de aspartil proteases não influenciou as serino nem as cisteíno proteases bacterianas. Assim, os resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de proteases sobre a atividade das proteases produzidas por *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* concluem que essas bactérias sintetizam e excretam no lúmen intestinal de *A. gemmatalis*, enzimas da família das serino e cisteíno proteases.

## ABSTRACT

PILON, Franciny Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2008.

**Biochemical and kinetic enzymatic properties of serine and cysteine proteases produced by bacteria isolated from intestinal tract of *A. gemmatalis*.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisers: Andrea de Oliveira Barros Ribon, Joel Antonio de Oliveira, Liliane Evangelista Visôto and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Protease inhibitors are involved in the plant defense mechanism against infestation by insects and pathogens. Use of genes encoding inhibitors of digestive enzymes offer a promising strategy to produce plants resistant to insect attack. In order for this to occur, however, the plant will need to express a combination of inhibitors that cover the full spectrum of intestinal proteases. Insect physiology, biochemistry of digestion and local microbiota should therefore be considered. A number of intestinal proteolytic bacteria have been recently isolated from the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). All of them were able to produce significant quantities of proteases when grown in appropriate culture medium. The present study aimed at characterizing serine and cysteine proteases from *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of *A. gemmatalis*. Bacteria were inoculated in brain heart infusion broth (BHI), added of 0.1% bovine serum albumin (BSA) and incubated at 37°C in a rotary shaker (200 rpm). Enzymatic extracts were obtained by centrifuging bacterial cultures at 10000 rpm for 20 minutes at 4°C. All serine and cysteine proteases were able to hydrolyze casein, and synthetic substrates L-BApNA and L-TAME. There was high serine protease activity at pH 8.5 for *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. gallinarum*, and at pH 7.5 for *E. mundtii* and high activity at the temperatures 25°C for *B. cereus*, 30°C for *S. xylosum* and *E. mundtii* and 35°C for *E. gallinarum* on the substrates L-BApNA and L-TAME. Cysteine proteases of all bacteria increased activity at pH 7.5 in the substrates L-BApNA and L-TAME. The activity of bacterial cysteine proteases on the substrates L-BApNA and L-TAME increased at 35°C for *B. cereus* and *S. xylosum*, 25°C for *E. mundtii* and 30°C for *E. gallinarum*.  $K_{Mapp}$  values for serine proteases using L-BApNA were 0.15 mM, 0.12 mM, 0.14 mM, and 0.26 mM for *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* and *E. gallinarum* respectively.  $K_{Mapp}$  values determined in tests of serine proteases with L-TAME substrate were 12.4  $\mu$ M, 48.4  $\mu$ M, 18.2  $\mu$ M and 45.2  $\mu$ M for *B. cereus*, *S.*

*xylosum*, *E. mundtii* and *E. gallinarum* respectively. Cysteine proteases with L-BApNA produced  $K_{Mapp}$  of 0.67 mM, 0.63 mM, 0.67 mM, and 0.270 mM for *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* and *E. gallinarum* respectively, and with L-TAME were 0.11 mM, 0.13 mM, 0.12 and 0.16 mM mM for *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* and *E. gallinarum* respectively. The analysis of the effect of calcium ions on the proteolytic activity using L-BApNA and L-TAME showed that the activity of serine and cysteine proteases in bacterial extracts increased in presence of  $CaCl_2$ . The effect of several protease inhibitors was also evaluated using L-BApNA and L-TAME as substrates. EDTA, as inhibitor of metal mediated proteases and chelator of  $Ca^{+2}$  ions, caused decrease in amidasic and esterasic activities with increase of EDTA concentration in the reaction mixture of serine and bacterial cysteine proteases. Serine protease inhibitors TLCK (irreversible) and aprotinine (competitive) significantly decreased bacterial serine protease activity. The cysteine protease inhibitor E-64 did not affect bacterial serine proteases, but decreased the amidasic and esterasic activity of bacterial cysteine proteases. Increase in TLCK concentration in the medium has gradually decreased the bacterial cysteine protease activity, which was attributed to the reaction of the inhibitor with the histidine residue in the catalytic triad of cysteine proteases. Aprotinine did not affect bacterial cysteine proteases. Pespstatine A, an aspartyl protease inhibitor, did not affect serine nor cysteine proteases. Thus, the kinetic characterization and effects of protease inhibitors on the activity of proteases produced by *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* and *E. gallinarum* led to the conclusion that these bacteria synthesize and release enzymes of the family serine and cysteine proteases into the intestinal lumen of *A. gemmatalis*.

# 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, sendo cerca de 10-20% atribuídos a insetos (SILVA-FILHO e FALCO, 2000; FERRY *et al.*, 2006). Os insetos não apenas provocam perdas na produtividade diretamente pelo ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (HILDER E BOULTER, 1999). Estas perdas ocorrem mesmo com o uso de pesticidas e fungicidas, contudo sem o uso destes produtos, ou outras estratégias de controle não-químico, atingem 70% da produção das culturas no mundo, representando um prejuízo de 400 bilhões de dólares (LAWRENCE E KOUNDAL, 2002).

Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização de agroquímicos (LAWRENCE E KOUNDAL, 2002), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as conseqüências ambientais inaceitáveis e a própria pressão de consumidores contra essa prática, têm provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna.

A soja é um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país. É plantada praticamente em todo território nacional e pelo levantamento da safra 2006/2007 realizado em janeiro de 2007 pela Conab (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) a área cultivada corresponderia a 20,7 milhões de hectares, com uma produção de 54,87 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2007).

As plantas possuem um complexo sistema de autodefesa contra patógenos e herbívoros. Algumas das defesas químicas são constitutivas, formando barreiras físicas ou biológicas contra os organismos invasores, outras são ativas e induzidas por ocasião do ataque à planta. A resposta ao dano causado na planta pode ser local ou sistêmica, sendo muitos destes compostos químicos de defesa denominados “metabólitos secundários” e produzidos a partir de uma via biossintética especializada. Entretanto, algumas moléculas ativas na planta possuem papéis primários na defesa, a exemplo de inibidores de protease e lectinas, que funcionam também como proteínas de reserva em sementes, e os complexos estruturais como a lignina (RYAN e JAGENDORF, 1995).

Na tentativa de controlar o ataque de pragas, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos. Resistência a pragas está presente em algumas plantas tais

como em algumas variedades de soja. Essa resistência não proporciona uma completa proteção a soja, apenas diminui o ataque do inseto a planta, que passa a consumi-la de forma mais lenta, como no caso da *Anticarsia gemmatalis*. Neste processo, há uma diminuição no ganho de peso da lagarta e, conseqüentemente, o que resulta em menor taxa de crescimento no próximo estágio do ciclo de vida do inseto (BEACH e TODD, 1988, PILON, 2006).

A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos, é uma estratégia considerada como promissora (FERRY *et al.*, 2006; GATEHOUSE e GATEHOUSE, 2006). Em 2003, nos Estados Unidos a cultura de seis espécies de plantas, inclusive a soja, modificadas com um único gene de resistência a insetos, resultou em uma produção adicional de 2,4 milhões de toneladas de alimentos e uma redução correspondente a 21.000 toneladas na aplicação de pesticidas (CHRISTOU *et al.*, 2006). Neste contexto, são consideradas como estratégias promissoras para o controle de insetos-praga, a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas ou a produção de potentes peptídeos inibidores de proteases, como também a produção de peptídeos ou peptídeos miméticos.

No caso de genes de inibidores, é importante que a planta expresse uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais. Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto, a microbiota associada ao trato digestivo, a bioquímica da sua digestão e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pela lagarta e ou pela microbiota associada, que permitirá inferir que tipo de inibidores a planta produz em resposta ao ataque da praga (FRANCO *et al.*, 2002). Neste sentido, os inibidores de proteases apresentam como substâncias com grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento, podendo chegar até à morte.

A *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja, é considerada uma das pragas-chave da sojicultura, sendo economicamente importante em função das perdas que ocasionam a esta lavoura. Vários estudos ligados a caracterização das proteases digestivas deste inseto já foram realizados (OLIVEIRA *et al.*, 2005, XAVIER *et al.*, 2005; PILON, *et al.*, 2006).e recentemente, foram realizados estudos sobre a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis*. Foram isoladas diversas bactérias proteolíticas cultiváveis do intestino da lagarta-da-soja, que se mostraram capazes de produzir quantidades significativas de proteases quando cultivadas em meio de cultura adequado para produção dessas enzimas. Também foi demonstrado que a diminuição das

populações bacterianas em razão da administração de doses crescentes de tetraciclina a lagarta-da-soja reduziu significativamente a atividade amidásica de proteases presentes no intestino desse inseto (VISÔTTO, 2007).

Existe, portanto, evidências de que, além das proteases produzidas pelas próprias células de *Anticarsia gemmatalis*, há também proteases que são sintetizadas por microrganismos presentes no trato intestinal desses insetos. Muitos desses microrganismos são simbiontes e contribuem com as complexas vias bioquímicas, ajudando no metabolismo do seu hospedeiro (VISÔTTO, 2007). Essas relações simbióticas ajudam a definir o perfil metabólico do inseto, contribuindo para uma eficiente transformação de macromoléculas a nutrientes essenciais (BRENNAN *et al.*, 2004). O fato das bactérias possuírem características metabólicas distintas das dos insetos e faz com que ajam como “microrganismos corretores”, capacitando insetos filófagos a superar barreiras bioquímicas (DOUGLAS, 1998).

No presente trabalho objetivou-se a caracterização de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* envolvidas no mecanismo de digestão protéica deste inseto. Os resultados advindos desse estudo além de aumentar o conhecimento sobre a interação inseto-microrganismo, poderá servir como complemento para pesquisas futuras sobre implementação de novos métodos direcionados ao controle de pragas.

## 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 a 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).

O FABRI (Food and Agricultural Policy Research Institute) estima que na safra 2015-16 a produção mundial de soja alcançará 277 milhões de toneladas (+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 o FABRI. A participação dos EUA esta 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 encontra-se sujeita ao ataque de insetos durante praticamente todo o seu ciclo. Logo após a emergência, insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae), os córos e a broca-do-colo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e a broca-das-axilas *Epinotia aporema* (Walsinhgan) (Lepidoptera: Tortricidae) atacam as plantas durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até durante a floração. No

início da fase reprodutiva, é comum o ataque de percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Lepidoptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), que causam danos desde a formação das vagens até o desenvolvimento final das sementes. Além destas, a soja pode ser atacada por outras espécies de insetos, em geral menos importantes do que as referidas anteriormente (EMBRAPA, 2006). Nesse sentido, o uso de cultivares resistentes às pragas é uma das soluções mais viáveis para tentar diminuir o impacto de herbívoros.

## 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. Dentre as pragas da soja é considerada como o principal inseto desfolhador, podendo causar diminuição significativa na produção (GALLO *et al.*, 2002).



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

Na fase adulta de *A. gemmatalis*, que dura em média 15 dias, a mariposa apresenta envergadura de 30 a 38 mm e coloração variando de cinza, marrom avermelhado ou amarelado, sem dimorfismo sexual. A oviposição ocorre na face inferior das folhas e pode durar até 3 dias, sendo os ovos são arredondados e achatados na superfície inferior, medindo de 1 a 2 mm de diâmetro e apresentando cor branca a esverdeado até a eclosão, após a qual adquirem coloração rosa. O período larval pode durar até 25 dias e pode ocorrer 6 instares. A lagarta pode atingir até 48 mm 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 e atingem um comprimento médio de 25 mm, e quando adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais. O estágio pupal dura em média 7 dias e as pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20 mm no comprimento e 4 a 6 mm na largura, sendo encontradas abaixo da superfície do solo, a uma profundidade de aproximada de 2 cm (BARBARA, 2000).

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. Elas comem tanto o limbo como as nervuras e podem ocasionar 100% de desfolhamento até atingirem o seu desenvolvimento máximo e se tornarem pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 h (GALLO *et al.*, 2002).

Vários parasitóides atacam a lagarta da soja, sendo o predominante *Winthemia rufopicta* (Bigot) (Diptera: Tachinidae). Os parasitóides são vários podem variar de ano a ano e de local para local, sendo que também 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, porém a predação por eles realizada tem se mostrado insignificante no controle da lagarta da soja (BARBARA, 2000).

*A. gemmatalis* é susceptível ao nucleopoliedrovírus (NPV) e ao *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (RICHTER & FUXA, 1984). O baculovírus anticarsia (nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis*) infecta sítios no epitélio do intestino médio do inseto, 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 e é o maior programa com bioinseticida natural do mundo, em termos de área tratada. A sua aplicação no Brasil ocorre em área superior a 1 milhão de hectares e vem resultando em uma economia anual superior a 10 milhões de dólares e com expressivos benefícios ambientais, em razão da economia de 1.400.000 litros de inseticidas químicos (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. Os estudos recentes sobre baculovírus recombinantes para uso

no controle de pragas tem sido desenvolvidos com o objetivo de se introduzir 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 em razão da 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).

Para crescerem, se desenvolverem e se reproduzirem os insetos em geral requerem os mesmos aminoácidos essenciais aos mamíferos. Esses aminoácidos essenciais devem ser obtidos de uma dieta protéica e para isso os insetos aparentemente alimentam-se de todos os compostos orgânicos, de madeira a folhas, flores, raízes, tuberos, néctar, sementes, animais vivos, restos de outros organismos, sangue e de outros insetos, fungos e bactérias (MURDOCK E SHADE, 2002; FORTUNATO *et al.*, 2007). Essa plasticidade teria sido conferida pela diversidade de enzimas digestivas que podem ser encontradas no intestino médio desse grupo de organismos, conferindo-lhes as habilidades de consumir e utilizar com eficiência uma grande variedade dos recursos alimentares (TERRA *et al.*, 1996).

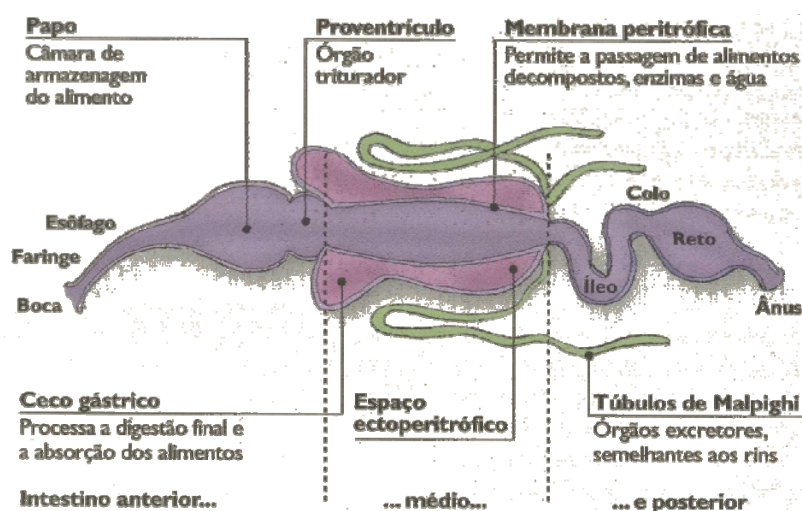
O intestino médio dos lepidópteros tem sido alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, já que várias espécies de insetos desta ordem são de grande interesse econômico (XAVIER *et al.*, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2005, PILON *et al.*, 2006, FORTUNATO *et al.*, 2007). Já foi demonstrado por Santos *et al.* (1986), que não ocorre digestão no intestino anterior das larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae).

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.* (1996), a digestão de polímeros dos alimentos (proteínas, amido, celulose e hemicelulose) no intestino dos insetos acontece em três fases:

- inicial – nesta fase, ocorre à diminuição da massa molecular dos polímeros através da ação de hidrolases, como tripsina,  $\alpha$ -amilase, celulase e hemicelulase;

- intermediária – os oligômeros resultantes da primeira fase são hidrolisados em dímeros ou em dipeptídeos por hidrolases, tais como a  $\alpha$ -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 ocorre no espaço endoperitrófico, a digestão intermediária e a final ocorrem 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).

Os mecanismos fisiológicos da digestão extra oral e o seu significado na organização dos processos digestivos de percevejos predadores foram avaliados com determinações de pH, temperatura, efeito de substratos, inibidores e parâmetros cinético-enzimáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e os autores concluíram que as glândulas salivares de *P. nigrispinus* possuem enzimas hidrolíticas, como amilase, lipase e tripsina-like, com pronunciada atividade catalítica e certamente, envolvidas no processo de predação e zoofágia desse inimigo natural

(OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os principais grupos de enzimas digestivas de insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último o grupo melhor caracterizado.

### **2.3.1. Proteases**

As enzimas proteolíticas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. São classificadas de acordo com 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 grupos principais, os das exopeptidase e os da 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. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases. As serino proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspartil proteases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico. (RAO *et al.*, 1998).

#### **2.3.1.1. Serino proteases (EC 3.4.21)**

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

As serino proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e ômega peptidase. Com base em suas similaridades estruturais elas são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns. Clãs

são divididos em famílias baseados na identidade de seqüência e similaridades (BARRETT & RAWLINGS, 2001; RAWLINGS & BARRETT, 1999). O clã A (AS) agrupa famílias que possuam origens comuns com a quimotripsina; o clã B (SB) com a subtilisina; o clã C (SC) com a carboxipeptidase C; o clã E (SE) com a peptidase A D-Ala-D-Ala de *Escherichia* sp; o clã F (SF) com o repressor do Lex A; e o clã G (SG) que agrupa as serino-proteases ATP dependentes (RAWLINGS & BARRETT, 1993; RAO *et al.*, 1998).

A função catalítica das serino proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina reativa, histidina, e ácido aspártico) enquanto o grau e tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de turnover da enzima, o  $k_{cat}$ , conseqüentemente mudando o mecanismo enzimático, com pequeno efeito no  $K_M$ . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo e contribuem para uma atividade catalítica otimizada (CARTER & WELLS, 1988; PERONA & CRAIK, 1995). Geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupo hidroxila da serina do sítio ativo sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base, leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acil-enzima, uma base imidazólica e uma amina. Este mecanismo implica num estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK *et al.*, 1987).

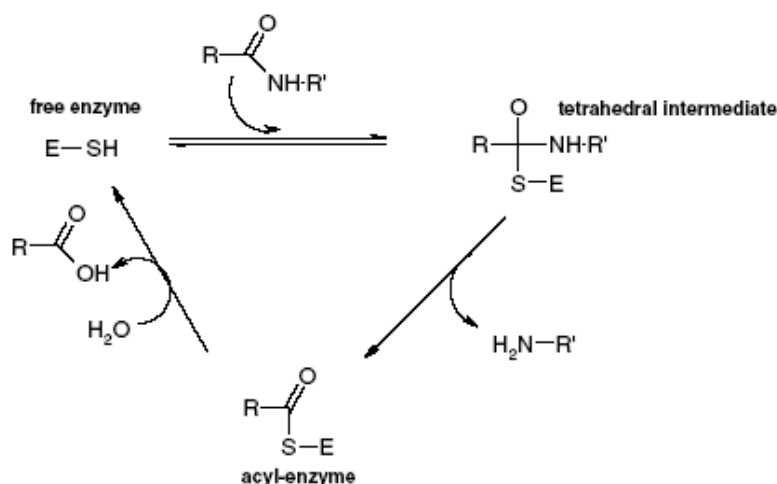
A relação entre a velocidade de acilação e de deacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a de deacilação e, para um substrato éster, esta velocidade pode ser 1 a 3 vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa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

As serino proteases são reconhecidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), e tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Algumas das serino proteases são também inibidas por reagente tiol tal qual *p*-cloromercuribenzoato (PCMB), em razão da devido à presença de um resíduo de cisteína na região do centro ativo (RAO *et al.*, 1998).

As serino proteases são descritas como geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0( RAO *et al.*, 1998). Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásica e esterásica. A massa molecular das serino proteases em geral está na faixa de 18 a 35 kDa, entretanto, vários organismos possuem serino proteases com massas moleculares maiores, como é o caso de *Serratia marcescens* crescida em soro reconstituído, cuja massa molecular para a serino protease isolada é de 53 kDa (ROMERO *et al.*, 2001). O ponto isoelétrico das serino proteases está geralmente na faixa entre pH 4,0 e 6,0. Serino proteases alcalinas que são ativas em pH altamente alcalino representam um grande subgrupo das serino-proteases.

### **2.3.1.2. Cisteíno Proteases (EC 3.4.22)**

Cisteíno proteases ocorrem tanto em procariotos como em eucariotos (RAO *et al.*, 1998). Essas 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. O mecanismo de ação das cisteíno proteases é muito semelhante ao das serino proteases. A presença de um resíduo de asparagina conservado (Asn175) na proximidade com a histidina catalítica (His159) cria a tríade cisteíno protease Cys-His-Asn que é considerada análoga a tríade Ser-His-Asp, arranjo encontrado em serino proteases (RAO *et al.*, 1998). 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). Geralmente, cisteíno proteases são ativas somente na presença de agentes redutores tais como HCN ou cisteína. (RAO *et al.*, 1998)



**Figura 3.** Mecanismo catalítico cisteína-protease (BAIRD *et al.*, 2006).

Para essas enzimas o resíduo de cisteína é essencial para a sua atividade catalítica. Cisteína-proteases são divididas em clãs que não seguem uma identidade estrutural nem de seqüência e provavelmente surgiram de diferentes linhas evolutivas. Sete clãs são reconhecidos dentro das cisteína-proteases. O clã CA é o maior clã das cisteína-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 cisteína-protease E-64 enquanto é inibida por outras cistatinas (ALAVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 1999). As cisteína-proteases do clã CD são especificamente inibidas por epóxidos de azapeptídeos baseados em asparagina (ASGIAN *et al.*, 2002; EKICI *et al.*, 2004). Enquanto as cisteína-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 cisteína-proteases papaína-like e legumaína-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 cisteína proteases apresentam maior atividade em pH neutro, embora algumas delas, por exemplo, as proteases lisossomais, tem sua atividade maximizada em pH ácido (RAO *et al.*, 1998). As cisteína proteases são sensíveis a agentes sulfidrílicos como PCMB, mas não são afetadas pela DFP e agentes quelantes de metais. A massa molecular e o ponto

isoeletrico das cisteino proteases, podem variar de acordo com organismo que as produz, como exemplo Clostripain, produzido pela bactéria anaeróbia *Clostridium histolyticum* que tem um ponto isoeletrico no pH 4,9 e uma massa molecular de 50 kDa, já a Streptopain, produzida por *Streptococcus spp.* possui o ponto isoeletrico de pH 8,4 e a massa molecular 32 kDa.

As cisteino proteases desenvolvem um importante papel na degradação de proteínas de estoque 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). Cisteino protease têm ainda 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, cisteinoproteases desenvolvem um importante papel na degradação lisossomal de proteínas e têm sido relatadas com a invasão de células cancerígenas e com a apresentação de antígenos as células do sistema imune (ALAVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 1999). Cisteino proteases de parasitas da malária e da esquistosomose são consideradas potentes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra essas infecções parasitárias (McKERROW *et al.*, 1999).

### **2.3.1.3. Proteases de microrganismos**

A venda mundial de enzimas movimentava anualmente 1 bilhão de dólares e as proteases representam 60% destas vendas, sendo 40% de origem microbiana. As proteases são usadas na composição de detergentes, no tratamento do couro e tecidos e podem também ser usadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica (SAID & PIETRO, 2002).

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases em razão da sua diversidade bioquímica, permitindo que o rendimento de enzimas por fermentação possa ser incrementado através de manipulação genética e melhoramento das condições de cultivo. Além disso, as proteases de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia, e seu custo de produção, de maneira geral, é menor do que aquele das enzimas de origem vegetal ou animal (NEURATH, 1989; SAID & PIETRO, 2002). O conhecimento das características físico-químicas das enzimas produzidas

por microorganismos é de fundamental importância para os estudos de aplicações industriais e biotecnológicas.

A maioria das proteases comerciais, principalmente as neutras e alcalinas são produzidas por bactérias. As proteases neutras bacterianas são ativas na faixa de pH que varia de 5 a 8 e possuem baixa termotolerância. A neutrase, uma protease neutra, é insensível aos inibidores naturais de proteases produzidos pelas plantas e conseqüentemente é utilizada na indústria de fermentação. As proteases neutras bacterianas são caracterizadas por sua alta afinidade pelos aminoácidos hidrofóbicos. Algumas proteases neutras pertencem ao grupo das metalo-proteases e requerem íons metais divalentes para sua atividade, enquanto outras são serino-proteases e não são afetadas pelos agentes quelantes. As proteases bacterianas alcalinas são caracterizadas por sua alta atividade em pH alcalino, por exemplo, 10, e sua ampla especificidade pelo substrato. A temperatura de melhor atividade é de cerca de 60 ° C. Com estas propriedades, as proteases bacterianas alcalinas são amplamente utilizadas no setor dos detergentes (RAO *et al.*, 1998).

#### **2.4. Microbiota bacteriana de insetos**

Para melhor compreensão sobre a bioquímica e fisiologia de insetos, é necessário também que eles sejam estudados dentro de um contexto ecológico juntamente com os microrganismos, sendo estes importantes componentes do sistema (STEINHAUS, 1960). A microbiota intestinal representa todo aspecto da relação microbiana, tanto de patógenos como de mutualismo obrigatório. Os primeiros estudos realizados sobre simbiose inseto-bactéria consideraram apenas a relação entre inseto e microrganismo patogênico e a conseqüente produção de inseticidas microbianos. Recentes pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a relação de como os microrganismos interagem com os insetos (DILLON & DILLON, 2004).

Os insetos apresentam uma grande variação em espécies, habitat, dieta e características estruturais de seus sistemas digestivos, fatores que afetarão a composição de suas microbiotas gastrintestinais (STEVENS & HUME, 1998). Microrganismos desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de insetos. Simbiontes contribuem para reprodução, digestão, nutrição e produção de feromônio (CAMPBELL, 1990; DASCH *et al.*, 1984). Relações simbióticas entre insetos e suas bactérias intestinais têm sido estudados extensivamente em muitos sistemas, particularmente em termites e afídeos, os quais se alimentam da madeira e do floema, respectivamente

(BREZNAK & BRUNE, 1994). Entretanto, pouco é conhecido sobre a microbiota em outros grupos de insetos, principalmente aqueles que se alimentam de folhagens.

A quantidade de microrganismos que habitam o intestino humano ( $10^{14}$ ) excede o das células somáticas e germinativas do organismo ( $10^{13}$ ) e essa microbiota realiza uma atividade metabólica equivalente ao fígado humano (BERG, 1996). Muitas espécies de insetos também são habitadas por uma grande comunidade de microrganismos. Embora haja uma enorme variação no número de microrganismos colonizadores de insetos, é provável que a maioria dessas espécies abrigue uma microbiota que excede o número de suas próprias células (DASCH *et al.*, 1984).

Existem poucos estudos sobre o papel funcional da microbiota digestiva dos insetos. Assim, a função da microbiota normal dos insetos, comparada à dos seus patógenos obrigatórios, é pouco explorada. O que explica em parte, uma das dificuldades no reconhecimento dos benefícios dessa relação (DILLON & DILLON, 2004).

Em *Apis mellifera*, os ovos, pupas e abelhas operárias ao emergirem como adultos são usualmente livres de bactérias (GILLIAM, 1997). Os adultos adquirem uma microbiota bacteriana intestinal pelo intercâmbio de alimento com outros indivíduos na colônia e através do consumo de pólen. Os microrganismos da microbiota de insetos - notadamente espécies de *Bacillus* - são importantes para a conversão do pólen estocado em alimento para as abelhas operárias, bem como para complementação e preservação do alimento, sintetizando aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, enzimas e substâncias antimicrobianas, além de protegerem a saúde da colônia pela produção de antibióticos (GILLIAM, 1997).

Devido aos hábitos alimentares de dípteros adultos na natureza, a ingestão de bactérias é inevitável. Dependendo das relações que esses insetos possam ter desenvolvido com seus microrganismos, as bactérias poderão ou não serem transmitidas às larvas, seja via contaminação dos ovos ou do seu substrato alimentar no ato da oviposição. Ainda que as larvas tenham herdado bactérias intestinais de suas progenitoras e que estas tenham se estabelecido em seu trato alimentar, a microbiota intestinal será continuamente renovada com a alimentação do inseto adulto na natureza (GILLIAM, 1997).

A microbiota que tem sido alvo de estudos é a do trato digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Díptero), do grupo dos flebotomíneos é associada à transmissão de *Leishmania* spp que são agentes etiológicos de diversas formas de leishmaniose (OLIVEIRA, *et al.*, 2000). Os flebotomíneos, tanto os machos como as fêmeas, alimentam-se de açúcares, provenientes de várias fontes, como folhas, frutos e secreções de afídeos, possibilitando a

ingestão de microrganismos. As fêmeas de algumas espécies procuram proteínas adicionais, como o sangue de vertebrados ou fluidos do corpo de outros insetos (OLIVEIRA, *et al.*, 2001).

A importância prática do estudo da composição da microbiota bacteriana de *L. longipalpis*, assim como de outros insetos hematófagos, reside no fato destes poderem ser importantes fontes de infecções tanto para animais quanto para humanos. A presença de bactérias potencialmente patogênicas em seus tratos digestivos representaria um risco de contaminação no momento da alimentação (OLIVEIRA, *et al.*, 2001).

Muitos dos microrganismos ainda não detectados devido a limitações técnicas podem ser membros de associações importantes no trato digestivo de cupins. Em cupins, a espécie em que a microbiota intestinal é a mais bem estudada é a *Reticulitermes flavipes*. Estudos desenvolvidos com essa espécie, empregando técnicas de biologia molecular para detecção de microrganismos, mostram que a comunidade microbiana de seu trato intestinal apresenta uma alta diversidade de nichos. Isto corresponde a uma grande diversidade de espécies de microrganismos ocupando o ecossistema intestinal de *R. flavipes*. Os principais grupos bacterianos já detectados, havendo considerável diversidade de microrganismos, são bactérias pertencentes aos grupos dos *Enterococcus* e *Lactococcus*, incluindo espécies de *Desulfovibrio*. Contudo, faltam ainda maiores informações quanto à identificação de espécies potencialmente importantes do ponto de vista nutricional e funcional para esses insetos (BRUNE *et al.*, 1995; THOLEN *et al.*, 1997; HONGOHO *et al.*, 2003).

Recentes estudos sobre a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis* foram realizados. Foram isoladas doze bactérias proteolíticas de lagartas de quinto instar em meio agar caseinato de cálcio em condições aeróbias e anaeróbias. A análise por PCR-RFLP reuniu os 12 isolados em cinco grupos. Um isolado de cada grupo foi selecionado para caracterizações posteriores. As seqüências do gene 16S rRNA e testes bioquímicos identificaram as bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus* e duas espécies de *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*. Todas foram capazes de produzir quantidades significativas de proteases quando cultivadas em meio de cultura adequado para produção dessas enzimas. Também foi demonstrado que, a diminuição da microbiota bacteriana através de administração de doses crescentes de tetraciclina a lagarta-da-soja, reduziu significativamente a atividade amidásica de proteases presentes no intestino desse inseto (VISÔTTO, 2007).

## **2.5. Importância da microbiota bacteriana de insetos**

Uma das características mais comuns do sistema digestivo de uma ampla gama de espécies de animais vertebrados e invertebrados é a presença de microrganismos simbiotes. Os microrganismos intestinais contribuem na digestão dos alimentos, na produção de vitaminas essenciais para o hospedeiro e na defesa contra a patogênese bacteriana, por meio de competição com organismos que compartilham nutrientes e sítios de anexação (DILLON & DILLON, 2004).

### **2.5.1. Função nutricional da microbiota**

As contribuições nutricionais da microbiota intestinal podem ocorrer de várias formas, como a melhoria da habilidade de viver em condições de dietas subótimas, o aumento da eficiência da digestão, a aquisição de enzimas digestivas e o abastecimento de vitaminas. Contribuições nutricionais estão bem estabelecidas entre o endosimbionte *Buchnera sp.* e afídeos (ADAMS & DOUGLAS, 1997; DOUGLAS *et al.*, 2001). A bactéria simbiote *Buchnera sp.* fornece aos afídeos aminoácidos essenciais e nutrientes que são ausentes em sua dieta. Vários trabalhos realizados com cupins reportaram que microrganismos associados ao trato digestivo de diversas espécies desses insetos são essenciais para sua sobrevivência, por serem fontes potenciais de enzimas que degradam celulose e lignina, fornecendo aos seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia (BRUNE & FRIEDRICH, 2000; TANADA *et al.*, 2006). As espiroquetas fornecem carbono, nitrogênio e a energia necessária para a nutrição de cupins via acetogenese e fixação de nitrogênio (OHKUMA *et al.*, 1999; BRAUMAN *et al.*, 2001; BREZNAK *et al.*, 2002). Além disso, os próprios microrganismos podem servir como fonte de alimento para seus hospedeiros (MINKLEY *et al.*, 2006).

Além do mais, microrganismos possuem propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos e devido a isso eles agem como “microrganismos corretores”, capacitando insetos fitófagos a superar suas barreiras bioquímicas (DOUGLAS, 1998). Alguns microrganismos destoxificam aleloquímicos presentes nas plantas, tais como flavonóides, taninos e alcalóides (BHAT *et al.*, 1998). Degradação microbiana de compostos aromáticos da planta pode ocorrer no trato intestinal de cupins e pode contribuir com requerimento de carbono e energia para o hospedeiro (BRUNE *et al.*, 1995). Enzimas digestivas de alguns insetos podem ser derivadas da microbiota, porém existem poucos estudos que mostram contribuição da produção de hidrolases pelos microrganismos (DILLON & DILLON, 2004).

### **2.5.2. Resistência à colonização**

A principal função benéfica da microbiota intestinal residente em humanos e animais domésticos é sua habilidade de resistir a colonização do intestino por espécies não residentes, incluindo patógenos e, conseqüentemente, prevenir infecções entéricas (BERG, 1996). Microrganismos residentes em alguns insetos têm sido suprimidos por agentes antimicrobianos e comparados com outros insetos que contêm uma microbiota intacta. Larvas de Lepidoptera *Homona magnanima* criadas assepticamente, mantiveram um crescimento 20 vezes maior de *Bacillus thuringiensis* do que larvas criadas em ambientes não assépticos, o que sugere que as bactérias intestinais influenciam o crescimento de microrganismos patogênicos nas larvas (TAKATSUKA *et al.*, 2000). *Schistocerca gregaria* germ-free foram alimentados com dieta adicionada de *Serratia marcescens*, uma bactéria patogênica de insetos (DILLON *et al.*, 2005). Os resultados mostraram que a densidade de *S. marcescens* encontrada em insetos germ-free foi cinco vezes maior do que em insetos controle, sugerindo que a microbiota intestinal de *S. gregaria* fornece proteção contra o estabelecimento de patógenos no intestino do hospedeiro.

### **2.5.3 Interações Multitróficas**

Alguns insetos seqüestram componentes da planta para serem usados diretamente como componentes de feromônios ou produzem modificações nos precursores da sua dieta (TILLMAN, *et al.*, 1999).

Existem evidências que compostos metabólicos produzidos por algumas bactérias intestinais de lepidópteras estão envolvidos na síntese de produtos importantes nas interações multitróficas. Insetos que se alimentam de plantas são conhecidos por desencadear várias respostas sistêmicas na planta. Uma dessas respostas é a emissão de compostos voláteis que atraem predadores contra seus herbívoros (ARIMURA *et al.*, 2000). N-acilaminoácidos são amplamente encontrados nas secreções orais de insetos, conhecidos por serem indutores da biossíntese de compostos voláteis em plantas. Alguns trabalhos consideram que bactérias presentes no trato digestivo de larvas de *Spodoptera littoralis* estão envolvidas na síntese de N-acilaminoácidos, sugerindo assim que essas bactérias poderiam ser incluídas em outro nível trófico nos estudos das interações entre insetos, suas plantas hospedeiras e predadores (SPITELLER, *et al.*, 2000).

#### **2.5.4. Transferência Gênica Bacteriana dentro do Intestino**

As comunidades microbianas se adaptam através de várias transferências de genes e pela transconjugação entre cepas bacterianas presentes nos intestinos dos insetos, sendo essa adaptação importante tanto para os microrganismos quanto para o inseto hospedeiro (WATANABE *et al.*, 1998). O bacilo *Yersinia pestis* é encontrado na flora intestinal de pulgas. Estudos realizados com *E. coli* contendo plasmídeo de resistência a antibiótico, mostraram que a transferência do gene para *Y. pestis* ocorreu no intestino médio da pulga após 3 dias de coinfeção, e 95% das pulgas coinfectadas continham *Y. pestis* transconjugantes resistentes a antibiótico após 4 semanas (HINNEBUSCH *et al.*, 2002).

#### **2.5.5 Bactérias Intestinais Transgênicas no Biocontrole**

Bactérias intestinais transgênicas são uma alternativa na estratégia de controle de insetos-praga e doenças, porém um estudo mais detalhado sobre a colonização, persistência e mecanismos de transmissão dessas bactérias é necessário antes da implementação dessa estratégia. Bactérias simbiontes de *Rhagoletis completa* foram modificadas via transformação para expressar proteínas transgênicas no intestino de moscas (PELOQUIN *et al.*, 2002). Bactérias residentes no intestino de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) foram isoladas e testadas quanto a capacidade inseticida contra esse inseto (ERTÜRK & DEMIRBAG, 2006).

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização bioquímica e cinética das serino e cisteíno proteases provenientes de bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*, isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*.

#### 3.1.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o meio de cultura para indução “ in vitro” das serino e cisteíno proteases produzidas pelas bactérias.
- Determinar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de serino e cisteíno proteases produzidas pelas bactérias.
- Efetuar a caracterização cinética destas proteases utilizando os substratos sintéticos L-BApNA e L-TAME.
- Avaliar a influência de íons cálcio na atividade de serino e cisteíno proteases produzidas pelas bactérias.
- Estudar a ação de inibidores de proteases sobre a atividade de serino e cisteíno produzidas pelas bactérias.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Estirpes bacterianas

As bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*, utilizadas neste estudo foram isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatali* por VISÔTTO (2007).

### 4.2. Avaliação do meio de cultura para indução das proteases produzidas pelas bactérias e obtenção do extrato enzimático.

As bactérias proteolíticas isoladas do intestino de *A. gemmatalis* foram cultivadas em meio de cultura infusão cérebro coração (BHI) puro, em BHI acrescido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA), em BHI acrescido de 0,1% de gelatina e em BHI acrescido de 0,1% de caseína. As culturas puras foram inoculadas em 50 mL dos meios, em erlenmeyers de 125 mL e mantidas a 37°C, a 200 rpm, onde foram monitorados espectrofotometricamente de hora em hora até se obter uma  $OD_{600}=0,5$ . O extrato enzimático foi obtido através da centrifugação das culturas inoculadas nos meios de cultura a 10.000 rpm por 20 minutos, a 4°C (BEG e GUPTA, 2003). O sobrenadante foi transferido para ependorfes e mantido a -20°C para análises posteriores.

### 4.3. Estudo da atividade proteásica sobre caseína utilizando eletroforese SDS-PAGE.

A atividade proteásica sobre a caseína por serino e cisteíno proteases excretadas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, foram analisadas em SDS-PAGE. Em 50 µL de uma solução de caseína (1,5 mg/mL tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,2) foram adicionados 20 µl de extrato enzimático de cada bactéria e a solução incubada por até 3 horas a 37 °C. O coágulo foi dissolvido em 25 mL de tampão Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β-mercaptoetanol a 10 % (v/v), SDS a 2 % (m/v) e azul de bromofenol 0,05 % (m/v). As amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos e em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do agente desnaturante SDS (SDS-PAGE 0,1%) conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970). Este foi corado com Coomassie blue R-250 [0.2% (w/v) em metanol/ ácido acético /água (4:1:50)].

#### **4.4. Determinação da concentração de proteína**

A determinação da concentração da proteína no sobrenadante foi obtida de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se como padrões soluções de 0 a 0,2 mg/ mL de soro albumina bovina (BSA).

#### **4.5. Caracterização das serino proteases bacterianas**

##### **4.5.1. Atividade Amidásica**

A atividade amidásica foi avaliada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico L-BApNA na concentração final de 0,5 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1% (v/v) de dimetilformamida (DMF). As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 (M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>) para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

##### **4.5.2. Atividade esterásica**

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

##### **4.5.3. Efeito de pH e temperatura na atividade das serino proteases bacterianas**

Os perfis de pH foram determinados utilizando-se os seguintes sistemas-tampão (Tabela 1), na concentração de 0,05 M contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>:

As atividades no sobrenadante das culturas bacterianas foram determinadas misturando-se 100 µL do sobrenadante de cada cultura bacteriana, 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM, ou 500 µL da solução de L-TAME 0,2 mM e 500 µL de tampão correspondente a faixa de pH desejada. A leitura da absorvância a 410 nm para o caso de L-

BApNA ou de 247 nm para o caso de L-TAME foi determinada durante 2,5 min. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições .

**Tabela 1:** Sistemas-tampão utilizado na avaliação da atividade de proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*

<b>Tampão</b>	<b>Faixa de pH</b>
Ácido cítrico/Fosfato dissódico	2,0-2,5
Ácido cítrico/Citrato de sódio	3,0-3,5
Ácido acético/Acetato de sódio	4,0-4,5
Ácido cítrico/Citrato de sódio	5,0-5,5
Monofosfato/Fosfato dissódico	6,0-7,0
Tris-HCl	7,5-8,5
Ácido bórico/Borato de sódio	9,0-10,0

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade das serino proteases bacterianas, foi utilizado banho-maria nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas e também foi utilizado espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada, através do acoplamento deste com um banho maria. O efeito da temperatura foi realizado misturando-se 100 µL do do sobrenadante de cada cultura bacteriana, 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM ou 500 µL da solução de L-TAME 0,2 mM e 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. Após 5 minutos de incubação da mistura na temperatura desejada, a leitura da absorvância da mistura foi determinada a 410 nm para o caso de L-BApNA ou de 247 nm para o caso de L-TAME durante 2,5min .Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições.

#### **4.5.4. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade das serino proteases bacterianas**

As serino proteases bacterianas foram analisadas com relação ao efeito da concentração de íons cálcio em suas atividades utilizando-se o substrato L-BApNA na concentração final de 0,5 mM e o substrato L-TAME na concentração final de 0,1 mM, em concentrações de CaCl<sub>2</sub> variando de 5 a 30 mM, utilizando as temperaturas e os tampões descritos na Tabela 2. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições.

#### 4.5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos na atividade das serino proteases bacterianas

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  app e  $V_{max}$  app foram realizadas nos tampões e nas temperaturas descritas na Tabela 2, utilizando o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,05 a 2,0 mM ou o substrato L-TAME nas concentrações de 0,01 a 1,0 mM.

**Tabela 2** – Temperatura e tampões de maior atividade das serino proteases bacterianas.

Bactéria	Temperatura (°C)	Tampão/pH
<i>Bacillus cereus</i>	25	Tris-HCl 0,05M pH 8,5
<i>Staphylococcus xylosum</i>	30	Tris-HCl 0,05M pH 8,5
<i>Enterococcus mundtii</i>	30	Tris-HCl 0,05M pH 7,5
<i>Enterococcus gallinarum</i>	35	Tris-HCl 0,05M pH 8,5

As velocidades iniciais foram determinadas a 410 nm para L-BApNA e 247 nm para o substrato L-TAME, em função do tempo (2,5 minutos) utilizando-se para os cálculos os coeficientes de extinção molar específicos. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada.

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

#### 4.5.6. Efeito de modificadores químicos na atividade das serino proteases bacterianas

No estudo do efeito de modificadores químicos sobre a atividade dos extratos protéicos bacterianos, utilizou L-BApNA na concentração final de 0,5 mM e L-TAME na concentração final de 0,1 mM como substratos, e em temperaturas e tampões de acordo com a Tabela 2 em presença de: EDTA (0 mM - 100 mM) - inibidor de metalo proteases e de proteases ativadas por metais por ser quelante de  $Ca^{+2}$  e outros metais divalentes, TLCK (0  $\mu$ M-1000 $\mu$ M)– inibidor irreversível de serino protease tipo tripsina, Aprotinina (0,5  $\mu$ M - 4,0  $\mu$ M) – inibidor de serino proteases, com exceção de trombina e Fator X<sub>a</sub>, Pepstatina A (0,005  $\mu$ M - 10 $\mu$ M) – inibidor de aspartil-protease e E-64 (1 - 100 $\mu$ M) – inibidor de cisteíno-protease.

Os extratos passaram por um período de pré-incubação de cinco minutos com cada inibidor. Posteriormente, foram adicionados os substratos L-BApNA e L-TAME, e as

atividades amidásica e esterásica foram analisadas como descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições.

## **4.6. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas**

### **4.6.1. Atividades amidásica e esterásica**

As atividades amidásica e esterásica de cisteíno proteases foram realizadas segundo metodologia descritas nos itens 4.5.1 e 4.5.2 para serino proteases acrescidas de 5,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor de ligações de enxofre) no tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Ao extrato foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inibidor de serino proteases benzamidina na concentração final de 1 mM, a fim de se medir apenas a atividade de cisteíno proteases.

### **4.6.2. Efeito de pH e temperatura na atividade das cisteíno proteases bacterianas**

O efeito de pH e da temperaturana sobre a atividade das cisteíno proteases bacterianas foram determinados segundo metodologias descritas no item 4.5.3 para serino proteases acrescidas de 5,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor de ligações de enxofre) nos tampões e ao extrato foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inibidor de serino proteases benzamidina na concentração final de 1 mM.

### **4.6.3. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade das cisteíno proteases bacterianas**

As cisteíno proteases bacterianas foram analisadas com relação ao efeito da concentração de íons cálcio em suas atividades segundo metodologia descrita no item 4.5.4 para serino proteases, porém em tampões e temperaturas descritas na Tabela 3 utilizando o substrato L-BApNA na concentração final de 0,6 mM e o substrato L-TAME na concentração final de 0,2mM, acrescidos 5,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e ao extrato foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inibidor de serino proteases benzamidina na concentração final de 1 mM.

### **4.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos na atividade das cisteíno proteases bacterianas**

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M \text{ app}$  e  $V_{\text{max app}}$  de cisteíno proteases bacterianas foram realizadas segundo metodologia descrita no item 4.5.5 para serino proteases,

porém em tampões e temperaturas descritas na Tabela 3 utilizando o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,2 a 2,5 mM ou o substrato L-TAME nas concentrações de 0,05 a 1,5 mM, acrescidas de 5,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor de ligações de enxofre) nos tampões e ao extrato foram adicionados 100  $\mu$ L do inibidor de serino proteases benzamidina na concentração final de 1 mM.

**Tabela 3**– Temperaturas e Tampões de maior atividade das cisteíno proteases bacterianas.

<b>Bactéria</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tampão/pH</b>
<i>Bacillus cereus</i>	35	Tris-HCl 0,05M pH 7,5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	35	Tris-HCl 0,05M pH 7,5
<i>Enterococcus mundtii</i>	25	Tris-HCl 0,05M pH 7,5
<i>Enterococcus gallinarium</i>	30	Tris-HCl 0,05M pH 7,5

#### **4.6.5. Efeito de modificadores químicos na atividade das cisteíno proteases bacterianas**

O estudo do efeito de modificadores químicos na atividade das cisteíno proteases bacterianas foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.5.5, porém em tampões e temperaturas descritas na Tabela 3 utilizando o substrato L-BApNA na concentração final de 0,6 mM e o substrato L-TAME na concentração final de 0,2mM, acrescidos 5,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e ao extrato foram adicionados 100  $\mu$ L do inibidor de serino proteases benzamidina na concentração final de 1 mM.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação do meio de cultura para indução da produção de serino e cisteíno proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.

O monitoramento do cultivo das bactérias foi efetuado espectrofotometricamente de hora em hora até que atingissem uma densidade ótica de 600nm igual a 0,5 ( $DO_{600} = 0,5$ ). A determinação da atividade específica foi realizada na avaliação do meio de cultura mais adequado para a produção de proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. A atividade das serino proteases foi detectada utilizando o substrato amidásico L-BApNA e o substrato esterásico L-TAME, os mesmos substratos foram utilizados na determinação das atividades de cisteíno proteases.

Na tabela 4, verificamos que as proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentaram atividade amidásica e esterásica de serino e cisteíno proteases em infusão cérebro coração (BHI) puro, em BHI acrescido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA), em BHI acrescido de 0,1% de gelatina e em BHI acrescido de 0,1% de caseína. Observamos que as proteases induzidas no meio de cultura que continha soro albumina bovina (BSA), apresentaram atividade específica mais elevada para todas as serino e cisteíno proteases bacterianas, utilizando tanto o substrato L-BApNA quanto o L-TAME. Verificamos ainda que a atividade esterásica foi superior à atividade amidásica tanto para serino quanto para cisteíno proteases de todos os extratos bacterianos.

De acordo com os resultados descritos acima foi determinado então à utilização do meio de cultura BHI acrescido de 0,1% de soro albumina bovina, como meio para indução da produção de proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, isolados do intestino de *A. gemmatalis*.

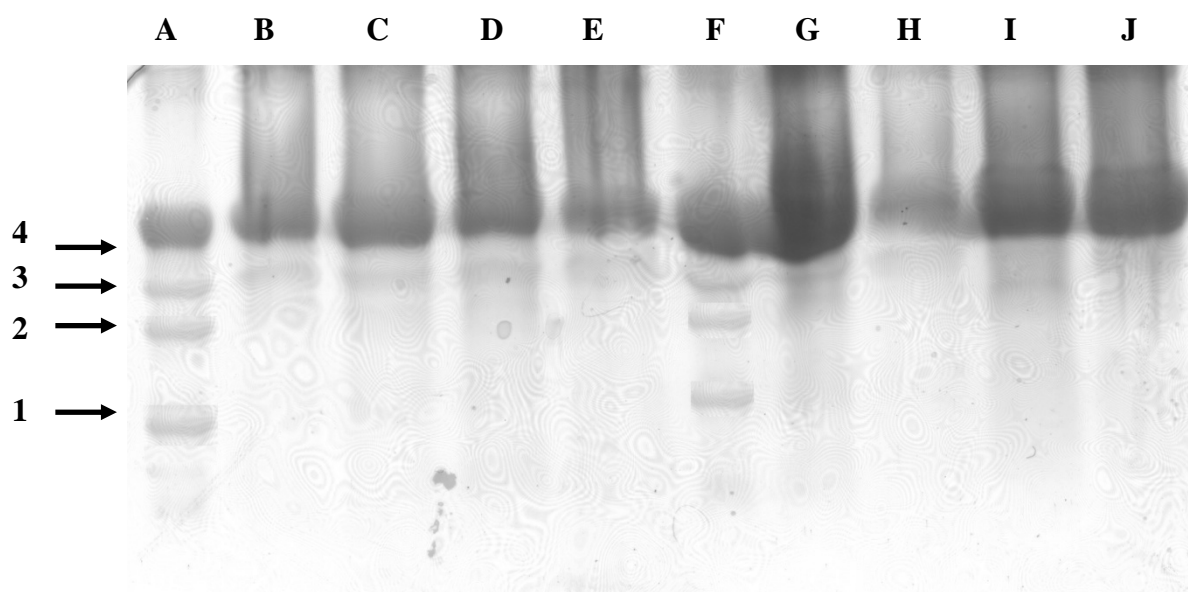
**Tabela 4:** Atividade específica de proteases detectada nos sobrenadantes das culturas das bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

BACTÉRIAS	MEIOS DE CULTURA	SERINO PROTEASES		CISTEÍNO PROTEASES	
		L-BApNA ( $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ )	L-TAME ( $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ )	L-BApNA ( $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ )	L-TAME ( $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$ )
<i>Bacillus cereus</i>	BHI	0,583±0,22a	10,596±7,13a	0,561±0,04b	8,769±4,78a
	BHI+BSA	0,726±0,07a	11,517±2,54a	0,766±0,06a	12,797±2,77a
	BHI+GELATINA	0,610±0,35a	9,936±5,63a	0,048±0,04c	6,359±6,99a
	BHI+CASEÍNA	0,689±0,00a	4,115±2,59a	0,597±0,11ab	5,586±0,65a
<i>Staphylococcus xylosus</i>	BHI	0,807±0,06a	4,208±3,29c	0,129±0,06a	5,260±2,41c
	BHI+BSA	0,818±0,21a	46,633±0,95a	0,311±0,03 <sup>a</sup>	49,171±2,75a
	BHI+GELATINA	0,687±0,36a	7,247±2,06c	0,222±0,19a	8,565±0,57c
	BHI+CASEÍNA	0,536±0,04a	27,582±6,31b	0,214±0,26a	25,138±3,78b
<i>Enterococcus mundtii</i>	BHI	0,489±0,24a	11,958±1,71b	0,524±0,10a	13,666±1,71b
	BHI+BSA	1,018±0,17a	23,209±2,23a	1,029±0,02a	24,995±2,23a
	BHI+GELATINA	0,596±0,22a	16,715±4,71ab	0,787±0,50a	15,160±2,02b
	BHI+CASEÍNA	0,666±0,37a	19,007±3,74ab	0,952±0,21a	17,456±1,16b
<i>Enterococcus gallinarum</i>	BHI	1,570±0,08b	6,732±5,40b	6,732±0,08b	8,528±3,10b
	BHI+BSA	2,435±0,09a	30,471±3,30a	17,775±0,09a	31,106±2,90a
	BHI+GELATINA	0,943±0,16c	3,144±1,05b	2,096±0,06b	3,843±1,60b
	BHI+CASEÍNA	2,419±0,09a	8,273±2,23a	16,547±0,29a	9,247±3,04b

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as atividades para cada meio de cultura de cada bactéria foram comparadas usando teste de Tukey, com nível de significância de 0,05. Cada atividade refere-se à média de três repetições (n=3)

## 5.2. Atividade proteásica sobre caseína utilizando eletroforese SDS-PAGE.

A atividade proteásica sobre a caseína por serino e cisteíno proteases presentes no sobrenadante das culturas de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* em SDS-PAGE (Figura 4) demonstra a possibilidade da existência de serino e cisteíno proteases produzidas por essas bactérias.

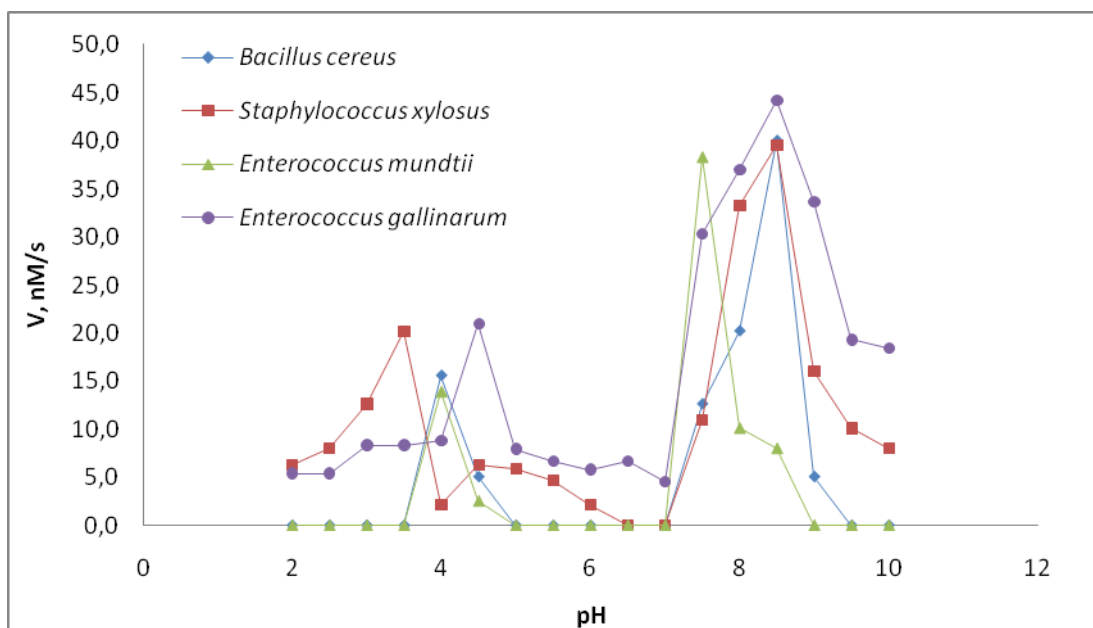


**Figura 4: Eletroforeses SDS-PAGE de proteases bacterinas (A a E: cisteíno proteases):** A- Caseína + $\beta$ -mercapetoetanol. B- *B. cereus*. C-*S. xylosum*. D- *E. mundtii*. E- *E. gallinarum*. (F a j: serino proteases) F- Caseína pura. G- *B. cereus*. H- *S. xylosum*. I- *E. mundtii*. J- *E. gallinarum*. Setas 1, 2, 3 e 4: indicam a presença de diferentes formas da caseína.

## 5.3. Caracterização das serino proteases bacterianas utilizando o substrato amidásico L-BApNA

### 5.3.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica

Os perfis de atividade de serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, mostram que todos os extratos apresentam dois picos mais pronunciados de atividade em diferentes valores de pH (Figura 5). Estes resultados sugerem diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto, observa-se pelos perfis da Figura 5 que os maiores valores de atividade amidásica obtido, na faixa de pH testada, foram pH 8,5 para *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. gallinarum*, e pH 7,5 para *E. mundtii*.



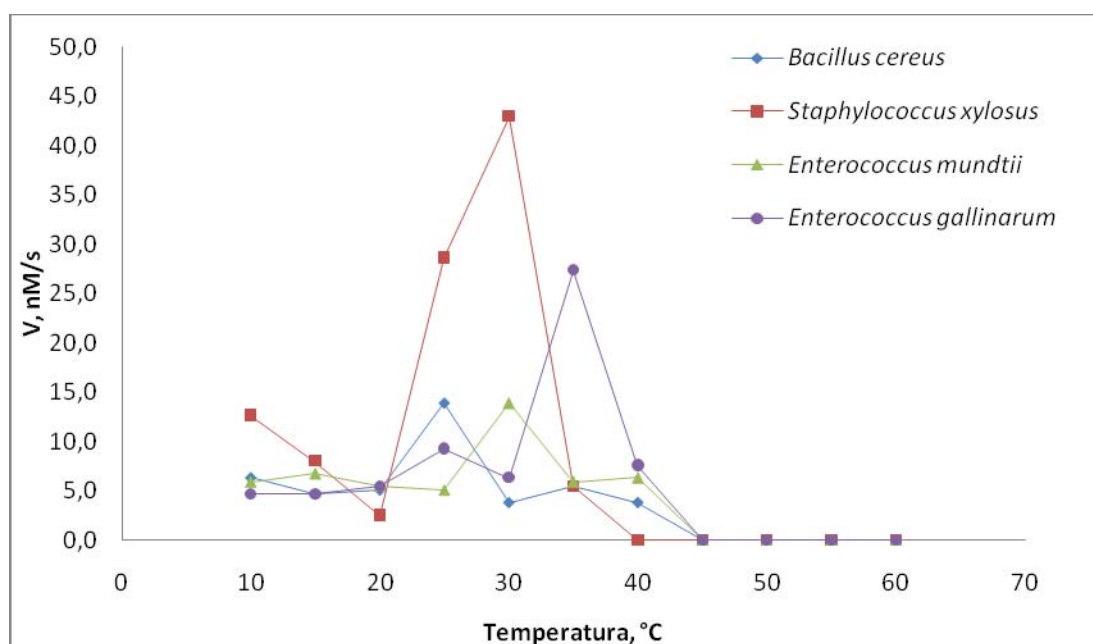
**Figura 5:** Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA.

Os dados de pH de maior atividade das serino proteases da microbiota bacteriana de *A. gemmatalis*, mostram semelhança com os valores de pHs de maior atividade das proteases extraídas do intestino *A. gemmatalis*, utilizando como substrato L-BApNA. OLIVEIRA *et al.* (2005), realizaram purificação parcial de serino proteases presente no extrato solúvel do intestino médio de *A. gemmatalis*, verificando um pico de atividade em pH 8,5 quando utilizando o substrato L-BApNA. O mesmo foi observado por XAVIER *et al.* (2005), em estudos das serino proteases ligadas a membrana do intestino médio de *A. gemmatalis*, encontraram máxima atividade em pH 8,5 também utilizando o substrato L-BApNA.

Outros autores também já caracterizaram serino proteases produzidas por microorganismos. HIRAZAWA *et al.* (2006), verificaram uma maior atividade em pH 8,5 em estudos das serino proteases de parasita de peixes *Neobenedenia girellae*. WANG *et al.* (2005), analisando uma serino protease extracelular produzida por *Aspergillus fumigatus*, verificaram um pico de atividade em pH 8,0. KAWALEC *et al.* (2005), estudando *Enterococcus faecalis* encontraram valores de maior atividade entre pH 7 e 7,5.

De acordo com RAO *et al.* (1998), as serino proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Portanto os valores aqui encontrados para serino proteases bacterianas com picos de atividade amidásica em pH 8,5 e pH 7,5, encontram-se na faixa descrita pela literatura.

A Figura 6 apresenta os perfis de atividade amidásica em função da temperatura para as serino proteases bacterianas onde podemos observar que todas as serino proteases bacterianas apresentam mais de um pico pronunciados de atividade em diferentes valores de temperatura. Estes resultados sugerem novamente diferentes isoformas de serino proteases presentes nos extratos enzimáticos. Porém podemos verificar que a temperatura de maior atividade amidásica para as proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* foram 25°C, 30°C, 30°C e 35°C, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos reportados por OLIVEIRA *et al.* (2005), em estudo realizado com as proteases solúveis extraídas do intestino médio de *A. gemmatalis*. JOO *et al.* (2002), estudando uma protease alcalina produzida por *Bacillus horikoshii* verificaram uma máxima atividade na temperatura de 34°C. FEDATTO *et al.*, (2006) caracterizando serino proteases de patógenos *Xylella fastidiosa*, verificaram uma maior atividade na temperatura de 30°C. Logo nossos valores de temperatura de maior atividade para as serino proteases das *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* isoladas do intestino de *A. gemmatalis* estão similares com os encontrados por esses autores.

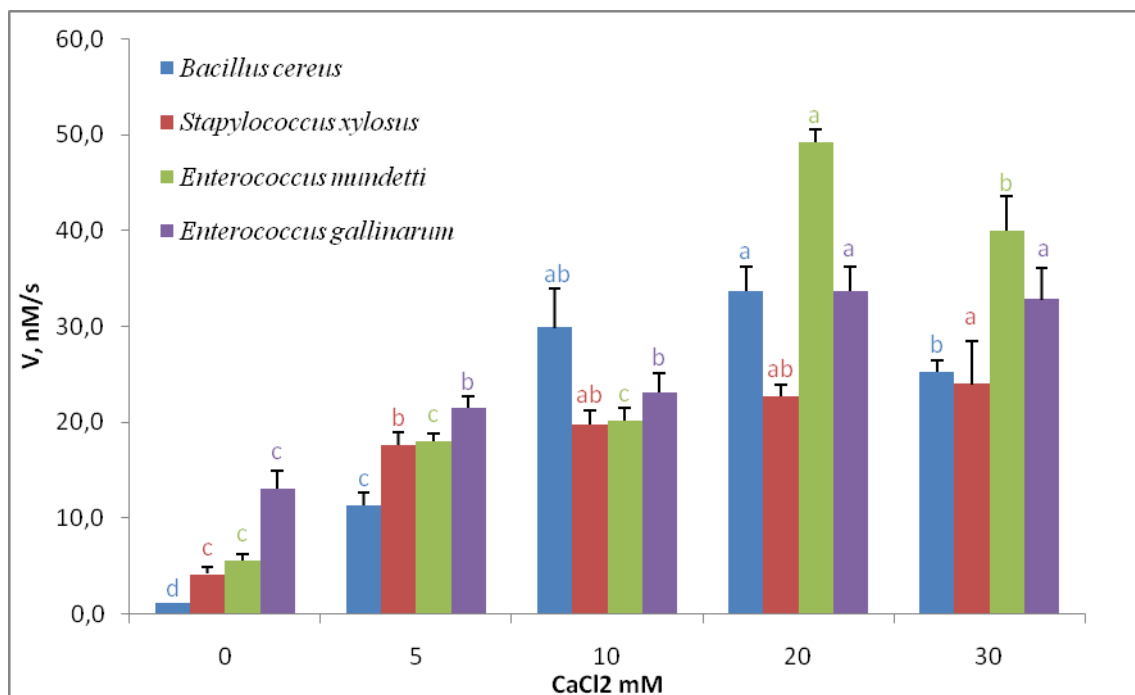


**Figura 6:** Efeito da temperatura sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA.

### 5.3.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de serino proteases

As atividades das serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-BApNA foram maiores numa concentração em torno de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  na mistura de reação para todas as bactérias (Figura 7). As serino proteases de *Enterococcus mundtii* tiveram um maior aumento na atividade amidásica em resposta ao aumento da concentração de cálcio do que as proteases das outras bactérias. Esse resultado nos leva a inferir que o cálcio teve um papel maior na estabilização das proteases de *Enterococcus mundtii*, comparativamente às proteases dos outros microrganismos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados nos trabalhos realizados com as proteases solúveis parcialmente purificadas e proteases insolúveis de *A. gemmatalis* utilizando o substrato L-BApNA (OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). Estes autores verificaram um aumento da atividade dessas proteases em presença de 20 mM de cálcio. JAOUADI *et al.* (2008), caracterizando serino proteases de *Bacillus pumilus*, avaliaram o efeito de diferentes íons metálicos em diferentes concentrações e verificaram que, na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas concentrações de 2 mM e 5 mM, houve aumento de 157% e 134% respectivamente na atividade relativa. HADJ-ALI *et al.* (2007), estudando serino proteases de *Bacillus licheniformis* verificaram que essas proteases eram mais termoestáveis com o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . De acordo com os autores, isto pode ser explicado pelo fortalecimento de interações intramoleculares nas proteínas e pela ligação de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  a sítios de autólise.

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 à tripsina. A ocupação deste sítio estabiliza a proteína de uma desnaturação termica ou a autólise. Assim, nossos resultados sugerem que as serino proteases produzidas por *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* possivelmente são estabilizadas pelos íons cálcio, levando à mudança na conformação das moléculas de enzimas e melhorando o posicionando do centro ativo, acarretando aumento da atividade em presença do íon cálcio.



**Figura 7:** Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

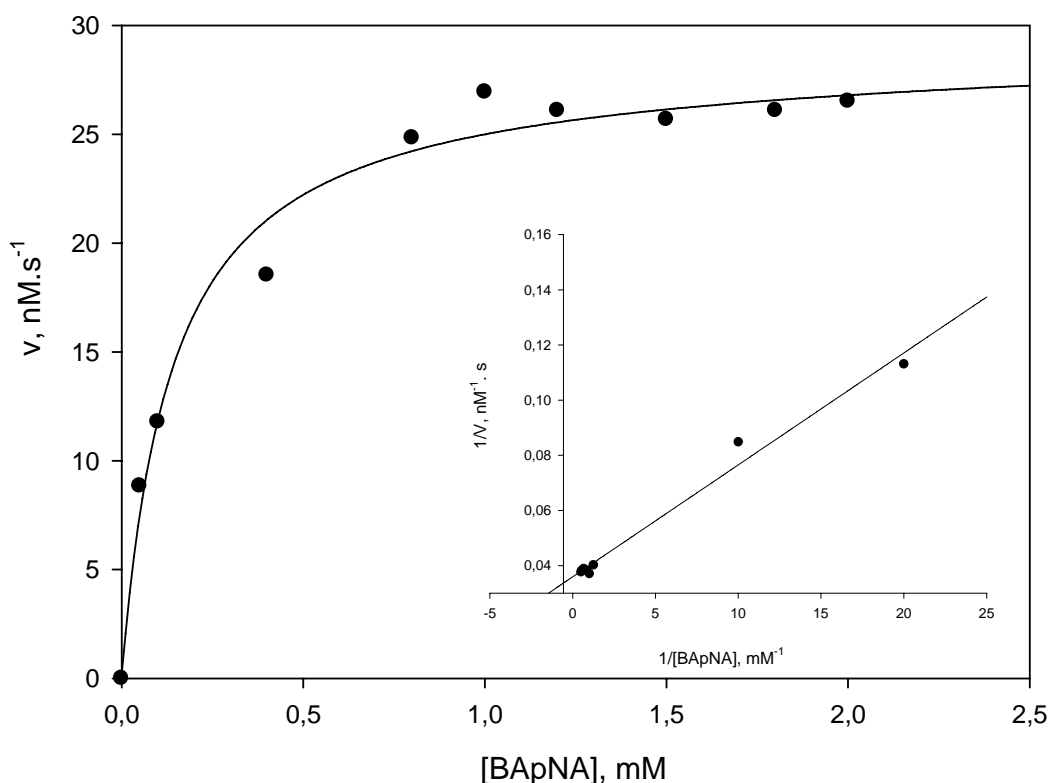
### 5.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-BApNA

A equação do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten apresenta dois parâmetros cinéticos,  $K_M$  e  $V_{max}$  essenciais na caracterização de uma determinada enzima. Quando toda concentração de enzima, no meio de reação, está sob a forma de complexo [ES], então a cinética Michaeliana fornece o parâmetro  $V_{max}$ . Portanto,  $V_{max}$  não é uma constante cinética, uma vez que depende da concentração de enzima pura e da própria constante catalítica da enzima ( $k_{cat}$ ). Entretanto, é um parâmetro cinético importante, uma vez que a concentração de substrato na metade da  $V_{max}$  fornece a constante cinética  $K_M$ . O  $K_M$  é uma constante cinética que relaciona a velocidade enzimática com a concentração de substrato. Estabelece, portanto, um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, ou seja, a concentração fisiológica de substrato. A constante de Michaelis indica também uma “adequacidade” do substrato ao centro ativo da enzima. Portanto, quanto menor o valor de  $K_M$  maior adaptação do substrato ao centro ativo da enzima .

O gráfico de Michaelis-Menten para as serino proteases de *E. mundtii* isolados do intestino *A. gemmatilis* sobre o substrato L-BApNA encontra-se representado na figura 8. Nessa figura, encontra-se ainda inserido o gráfico de Lineweaver-Burk.

Todas as proteases dos extratos enzimáticos das bactérias apresentam gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que as serino proteases dessas bactérias seguem a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato L-BApNA analisada. Os gráficos com as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentaram perfis semelhantes (dados não mostrados).

Na tabela 5 estão apresentados, os parâmetros cinéticos  $K_{M\ app}$  e  $V_{máx\ app}$  de serino proteases determinadas utilizando as concentrações de substrato de 0,05 a 2,0 mM em pHs e temperaturas de acordo com a tabela 2, para os extratos bacterianos. O valor de  $K_{M\ app}$  da serino protease de *E. gallinarum* foi 0,26 mM sendo ligeiramente maior do que as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus* e *E. mundtii* que foram de 0,15 mM, 0,12 mM e 0,14 mM, respectivamente. Entretanto, para a atividade amidásica, os  $K_{M\ app}$  foram semelhantes, com os valores na mesma ordem de grandeza, mostrando afinidade semelhante de L-BApNA pelo centro ativo de serino proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatalis*.



**Figura 8:** Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino protease, de *Enterococcus mundtii*, isolado do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineweaver-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  $K_M$  app e  $V_{max}$  app.

Estes dados, como já verificado nos fatores pH e temperatura, mostram semelhança entre o parâmetro cinético  $K_M$  app para proteases extraídas do intestino *A. gemmatalis*, utilizando como substrato L-BApNA. OLIVEIRA *et al.* (2005), encontraram para as proteases solúveis parcialmente purificadas, um valor de  $K_M$  app de 0,32 mM. XAVIER *et al.* (2005), estudando as proteases ligadas a membrana, verificaram um valor de  $K_M$  app de 0,23 mM.

Além dos dados das proteases de *A. gemmatalis* os resultados desse trabalho são semelhantes com outros valores de  $K_M$  encontrados por vários autores para serino proteases, utilizando substratos p-nitroanilidas. BIRO *et al.* (2003), estudando serino protease ativada de células B, encontraram um  $K_M$  de 0,358 mM. MOHAMED *et al.* (2005), encontraram um  $K_M$  de 0,3 mM para serino proteases do parasita *Fasciola gigantica* sobre o substrato L-BApNA. DIENES *et al.* (2007), também encontraram um  $K_M$  de 0,3 mM para serino proteases do fungo *Trichoderma reese* sobre o mesmo substrato.

**Tabela 5:** Parâmetros cinéticos de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA

Bactérias produtoras de proteases	Substrato	$K_M$ app	$V_{max}$ app
<i>Bacillus cereus</i>	L-BApNA	0,15 mM	16,64 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	L-BApNA	0,12 mM	14,33 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Enterococcus mundtii</i>	L-BApNA	0,14 mM	28,22 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	L-BApNA	0,26 mM	1,12 nM.s <sup>-1</sup>

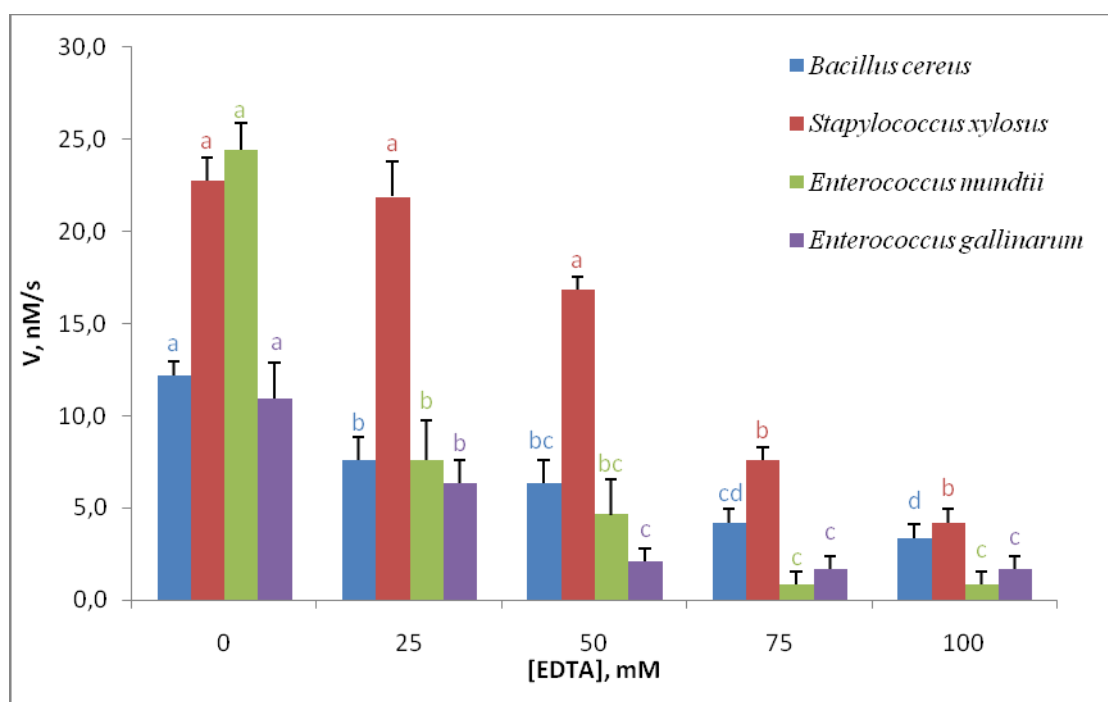
### 5.3.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de serino proteases

#### 5.3.4.1. Efeito de EDTA

A figura 9 apresenta o efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e quelante de íons Ca<sup>+2</sup>, sobre as serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o L-BApNA. De acordo com a figura 9 é possível observar que ocorreu decréscimo nos valores de atividades amidásica com o aumento da concentração de EDTA para as serino proteases de todas as bactérias. Como a atividade foi determinada em presença de 20 mM de íons cálcio na mistura de reação, possivelmente o

EDTA, agente quelante de cálcio, agiu seqüestrando estes íons. As serino proteases de *E. mundtii* tiveram uma maior diminuição na atividade amidásica do que as serino proteases das outras bactérias, mais uma evidência de que o cálcio tem um papel importante na estabilização das serino proteases bacterianas, sendo as serino proteases de *E. mundtii* as mais sensíveis aos íons cálcio.

Nossos dados foram semelhantes aos encontrados por OLIVEIRA *et al.* (2005), e XAVIER *et al.*, (2005) estudando o efeito de EDTA sobre as proteases solúveis e insolúveis de *A. gemmatalis*. HADJ-ALI *et al.* (2007), em estudos sobre o efeito de inibidores em serino proteases de *Bacillus licheniformis*, após observar que na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  a enzima tinha uma maior estabilidade, verificaram que EDTA (5 mM) inibiu a 70% da atividade de serino proteases de *B. licheniformis*, o que para os autores indicou a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  na estabilização dessas proteases. De acordo com LEE *et al.* (2002), as proteases de *B. licheniformis* contêm dois sítios de ligação para  $\text{Ca}^{2+}$  e a remoção de íons  $\text{Ca}^{2+}$  fortemente ligados a estes sítios provoca uma grande redução na estabilidade térmica da enzima.



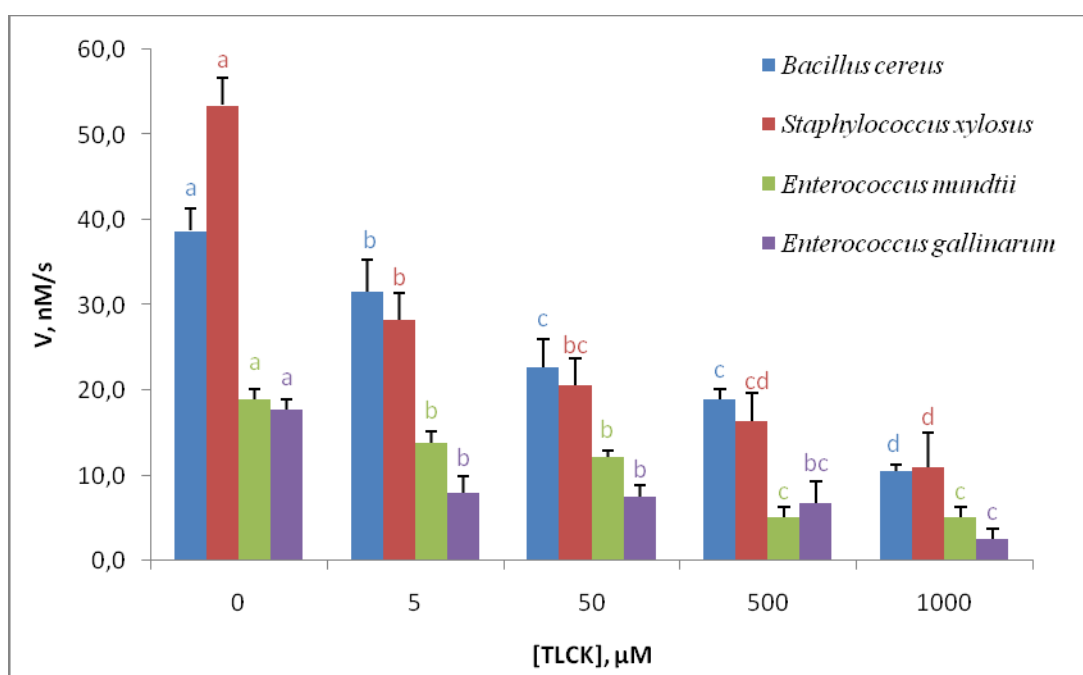
**Figura 9:** Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Assim, nossos dados sugerem que íons cálcio estejam se ligando à resíduos de aminoácidos da estrutura da enzima, onde estes íons estariam sendo seqüestrados por EDTA causando conseqüente diminuição de sua atividade catalítica. Estes dados novamente

suportam a hipótese de que as serino proteases das bactérias isoladas *A. gemmatalis* apresentam maior eficiência de hidrólise em presença de íons cálcio, conforme já havia sido demonstrado anteriormente (Figura 7).

### 5.3.4.2. Efeito de TLCK

O aumento da concentração de TLCK, inibidor irreversível de serino protease tipo tripsina, causou uma redução significativa da atividade das serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o L-BApNA (substrato amidásico específico de tripsina)(Figura 10). Este substrato sintético L-BApNA possui uma ligação amida que é análoga à ligação peptídica existente nas proteínas. O TLCK é uma cetona que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina, exercendo assim efeito de inibidor irreversível sobre a enzima (SHAW *et al.*, 1965).



**Figura 10:** Efeito de TLCK sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

OLIVEIRA *et al.*(2005) e XAVIER *et al.* (2005), estudando o efeito de TLCK sobre as proteases solúveis e insolúveis de *A. gemmatlis*, verificaram uma diminuição na atividade dessas proteases, o que os levou a sugerir que as proteases presentes nos seus extratos enzimáticos continham enzimas tripsina-like. O mesmo foi verificado por BIRO *et al.* (2003)

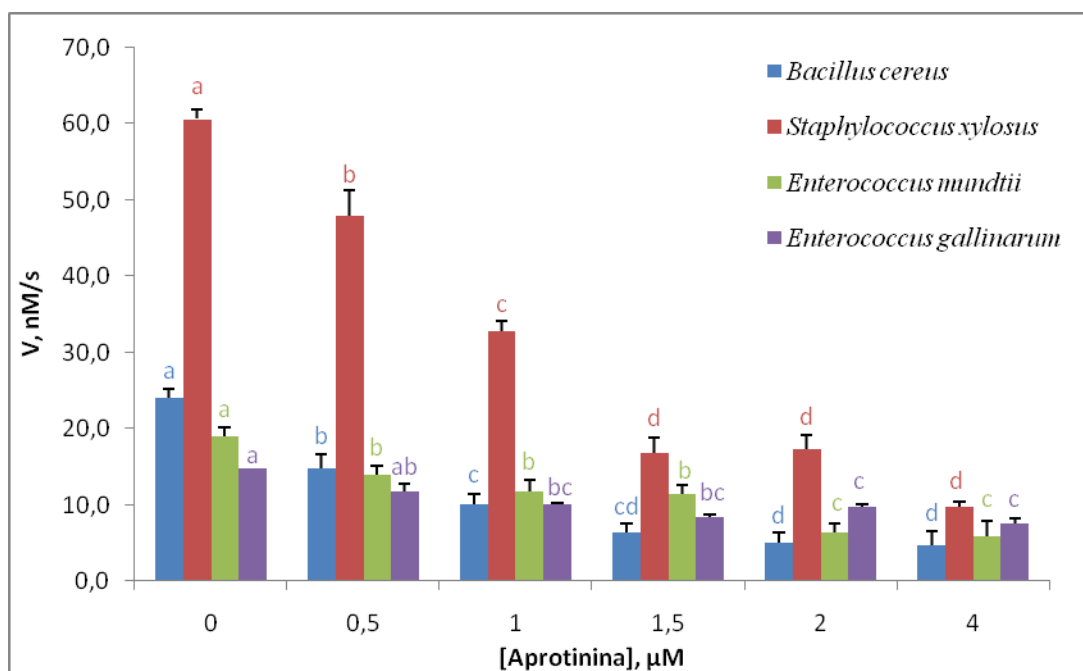
estudando enzimas tripsina-like de *Bacillus* spp. ativada de células B e JAOUADI *et al.* (2008) caracterizando serino proteases de *Bacillus pumilus*.

Assim, de acordo com o relatado na literatura, nossos resultados sugerem que as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* são enzimas tripsina-like e que estas estão possivelmente sofrendo alquilação de resíduos de histidina da tríade catalítica de seus centros ativos causando conseqüente diminuição da atividade amidásica.

### 5.3.4.3. Efeito de Aprotinina

Analizamos o efeito de aprotinina, inibidor protéico competitivo de serino proteases, sobre os extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-BApNA, mostram que os valores das atividades amidásicas diferem ( $p < 0,05$ ) em função do aumento da concentração de aprotinina para todas as bactérias (Figura 11).

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



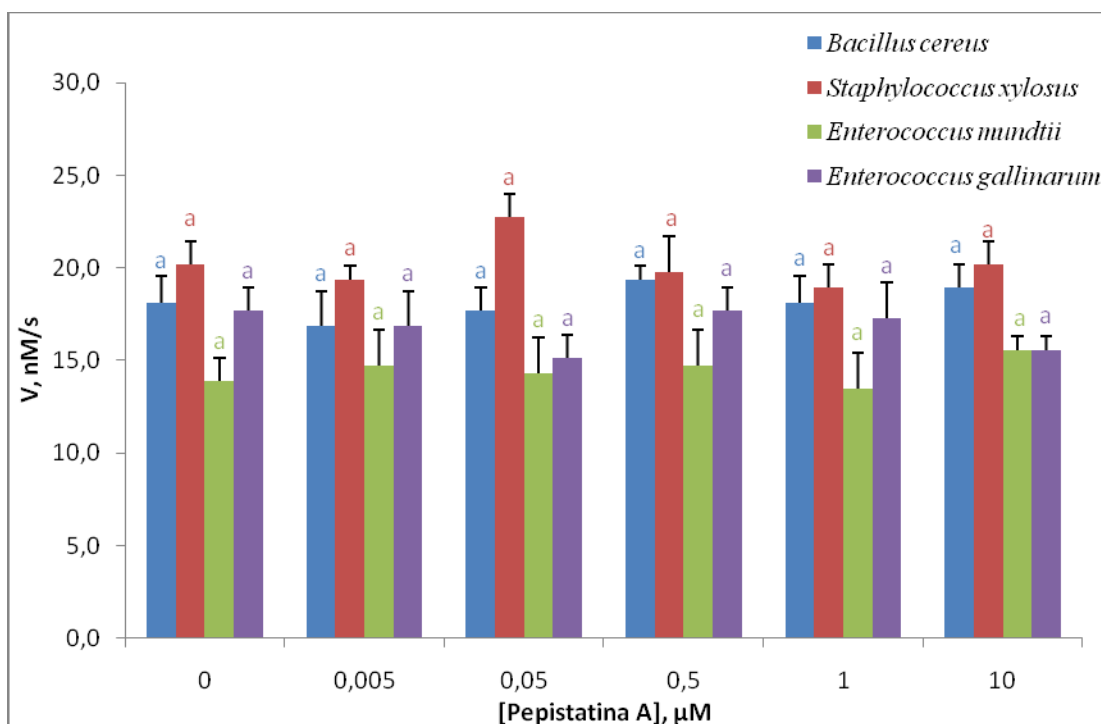
**Figura 11:** Efeito de Aprotinina sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por OLIVEIRA *et al.* (2005) e XAVIER *et al.* (2005), estudando o efeito de Aprotinina sobre as proteases solúveis e insolúveis presente no intestino de *A. gemmatalis*. O mesmo foi observado por BEG *et al.* (2003), estudando o efeito do inibidor aprotinina sobre serino proteases de *Bacillus mojavenis* e JOO *et al.* (2002), em estudos de uma protease alcalina produzida por *Bacillus horikoshii* que e foi sugerida pelos autores como sendo uma protease da família das serino proteases.

Esses resultados novamente sugerem a presença de enzimas tripsina-like nos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, uma vez que em presença de um inibidor competitivo protéico de serino protease, ocorreu queda na atividade amidásica sobre L-BApNA de proteases presentes no extrato das bactérias analisadas.

#### 5.3.4.4. Efeito de Pepstatina A

O efeito de Pepstatina A, um inibidor de aspartil protease, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-BApNA não diferiu ( $p>0,05$ ) nas concentrações analisadas sobre as atividades amidásicas(Figura 12).



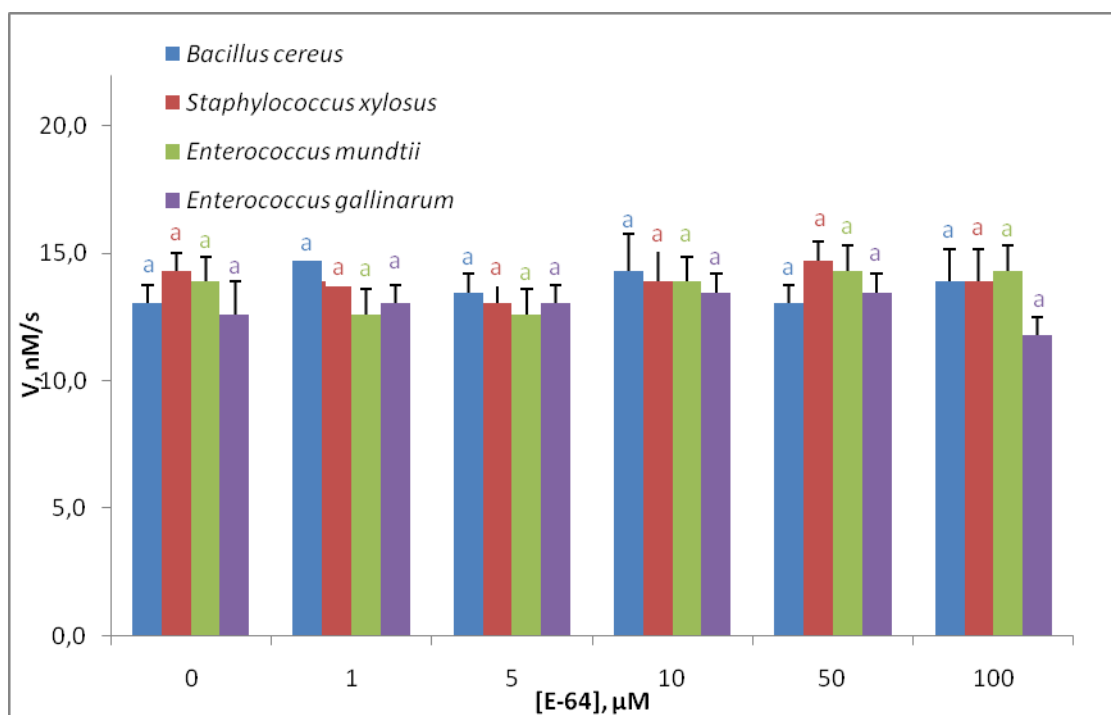
**Figura 12:** Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

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

Nossos dados são similares aos de JAOUADI *et al.* (2008), estudando o efeito Pepstatina A sobre serino proteases de *Bacillus pumilus*. O mesmo foi observado por HIRAZAWA *et al.* (2006), estudando serino proteases de *Neobenedenia girella*, por FEDATTO *et al.* (2006), estudando *Xylella fastidiosa* e por BEG *et al.* (2003), estudando serino proteases de *Bacillus mojavensis*. Portanto, nossos resultados não demonstram presença de aspartil proteases nos extratos enzimáticos da microbiota de *A. gemmatilis*.

#### 5.3.4.5. Efeito de E-64

O efeito de E-64, inibidor de cisteíno proteases, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-BApNA não diferiu ( $p>0,05$ ) nas concentrações analisadas sobre as atividades amidásicas(Figura 12).



**Figura 13:** Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

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*. Este

inibidor caracteriza uma inibição irreversível de cisteíno proteases pertencentes às famílias papaína e calpaínas (HANADA et al., 1978; HASHIDA et al., 1980; BARRETT et al., 1982; PARKES et al., 1985) 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).

Nossos dados estão semelhantes aos observado por HIRAZAWA *et al.* (2006), em estudos do efeito do inibidor E-64 sobre serino proteases de *Neobenedenia girellae*. E-64 também não afetou a atividade de serino proteases de *Bacillus mojavensis* obtendo um valor de 100% de atividade quando adicionado 1 mM desse inibidor (BEG *et al.*, 2003).

Assim, os extratos enzimáticos contendo proteases das bactérias isoladas do intestino da lagarta da soja, apresentam atividade tripsina-like e não apresentam redução significativa das atividades frente a inibidores de metalo, aspartil e cisteíno proteases. Estes dados sugerem que serino proteases sejam a família de proteases, produzidas pela microbiota, que darão maior contribuição à digestibilidade protéica de *A. gemmatalis*. Possivelmente, durante uma ingestão crônica de inibidores de proteases pelo inseto, após bloqueio das proteases produzidas pelo inseto, ou seja, da fração solúvel do intestino (OLIVEIRA *et al.* 2005) ou das proteases ligadas à membrana intestinal (XAVIER *et al.*, 2005) de *A. gemmatalis*, os microorganismos passem a produzir proteases com a mesma eficiência catalítica, como um mecanismo de defesa do inseto. Assim, um possível controle da lagarta da soja, utilizando inibidores de proteases sintéticos, peptídeos, peptídeos miméticos ou plantas expressando inibidores, seria através de inibidores que possuam grande afinidade pelas proteases produzidas pelo inseto como também pela microbiota

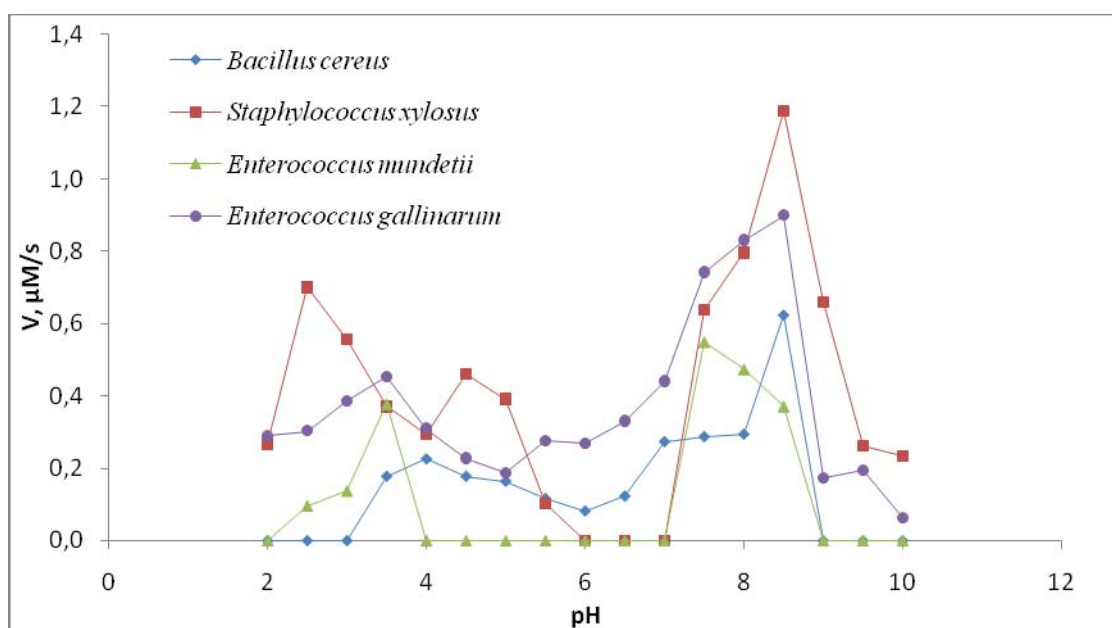
#### **5.4. Caracterização das serino proteases bacterianas utilizando o substrato esterásico L-TAME**

##### **5.4.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade esterásica**

As atividades dos extratos enzimáticos de de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, mostram que todos os extratos apresentam dois picos mais pronunciados de atividade em diferentes valores de pH sobre L-TAME (Figura 14). Estes resultados sugerem novamente diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto os maiores valores de atividade esterásica das proteases bacterianas foram detectados em pH 8,5

para *B. cereus*, *S. xylosus*, ., e pH 7,5 para *E. mundtii*. Estes dados são análogos aos dados encontrados anteriormente quando utilizamos o substrato L-BApNA (Figura 5).

Analisando nossos valores de pH de maior atividade esterásica verificamos similaridade com os valores de pH encontrados por outros autores para serino proteases frente o substrato L-TAME. OLIVEIRA *et al.* (2005), estudando as proteases solúveis, parcialmente purificadas, e XAVIER *et al.* (2005), as proteases insolúveis do intestino de *A. gemmatalis*, encontraram picos de máxima atividade em pH 8,0 quando utilizando o substrato L-TAME. Outros autores como LEE & ANSTEE (1995) em estudos com proteases do extrato enzimático de *Spodoptera littoralis* e SILVA-LOPEZ *et al.* (2004), estudando serino proteases de *Leishmania amazonensis* observaram também maior atividade esterásica em pH 8,0 sobre o substrato L-TAME. SILVA-JUNIOR *et al.* (2007), estudando as proteases de *Bothrops jararacussu* verificaram atividade esterásica máxima em pH 7,5.

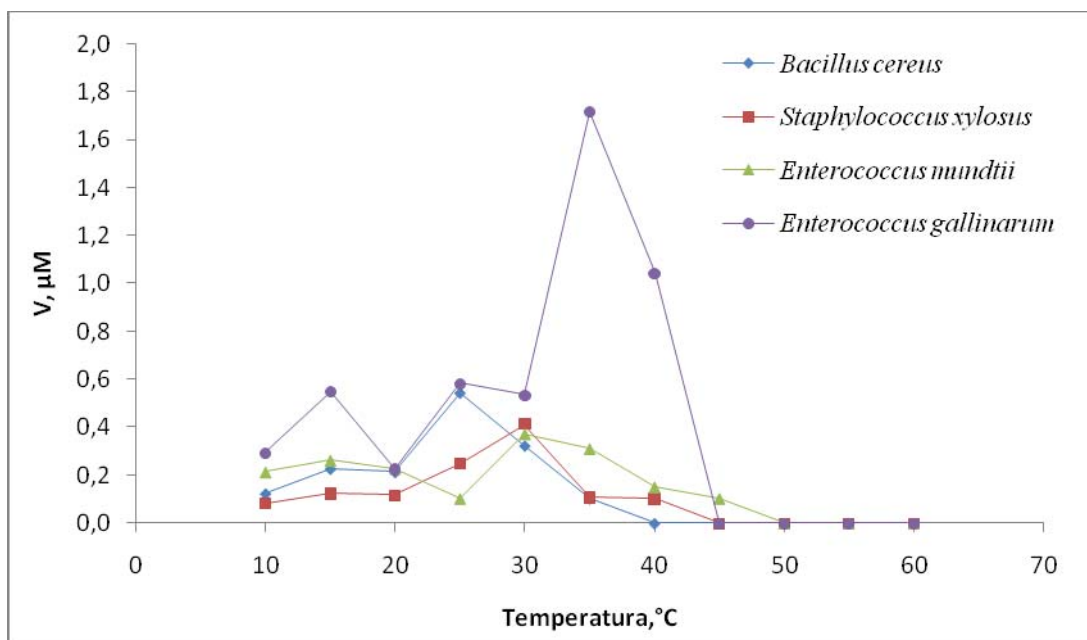


**Figura 14:** Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME.

A Figura 15 apresenta os perfis de atividade esterásica em função da temperatura para as proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o substrato L-TAME, verificando que as serino proteases bacterianas apresentam mais de um pico pronunciados de atividade em diferentes valores de temperatura, o que nos leva sugerir sugerem novamente diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Nesse sentido verificamos

que a temperatura de maior atividade para as proteases de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* foram 25°C, 30°C, 30°C e 35°C, respectivamente.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por OLIVEIRA *et al.* (2005), em estudos com proteases solúveis extraídas do intestino médio de *A. gemmatilis*, onde a temperatura ótima de 30°C foi verificada quando L-TAME foi utilizado. SILVA-LOPEZ *et al.* (2004), estudando serino proteases de *Leishmania amazonensis* verificaram atividade esterásica maximizada na temperatura de 28°C sobre o L-TAME. Desse modo, os valores de temperatura de maior atividade esterásica para as serino proteases presente nos extratos enzimáticos bacterianos estão condizentes com as temperaturas ótimas encontradas por outros autores.



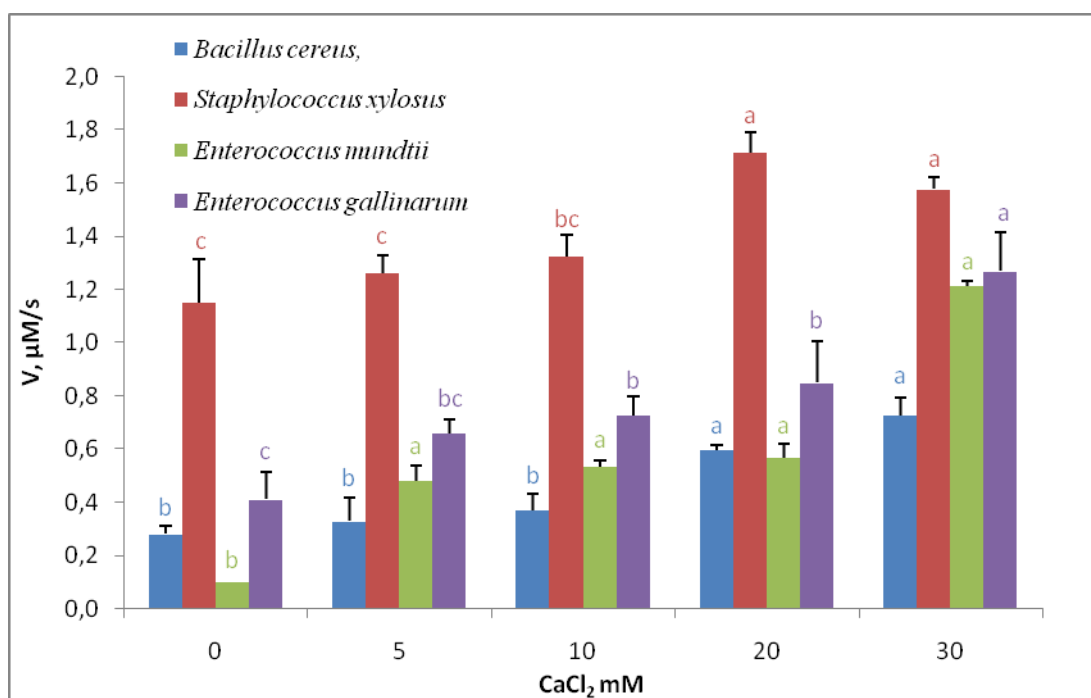
**Figura 15:** Efeito de temperatura sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-TAME

#### 5.4.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de serino proteases

As atividades das serino proteases dos extratos enzimáticos bacterianos frente ao L-TAME foram maiores numa concentração em torno de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  na mistura de reação para *S. xylosum* e em torno de 30 mM Para *B. cereus*, *E. mundtii* e *E. gallianrum* (Figura 16). Observando a Figura 16, verificamos que as proteases de *Enterococcus mundtii* tiveram um maior aumento na atividade esterásica do que as proteases das outras bactérias como observado anteriormente para a atividade amidásica (Figura 7). O que novamente nos permite

nos leva a inferir que o cálcio teve um papel maior na estabilização das proteases de *Enterococcus mundtii*, comparativamente às proteases dos outros microrganismos.

Nossos resultados são similares aos de FEDATTO *et al.* (2006), estudando proteases excretadas por *Xylella fastidiosa* caracterizadas como serino proteases. Neste trabalho foi verificado um aumento da atividade dessas proteases em presença de 1 mM de íons cálcio. O mesmo foi observado por NASCIMENTO *et al.* (2004), em estudos com proteases termofílicas de *Bacillus sp.*, onde verificaram que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  estimularam a atividade dessas proteases. De acordo com NASCIMENTO *et al.* (2004), os íons cálcio aparentemente protegem a enzima contra a desnaturação térmica e desempenham um papel vital na manutenção da conformação da enzima ativa em temperaturas elevadas.



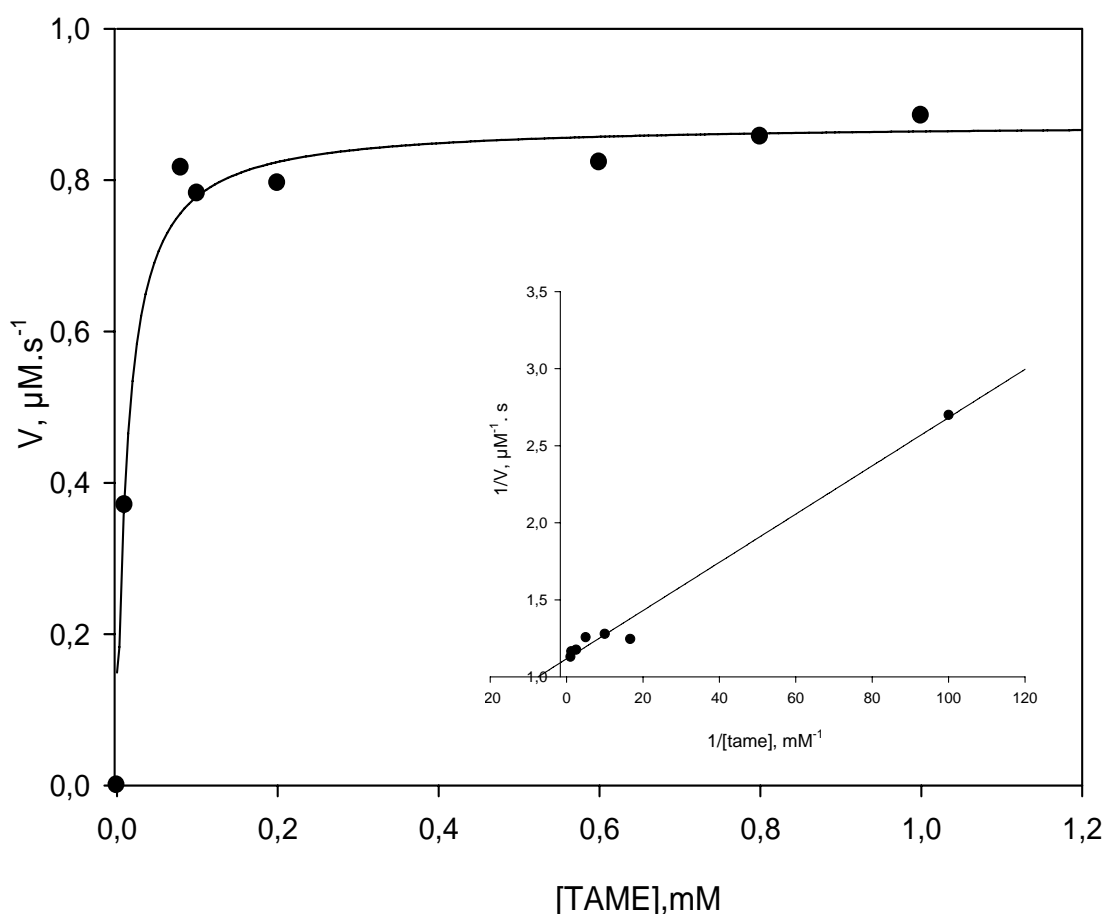
**Figura 16:** Efeito de íons cálcio sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com GENOV *et al.*, (1995), íons metálicos desempenham um papel importante na estabilização de muitas enzimas, através da ligação a sítios específicos na proteína. Assim, nossos resultados demonstram novamente que as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* estejam sendo estabilizados pelos íons cálcio, os quais podem ter função de proteger contra autólise e melhorar a conformação do centro ativo aumentando a atividade em presença deste íon.

### 5.4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-TAME

O gráfico de Michaelis-Menten para as serino proteases de *B. cereus* sobre o substrato L-TAME encontra-se representado na Figura 17. Nesta figura encontra-se ainda inserido o gráfico de Lineweaver-Burk.

Todas as serino proteases dos extratos das bactérias analisadas apresentaram gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que essas enzimas seguem a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de L-TAME avaliada. Os gráficos com as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentaram perfis semelhantes (dados não mostrados).



**Figura 17:** Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino-protease, de *Bacillus cereus*, isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*. Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de  $K_M$  app e  $V_{\text{max}}$  app.

Na tabela 6 estão apresentados, os parâmetros cinéticos  $K_M$  app e  $V_{\text{máx}}$  app de serino proteases determinadas utilizando as concentrações de substrato L-TAME de 0,01 a 1,0 mM

em pHs e temperaturas de acordo com a tabela 2, para os extratos obtidos bacterianos. As serino proteases de *S. xylosus* e *E. gallinarum* apresentaram, respectivamente,  $K_{M\ app}$  com valores de 48,50  $\mu\text{M}$  e 45,20  $\mu\text{M}$ , sendo estes maiores que os  $K_{M\ app}$  das serino proteases de *B. cereus* e *E. mundtii* que apresentaram  $K_{M\ app}$  12,40  $\mu\text{M}$  e 18,20  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Entretanto, para a atividade esterásica, os  $K_{M\ app}$  foram semelhantes, com os valores na mesma ordem de grandeza, mostrando afinidade semelhante de L-TAME pelo centro ativo de serino proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatalis*

Estes dados, como já verificado nos fatores pH e temperatura, mostram semelhança entre o parâmetro cinético  $K_{M\ app}$  para proteases extraídas do intestino *A. gemmatalis*, utilizando como substrato L-TAME. OLIVEIRA *et al.* (2005), encontraram para as proteases solúveis parcialmente purificadas  $K_{M\ app}$  de 95,4  $\mu\text{M}$ . XAVIER *et al.* (2005), estudando as proteases ligadas a membrana, verificaram um valor de  $K_{M\ app}$  52,5  $\mu\text{M}$ .

Além dos dados das proteases de *A. gemmatalis* os resultados desse trabalho são semelhantes com outros valores de  $K_M$  encontrados por vários autores para serino proteases utilizando o substrato L-TAME. NIKANDROV *et al.* (2005), estudando proteases de veneno de serpente *Deinagkistrodon actus* verificaram um  $K_{M\ app}$  59  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 6:** Parâmetros cinéticos de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis* sobre o substrato L-TAME

Bactérias produtoras de proteases	Substrato	$K_{M\ app}$	$V_{max\ app}$
<i>Bacillus cereus</i>	L-TAME	12,40 $\mu\text{M}$	0,87 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
<i>Stapylococcus xylosus</i>	L-TAME	48,50 $\mu\text{M}$	0,56 $\mu\text{M}\ \text{s}^{-1}$
<i>Enterococcus mundtii</i>	L-TAME	18,20 $\mu\text{M}$	0,69 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
<i>Enterococcus gallinarum</i>	L-TAME	45,20 $\mu\text{M}$	21,52 $\mu\text{M}\ \text{s}^{-1}$

Quando comparamos os valores de  $K_{M\ app}$  obtidos utilizando o substrato amida L-BApNA (Tabela 5), com aqueles obtidos utilizando o substrato esterásico, L-TAME (Tabela 6), observamos que as serino proteases bacterianas possuem maior afinidade pelo substrato L-TAME do que pelo L-BApNA, uma vez que os  $K_{M\ app}$  para L-BApNA foram em torno de  $10^{-3}$  M, enquanto o  $K_{M\ app}$  para o L-TAME foram em torno de  $10^{-6}$  M.

Assim, a maior eficiência do “binding” enzima-substrato éster (L-TAME), pode estar relacionada ao mecanismo da reação catalisada pelas serino proteases. Estas enzimas, durante

a atividade amidásica apresentam a etapa de acilação lenta, com formação de acil-enzima, porém, a etapa de deacilação com formação de produto é rápida. Por outro lado, durante a atividade esterásica, a etapa de acilação é rápida e a deacilação é lenta. Portanto, a etapa determinante da velocidade da reação de hidrólise de substratos amidas por enzimas tripsina-*like* é a etapa de acilação com formação de acil-enzima, enquanto que a etapa determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a desacilação, com conseqüente formação de produto (INAGAMI, 1971; FASTREZ & FERSHT, 1973).

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

Assim a tabela 7 mostra valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos das serino proteases do extrato do intestino médio de *A. gemmatalis* e das serino proteases excretadas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* utilizando os substrato L-BApNA e L-TAME. Verificamos então que os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* são semelhantes aos das enzimas presentes no intestino deste inseto.

Estes dados mostram que um mecanismo de controle da lagarta da soja utilizando-se inibidores de serino proteases poderá ocorrer com um único tipo de inibidor, desde que potente, para as três formas de enzimas presentes no processo digestivo, ou seja, da fração solúvel, das proteases ligadas à membrana e produzidas pela microbiota de *A. gemmatlis*, uma vez que parâmetros cinéticos são semelhantes para todas as três formas de proteases presentes no meio.

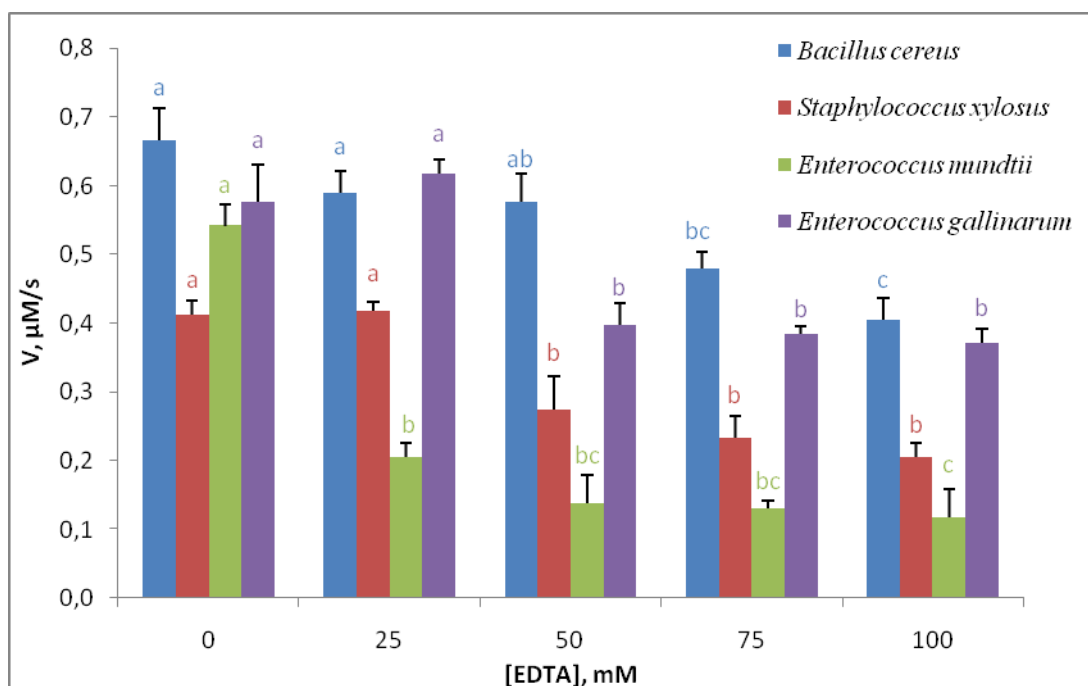
**Tabela 7:** Propriedades das atividades enzimáticas de proteases presentes nos extratos do intestino médio de *A. gemmatalis* (produzidas pelos insetos) e proteases presentes em extratos de bactérias isoladas do seu trato intestinal

Espécie	Classe protease	Substrato	pH ótimo	$K_M$ app	$V_{max}$ app	Referências
<i>Bacillus cereus</i>	Serino-protease	L-BApNA	8,5	0,15 mM	16,64 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Serino-protease	L-BApNA	8,5	0,12 mM	14,33 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus mundtii</i>	Serino-protease	L-BApNA	7,5	0,14 mM	28,22 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Serino-protease	L-BApNA	8,5	0,26 mM	1,12 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato solúvel)	Serino-protease	L-BApNA	8,5	0,32 mM	0,48 μM.s <sup>-1</sup>	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2005
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato insolúvel)	Serino-protease	L-BAPNA	8,0	0,23 mM	21,8 nM.s <sup>-1</sup>	XAVIER <i>et al.</i> 2005
<i>Bacillus cereus</i>	Serino-protease	L-TAME	8,5	12,40 μM	0,87 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Serino-protease	L-TAME	8,5	48,50 μM	0,56 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus mundtii</i>	Serino-protease	L-TAME	7,5	18,20 μM	0,69 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Serino-protease	L-TAME	8,5	45,20 μM	21,52 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato solúvel)	Serino-protease	L-TAME	8,5	52,5 μM	0,61 μM.s <sup>-1</sup>	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2005
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato insolúvel)	Serino-protease	L-TAME	8,0	95,4 μM	0,82 μM. s <sup>-1</sup>	XAVIER <i>et al.</i> 2005

#### 5.4.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de serino proteases

##### 5.4.4.1. Efeito de EDTA

A Figura 18 apresenta o efeito da concentração de EDTA sobre as serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xyloso*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao substrato L-TAME. Verificou-se que ocorreu um decréscimo nos valores das atividades esterásicas com o aumento da concentração de EDTA para as serino proteases de todas as bactérias como anteriormente observado para a atividade amidásica (Figura 9). As atividades foram determinadas na presença 20 mM de íons cálcio na mistura de reação, e possivelmente o EDTA, agiu seqüestrando estes íons, levando a diminuição da atividade esterásica como para a atividade amidásica(Figura 9). Observamos também que proteases de *E. mundtii* tiveram uma maior diminuição na atividade esterásica do que as proteases das outras bactérias como observado anteriormente para a atividade amidásica (Figura 9), demonstrando assim que o cálcio tem um papel importante na estabilização das serino proteases bacterianas, sendo as serino proteases de *E. mundtii* as mais sensíveis aos íons cálcio.

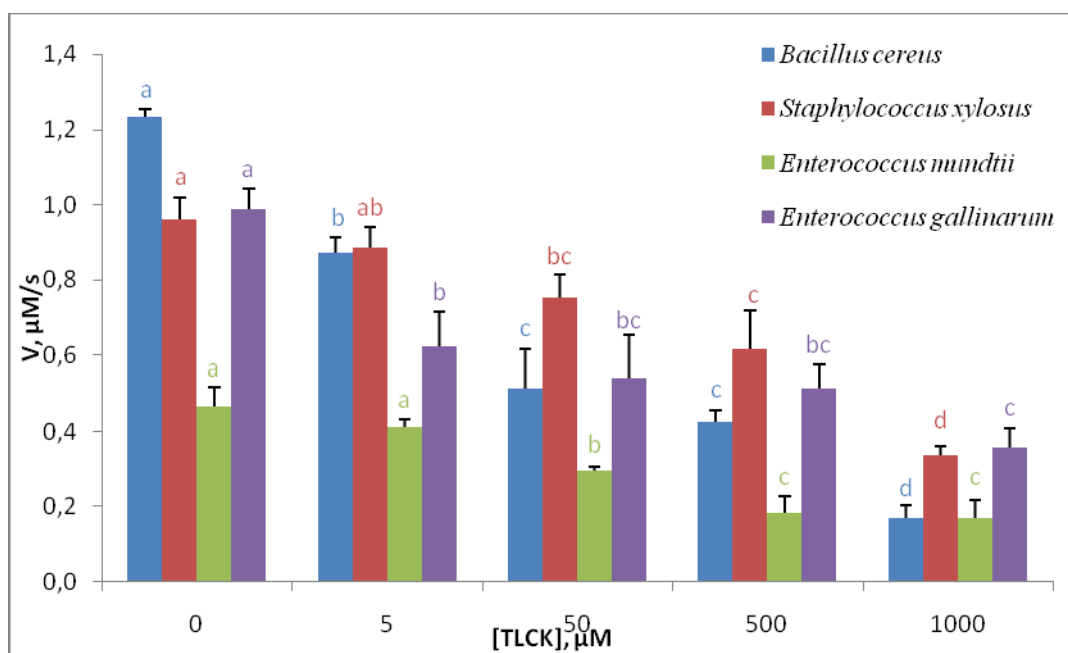


**Figura 18:** Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal médio de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.4.4.2. Efeito de TLCK

O aumento da concentração de TLCK, causou uma redução significativa da atividade das serino proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME(Figura 19). As enzimas tripsina-like também possuem atividades esterásicas sobre ligações éster de substratos sintéticos, como é o caso do L-TAME, devido ao fato de essa ligação mimetizar a ligação amida nas ligações peptídicas das proteínas.

Nossos resultados foram semelhantes com outros autores em estudos do efeito de TLCK sobre serino proteases frente ao substrato L-TAME. SILVA-JUNIOR *et al.* (2007), estudando as serino proteases de *Bothrops jararacussu*, verificaram uma inibição de 28% na atividade esterásica frente o inibidor TLCK. SILVA-LOPEZ *et al.* (2004,) em estudos sobre o efeito de TLCK em serino proteases de *Leishmania amazonensis* observaram 30% de inibição sobre a atividade esterásica o que os levaram a sugerir que as proteases presentes nos seus extratos enzimáticos continham enzimas tripsina-like.



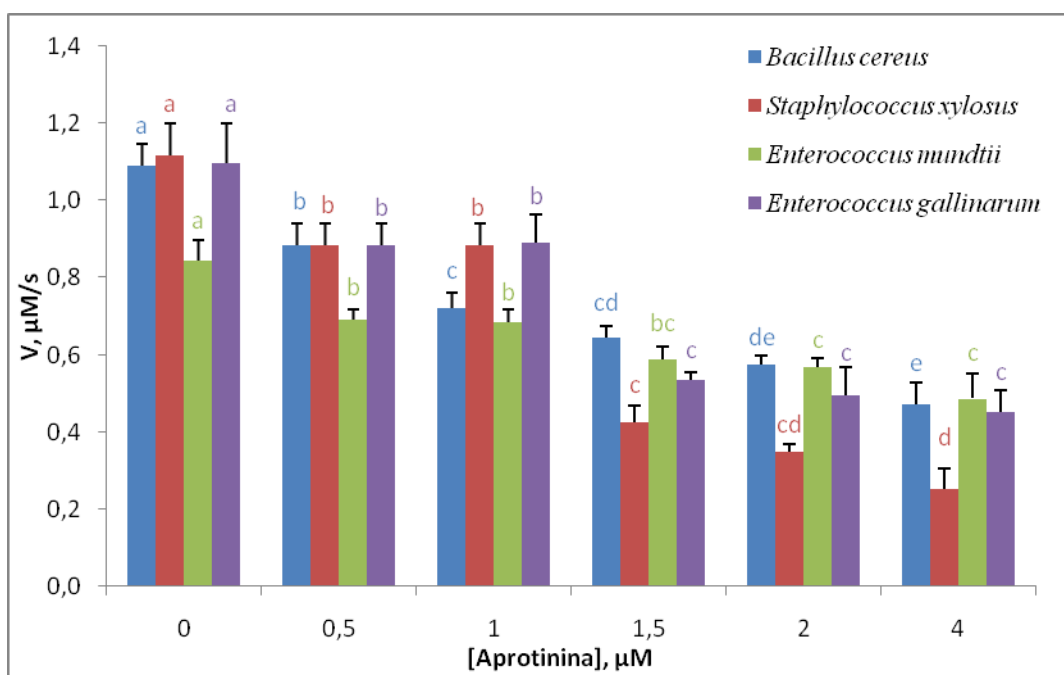
**Figura 19:** Efeito de TLCK sobre as atividades de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Dessa forma, como observado anteriormente para a atividade amidásica (Figura 9), nossos resultados indicam que as serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatilis* contêm enzimas tripsina-like e que estas possivelmente estejam sofrendo

alquilação de resíduos de histidina da tríade catalítica de seus centros ativos causando conseqüente diminuição da atividade esterásica frente ao TLCK.

#### 5.4.4.3. Efeito de Aprotinina

Analizamos o efeito de aprotinina, inibidor protéico competitivo de serino proteases, sobre os extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-TAME, mostram que os valores das atividades esterásicas diferem ( $p < 0,05$ ) em função do aumento da concentração de aprotinina para todas as bactérias (Figura 20).



**Figura 20:** Efeito de Aprotinina sobre as atividades de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal médio de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

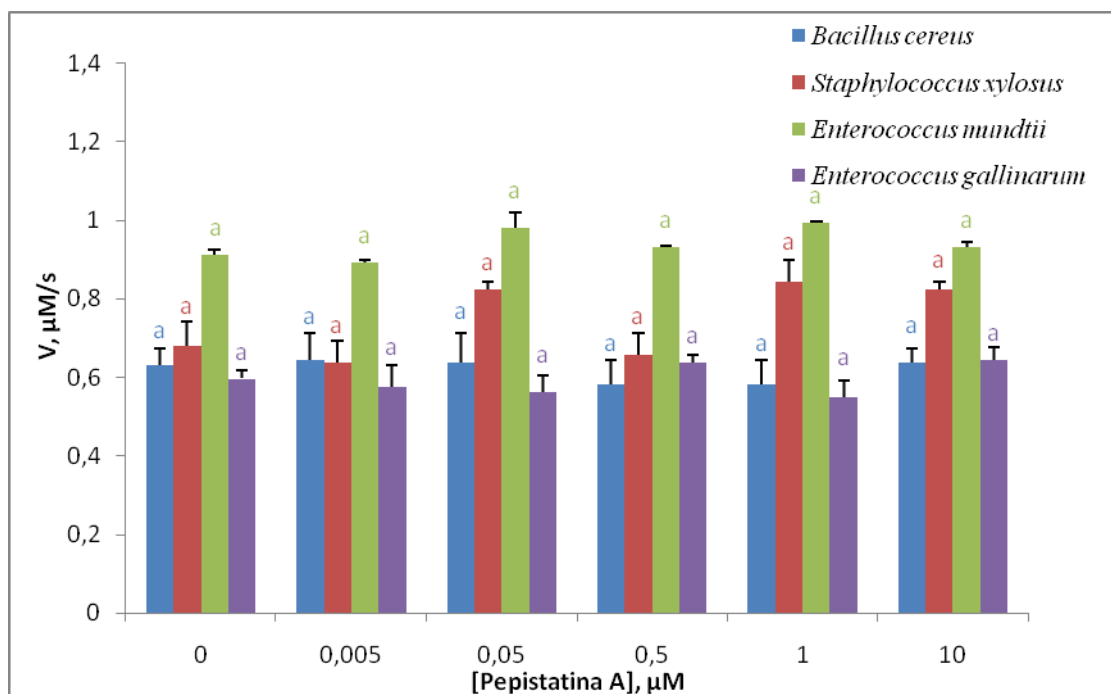
Estes resultados também são semelhantes aos de FEDATTO *et al.* (2006), onde estudando o efeito de inibidores em serino protease de *Xylella fastidiosa*, verificaram uma inibição total da atividade dessas proteases em presença de 0,1 mM de aprotinina. SILVA-JUNIOR *et al.* (2007), em estudos sobre o efeito de aprotinina em enzimas thrombin-like de *Bothrops jararacussu*, verificaram uma inibição de 47% na atividade esterásica frente o substrato L-TAME.

Deste modo, como observado anteriormente para a atividade amidásica (Figura 11) a atividade esterásica (Figura 20) das serino proteases dos extratos das bactérias isoladas do

trato intestinal de *A. gemmatalis*, também sofreram redução frente ao inibidor competitivo de serino proteases aprotinina. Assim, mais uma vez, nossos dados sugerem a presença de enzimas tripsina-like nos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*

#### 5.4.4.5. Efeito de Pepstatina A

O efeito de Pepstatina A, um inibidor de aspartil protease, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME não diferiu ( $p>0,05$ ) nas concentrações analisadas sobre as atividades esterásica(Figura 21).



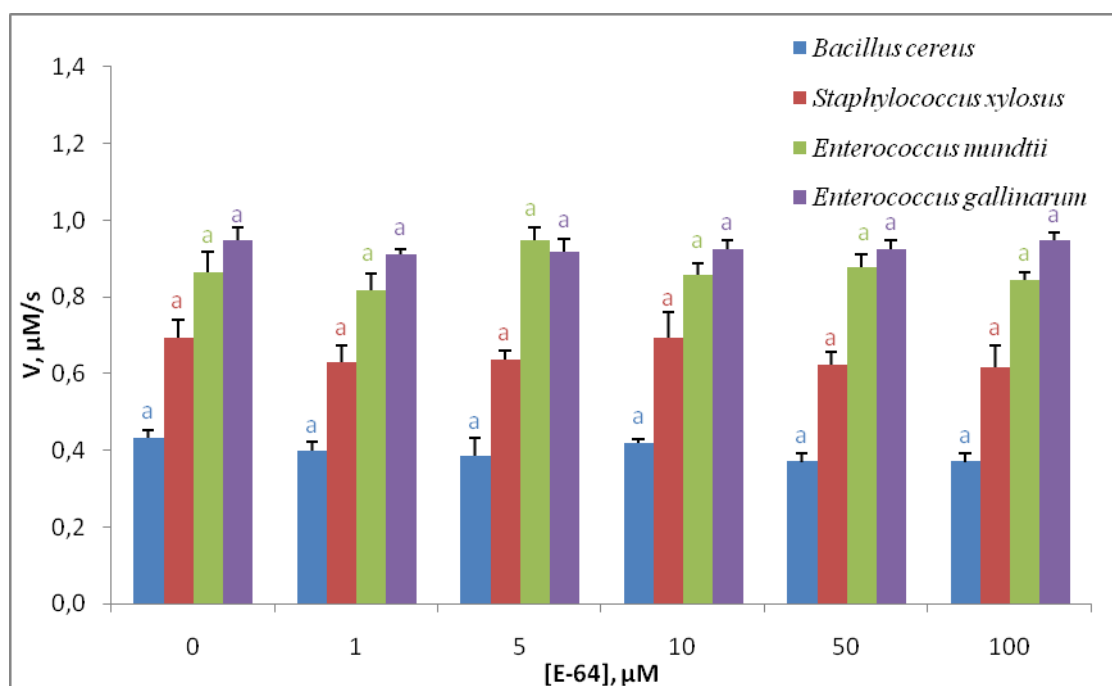
**Figura 21:** Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal médio de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nossos resultados são semelhantes aos de SILVA-LOPEZ *et al.*(2004), onde estes observaram a não influência de Pepstatina A na atividade de proteases de *Leishmania amazonensis* sobre o substrato L-TAME, obtendo um valor de 100% de atividade esterásica quando adicionado 1 μM desse inibidor. O mesmo foi observado por CALDAS *et al.* (2002), onde obtiveram 94% de atividade em estudos da influência do inibidor Pepstatina A sobre serino proteases de enterobactéria *Xenorhabdus nematophila*. Pepstatina A também não afetou a atividade proteases alcalinas produzida pela bactéria *Salinivibrio* sp., obtendo 95% de

atividade residual quando adicionado 1  $\mu\text{M}$  desse inibidor (KARBALAEI-HEIDARI *et al.*,2006).

#### 5.4.4.5. Efeito de E-64

O efeito de E-64, inibidor de cisteíno proteases, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME não diferiu ( $p>0,05$ ) nas concentrações analisadas sobre as atividades esterásica(Figura 22), como observado anteriormente para a atividade amidásica (Figura 13)



**Figura 22:** Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

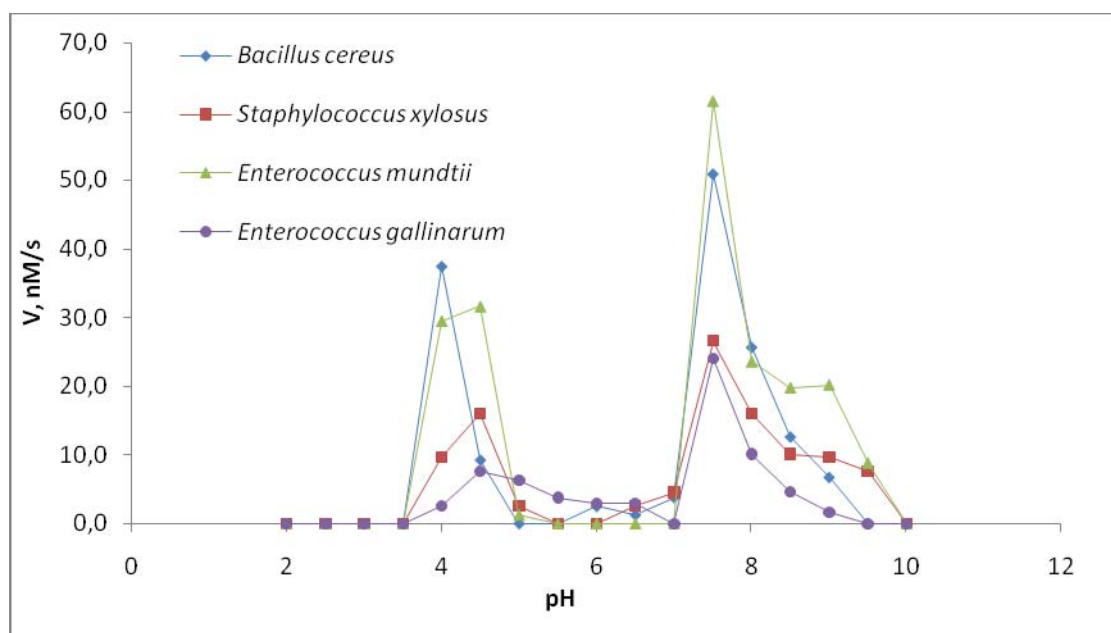
O mesmo foi observado por SILVA-LOPEZ *et al.* (2004), em estudos do efeito do inibidor E-64 sobre as proteases de *Leishmania amazonensis* frente o substrato L-TAME, de acordo com os autores não houve efeito significativo na atividade obtendo um valor de 85% de atividade quando adicionado 10  $\mu\text{M}$  desse inibidor. SILVA-JUNIOR *et al.* (2007), estudando o efeito de E-64 em proteases de *Bothrops jararacussu*, verificaram uma inibição de 98% na atividade esterásica frente o substrato L-TAME, quando adicionado 10 mM desse inibidor. E-64 também não afetou a atividade de serino proteases de enterobactéria

*Xenorhabdus nematophila*, obtendo 114% de atividade residual quando adicionado 5  $\mu$ M desse inibidor (CALDAS *et al.*, 2002).

## 5.5. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas utilizando o substrato L-BApNA

### 5.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade amidásica

Os perfis de atividade de cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, mostram que todos os extratos apresentam dois picos mais pronunciados de atividade em diferentes valores de pH (Figura 23). Estes resultados sugerem diferentes formas de cisteíno proteases presentes nos extratos enzimáticos. Contudo, observa-se pelos perfis da figura 23 que os maiores valores de atividade obtido nas proteases bacterianas, na faixa de pH utilizada (Tabela 1), dentro das condições descritas anteriormente, foi pH 7,5 para todas as bactérias



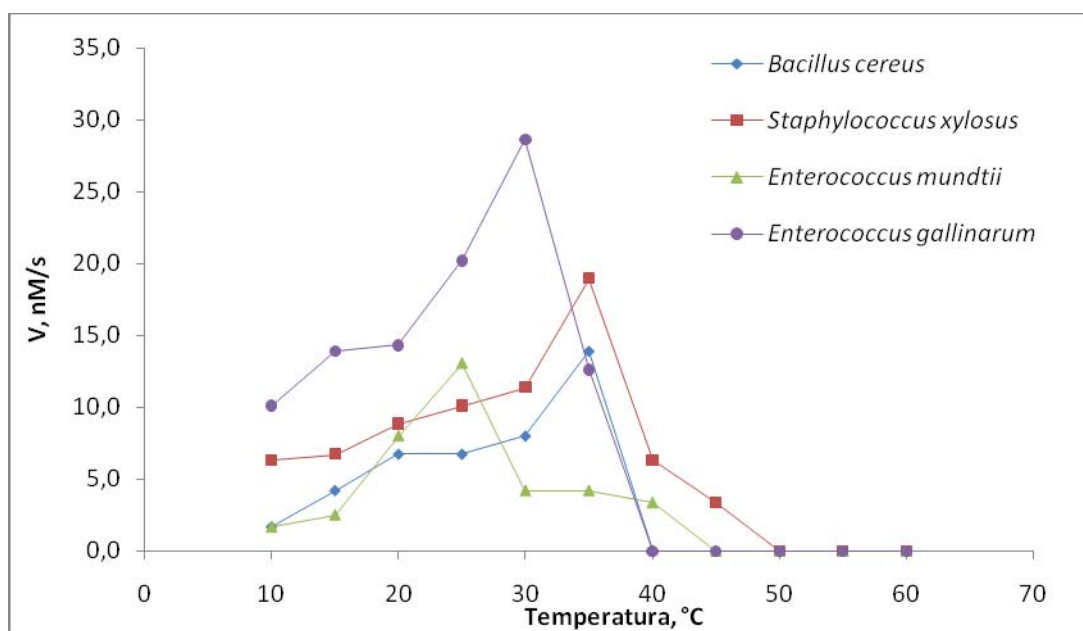
**Figura 23:** Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA.

Analisando o efeito de pH sobre a atividade de cisteíno-proteases, em pH ao redor de neutro estão semelhantes com aqueles encontrados por RAPHAEL *et al.* (2000), em estudos com cisteíno proteases de *Plasmodium falciparum*, onde estes verificaram uma faixa de pH de máxima atividade entre 7,0 e 7,5. VALASAKI *et al.* (2008), 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. HIRASE *et al.* (2001), caracterizando cisteíno protease de *Echinochloa crus-galli*, encontraram atividade máxima entre pH 7.4 e 9.0.

De acordo com RAO *et al.* (1998), as cisteíno proteases apresentam maior atividade em pH neutro. Portanto os nossos resultados encontrados de cisteíno proteases bacterianas utilizando como substrato L-BApNA estão, dentro da faixa de pH obtida em outros estudos.

A figura 24 apresenta os perfis de atividade em função da temperatura para as cisteíno proteases bacterianas sobre o substrato L-BApNA, onde podemos observar que todas as cisteíno proteases bacterianas apresentam mais de um pico pronunciados de atividade em diferentes valores de temperatura. Estes resultados sugerem novamente diferentes isoformas de serino proteases presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto é possível observar que nos perfis de *B. cereus* e de *S. xylosus* o pico com maior valor de atividade foi na temperatura de 35°C, já para *E. mundtii* é possível observar um pico bem evidente a 25°C. Verificamos ainda que no perfil de *E. gallinarum* o maior valor de atividade ocorreu na temperatura de 30°C.



**Figura 24:** Efeito da temperatura sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BApNA.

MENDONÇA (2008), estudando cisteíno proteases do extrato solúvel do intestino médio de *A. gemmatilis* encontrou uma temperatura ótima de 35°C utilizando o substrato L-BApNA. MOHAMED *et al.* (2005), caracterizando proteases de *Fasciola gigantica* verificaram que estas eram estáveis até 40°C, e que após esta temperatura as proteases perdiam sua atividade. LIU *et al.* (2008), encontraram para cisteíno proteases de Catepsina B isoladas de músculos de carpa *Hypophthalmichthys molitrix* um máximo de atividade na

temperatura de 35<sup>0</sup>C. Assim, os valores de temperatura de maior atividade encontrados para as cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* isoladas do intestino de *A. gemmatilis* estão similares com os valores encontrados por esses autores.

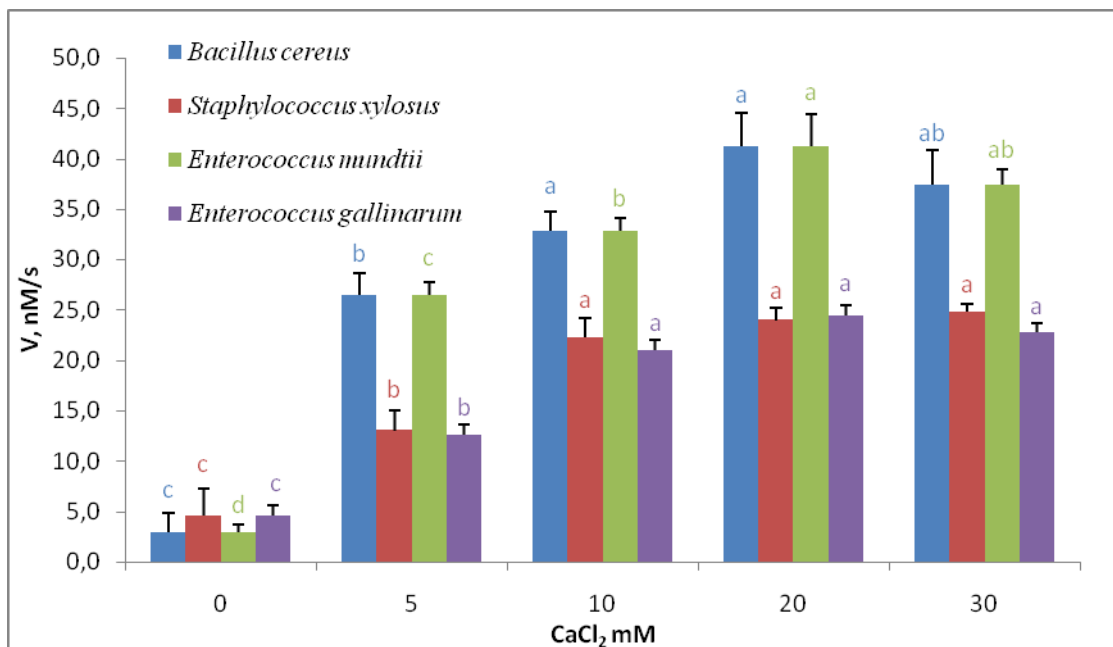
### 5.5.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de cisteíno proteases

As atividades das cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-BApNA foram maiores numa concentração em torno de 20 mM de CaCl<sub>2</sub> na mistura de reação para todas as bactérias (Figura 25). Possivelmente estas enzimas possuem sítios de ligação para íons Ca<sup>2+</sup> os quais podem ter função de proteger contra autólise e melhorar a conformação do centro ativo aumentando a atividade em presença deste íon. Observa-se ainda que as proteases de *B. cereus* tiveram um maior aumento na atividade amidásica em resposta ao aumento da concentração de íons cálcio do que as proteases das outras bactérias. Esse resultado nos leva a inferir que o cálcio teve um papel maior na estabilização das proteases de *B. cereus*, comparativamente às proteases dos outros microrganismos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em trabalho realizado com cisteíno proteases insolúveis no intestino médio de *A. gemmatilis* utilizando o substrato L-BApNA (MENDONÇA, 2008). Estes autores verificaram um aumento da atividade dessas proteases em presença de 20 mM de cálcio. FAHMY *et al.* (2004), estudando o efeito de íons metálicos em cisteíno protease do *Triticum aestivum* observaram uma atividade relativa de 79%. VALASAKI *et al.* (2008) também caracterizaram uma cisteíno protease cálcio-dependente de *Lactobacillus helveticus*.

Como descrito anteriormente de acordo com 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 como para serino-protease, a estrutura do centro ativo de cisteíno deve ser semelhante ao de serino protease e conter sítios de ligação de cálcio.

Assim, nossos resultados sugerem que as enzimas proteolíticas do tipo cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-BApNA possivelmente estejam sendo estabilizadas pelos íons cálcio, levando a uma

mudança na conformação das moléculas das enzimas e melhorando o posicionando do centro ativo, acarretando assim aumento da atividade em presença de íons cálcio.



**Figura 25:** Efeito de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra e cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

### 5.5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de serino proteases sobre o L-BApNA

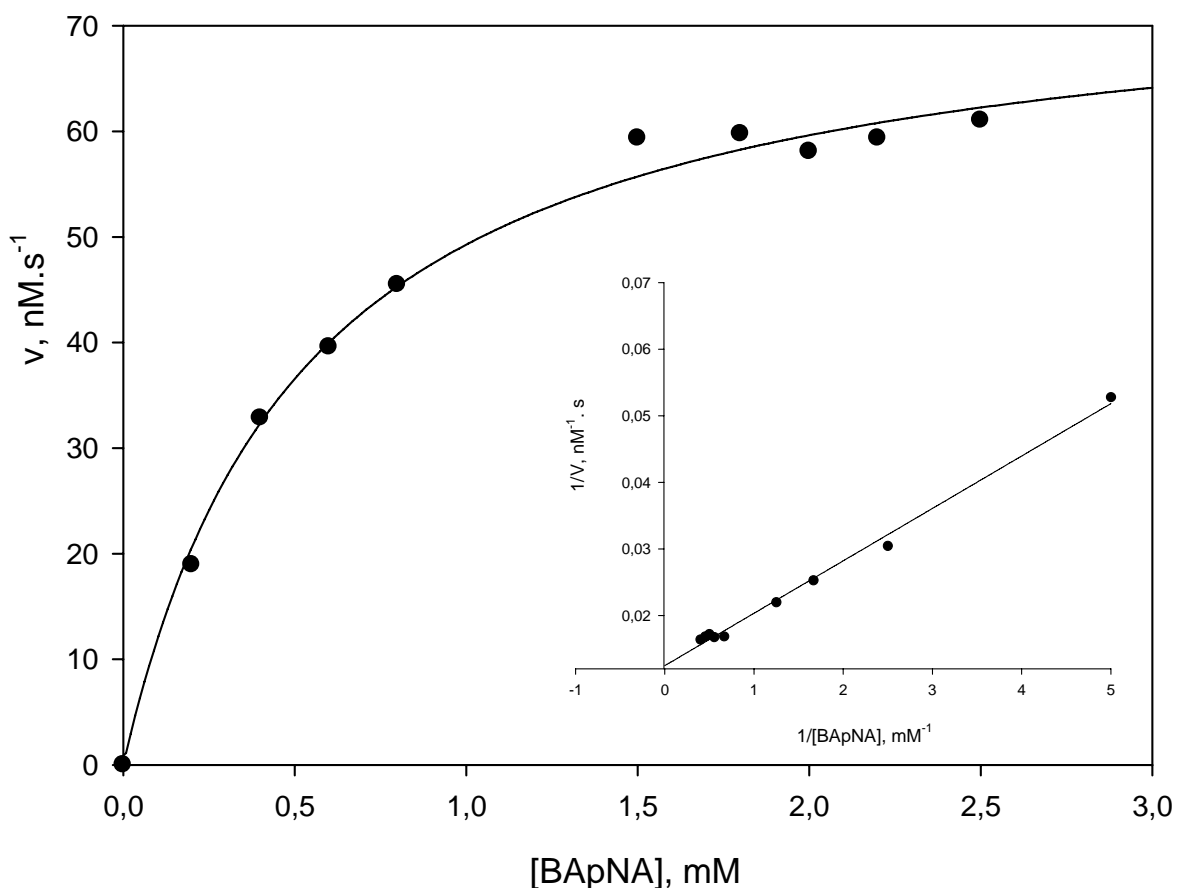
O gráfico de Michaelis-Menten para as cisteíno proteases *Bacillus cereus* sobre o substrato L-BApNA encontra-se representado na figura 26. Nesta figura encontra-se ainda inserido o gráfico de Lineweaver-Burk.

Ambas as proteases dos extratos enzimáticos das bactérias apresentam gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que as cisteíno proteases dessas bactérias seguem a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato L-BApNA analisada. Os gráficos das cisteíno proteases de *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentaram perfis semelhantes (dados não mostrados)

Na tabela 8 estão apresentados, os parâmetros cinéticos  $K_{M\ app}$  e  $V_{máx\ app}$  de cisteíno proteases determinadas utilizando as concentrações de 0,2 a 2,5 mM de L-BApNA em pHs e temperaturas de acordo com a tabela 3, para os extratos bacterianos.

O valor de  $K_{M\ app}$  das cisteíno proteases de *E. gallinarum* foi 0,70 mM sendo ligeiramente maior do que as cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* que foram de 0,67 mM, 0,63 mM e 0,67 mM, respectivamente. Entretanto, para a atividade amidásica, os

$K_{M\text{ app}}$  foram semelhantes, com os valores na mesma ordem de grandeza, mostrando afinidade semelhante de L-BApNA pelo centro ativo de cisteíno proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatalis*.



**Figura 26:** Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno protease, de *Bacillus cereus*, isolado do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua tracejada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de  $K_{M\text{ app}}$  e  $V_{\text{max app}}$ .

De acordo com MENDONÇA (2008), as cisteíno proteases do extrato insolúvel do intestino médio de *A. gemmatlis* apresentaram um  $K_M$  de 0,44 mM utilizando o substrato L-BApNA. VALASAKI *et al.* (2008), purificaram duas cisteíno proteases de *Lactobacillus helveticus*, a cisteíno-protease cálcio dependente Hmm-protease-Lh apresentou  $K_M$  de 0,72 mM sobre o substrato Suc-FR-pNA. MOHAMED *et al.* (2005), encontraram um  $K_M$  de 0,6 mM para cisteíno proteases do parasita *Fasciola gigantica* sobre o substrato L-BApNA. Desse modo os valores de  $K_M$  aqui encontrados foram, portanto, dentro da faixa de valores de  $K_M$  obtidos por outros autores para cisteíno proteases, utilizando substratos *p*-nitroanilidas.

**Tabela 8:** Parâmetros cinéticos de cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA

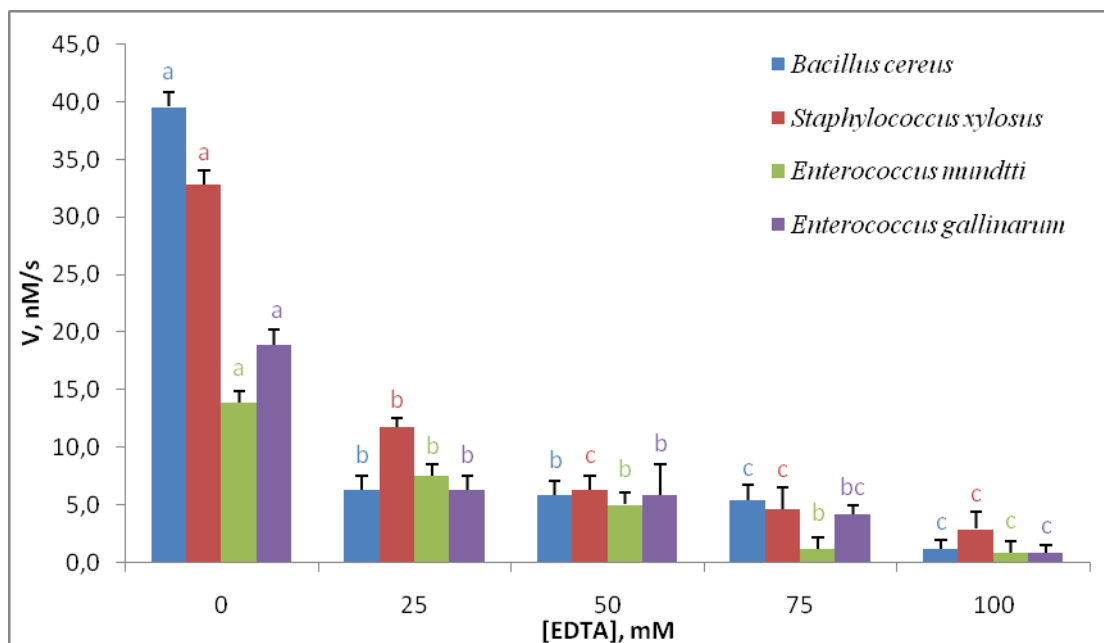
Bactérias produtoras de proteases	Substrato	$K_M$ app	$V_{max}$ app
<i>Bacillus cereus</i>	L-BApNA	0,67 mM	75,57 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	L-BApNA	0,63 mM	27,83 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Enterococcus mundtii</i>	L-BApNA	0,67 mM	47,30 nM.s <sup>-1</sup>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	L-BApNA	0,70 mM	30,75 nM.s <sup>-1</sup>

#### 5.5.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno proteases

##### 5.5.4.1. Efeito de EDTA

A figura 27 apresenta o efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e quelante de íons  $Ca^{+2}$ , sobre cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-BApNA. De acordo com a figura 28 ocorreu decréscimo nos valores de atividades com o aumento da concentração de EDTA para as cisteíno proteases bacterianas. Como a atividade foi determinada em presença de 20 mM de íons cálcio na mistura de reação, possivelmente o EDTA, agente quelante de cálcio, agiu sequestrando estes íons. As proteases de *B. cereus* tiveram uma maior diminuição na atividade do que as proteases das outras bactérias. Isso demonstra a importância de íons  $Ca^{2+}$  para a atividade das cisteíno proteases, sendo as cisteíno proteases de *B. cereus* mais sensíveis aos íons cálcio.

Dessa mesma forma MENDONÇA (2008), verificou uma redução na atividade das cisteíno proteases do extrato insolúvel do intestino médio de *A. gemmatlis* quando acrescidos de concentrações crescentes de EDTA em presença de 20 mM de  $CaCl_2$  frente ao L-BApNA. Assim nossos resultados encontrados frente o inibidor EDTA (Figura 28), conjugados com o efeito de íons  $Ca^{2+}$  sobre atividade amidásica de cisteíno proteases dos extratos bacterianos (Figura 26), mostram a exigência de íons  $Ca^{2+}$  para a atividade catalítica, das cisteíno proteases de das bactérias isoladas *A. gemmatlis*.



**Figura 27:** Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.5.4.2. Efeito de E-64

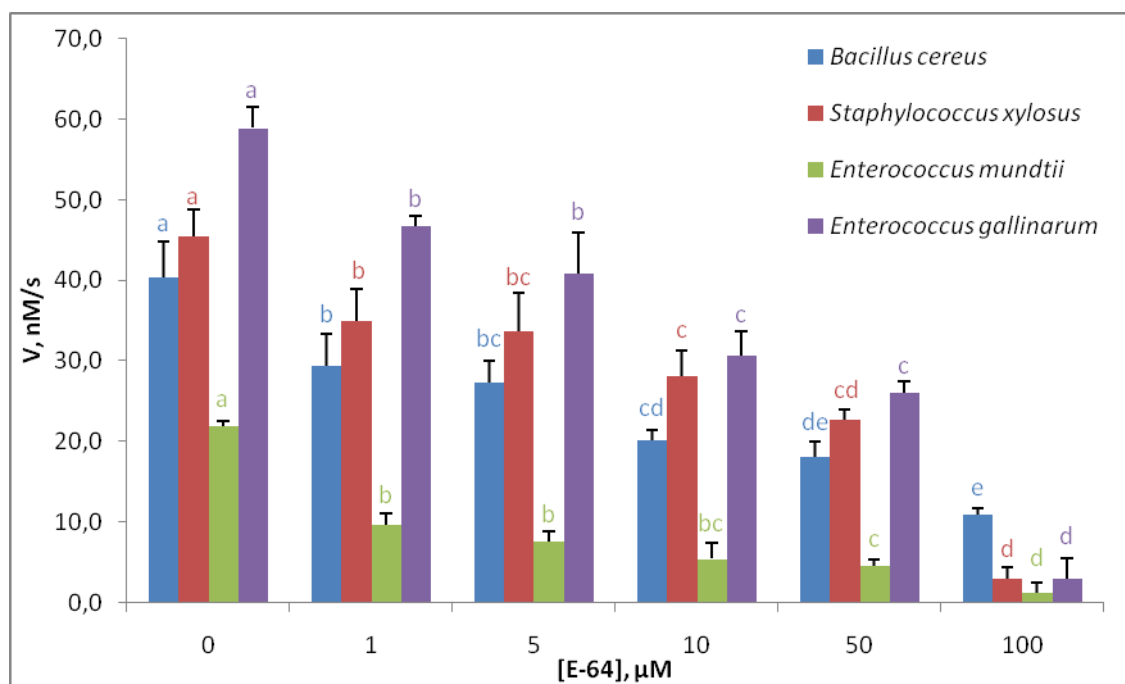
Peptídeo epóxido pertence a um grupo de inibidores irreversíveis baseado na composição de E-64 [N-(L-3-trans-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil-amido (4guanidino) butano], um inibidor de baixo peso molecular 357,4. O inibidor E-64 foi isolado originalmente a partir de cultura de *Aspergillus japonicus* (HANADA *et al.*, 1978). Este inibidor caracteriza uma inibição irreversível, não competitiva de cisteíno proteases pertencentes às famílias papaína e calpaínas (HANADA *et al.*, 1978; HASHIDA *et al.*, 1980; BARRETT *et al.*, 1982; PARKES *et al.*, 1985). 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). Uma forma comumente utilizada para a caracterização de cisteíno protease é a utilização de E-64 (BEYNON e SALVESEN, 1989; BARRETT, 1994).

A Figura 28 apresenta o perfil do efeito de E-64 sobre cisteíno protease dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* utilizando como substrato L-BApNA. Em todos os casos houve uma diminuição da atividade amidásica com o aumento da concentração de E-64 para as cisteíno proteases bacterianas.

Nossos resultados foram semelhantes aos de MENDONÇA (2008), em estudos com cisteíno proteases do extrato solúvel e insolúvel do intestino médio de *A. gemmatilis*, frente ao

L-BApNA. Nos dois casos houve diminuição significativa da atividade quando comparado com o controle. De acordo com esse autor pequenas concentrações de E-64 são suficientes para inibir a atividade dessa protease, mostrando que essas são cisteíno-proteases papaína-like.

Desse modo nossos dados indicam a presença de cisteíno proteases papaína-like nos extratos enzimáticos de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.



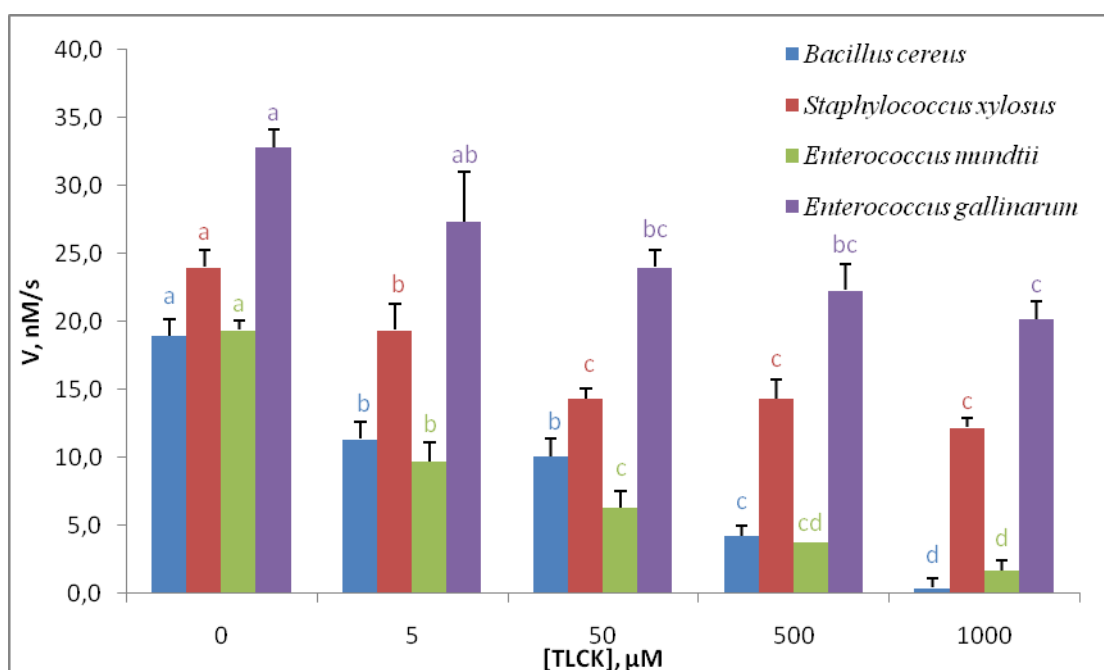
**Figura 28:** Efeito de E-64 sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra e cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.5.4.3. Efeito de TLCK

O aumento da concentração de TLCK causou uma redução significativa da atividade de cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o L-BApNA(Figura 29).

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 com resíduos de histidina das proteínas. Porém, a

tríade catalítica de cisteíno proteases possui uma histidina semelhante à tríade catalítica de serino proteases. Como o substrato L-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 tal como é o caso de caliceínas. Dessa forma, sua hidrólise pode ser impedida não somente por inibidores de cisteíno proteases mas também por inibidores de serino protease escolhido, o qual é susceptível a resíduos de histidina (BARICOS *et al.* 1988; BARRETT & KIRSCHKE, 1981; EVANS & ETHERINGTON, 1978; ARANISHI, *et al.* 1997).



**Figura 29:** Efeito de TLCK sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

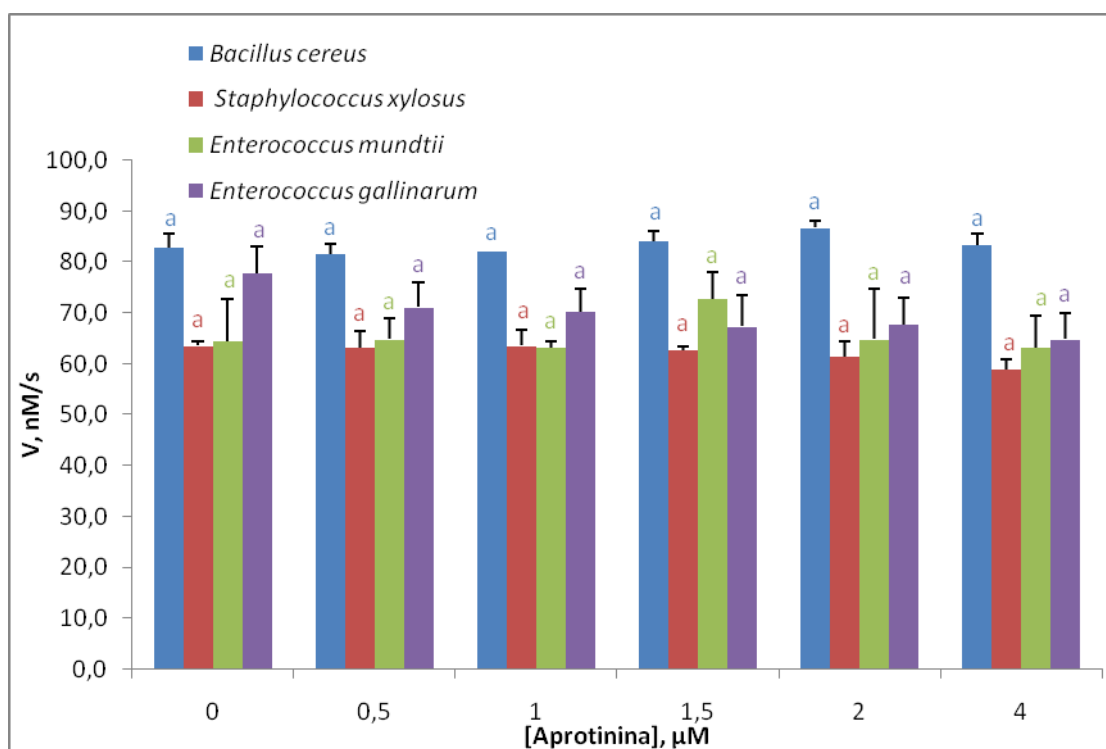
Os dados obtidos são semelhantes aos de MENDONÇA (2008), em estudos do efeito de TLCK sobre as cisteíno proteases do extrato solúvel e insolúvel do intestino médio de *A. gemmatlis*, verificaram uma diminuição crescente nos valores de atividade sobre L-BApNA com o aumento da concentração de TLCK. MATSUIISHI *et al.*, (2003) pesquisando propriedades de Catepsina H de músculo esquelético de coelho sobre os substratos BANA e LeuNA obtiveram respectivamente 13,1% e 46,6% de inibição em presença de 0,1 mM de TLCK.

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

#### 5.4.4.4. Efeito de Aprotinina

Analizamos o efeito de aprotinina, inibidor protéico competitivo de serino proteases, sobre sobre as cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-BApNA, mostram que os valores das atividades amidásicas diferem ( $p < 0,05$ ) em função do aumento da concentração de aprotinina para todas as bactérias (Figura 30).

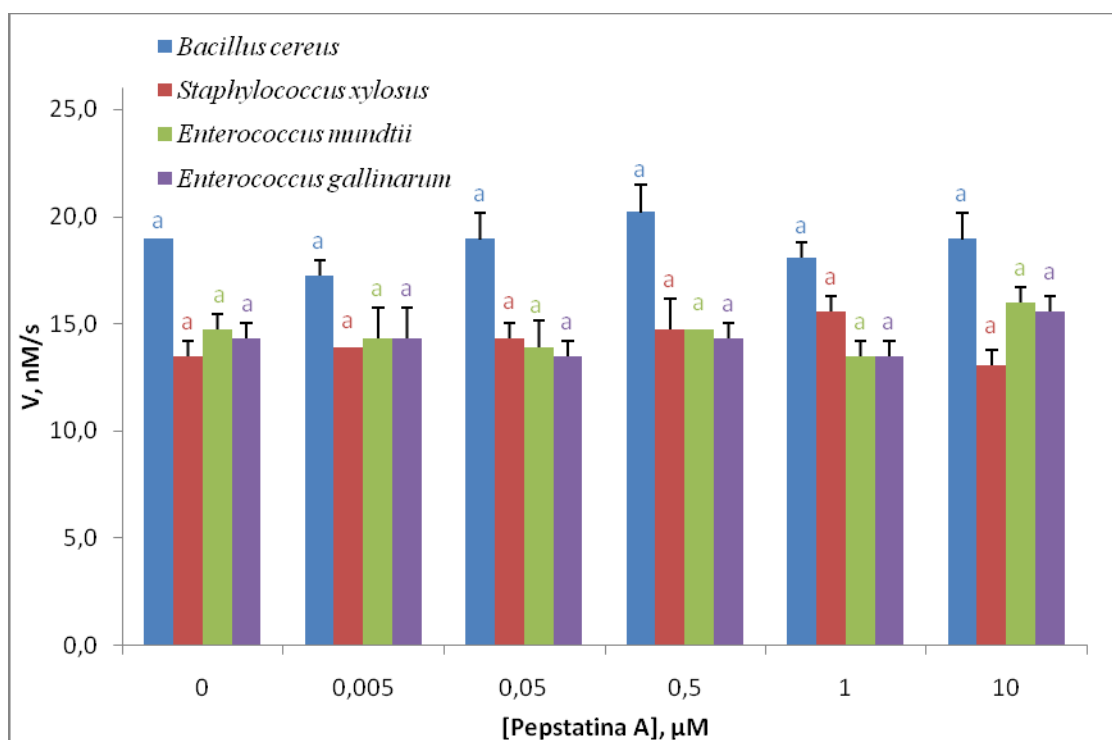
Dessa mesma forma, D'AVILA-LEVY *et al.* (2003), mostraram que as cisteíno proteases do tripanossomo *Crithidia deanei* cálcio dependente, não foram afetadas pelo inibidor de serino proteases aprotinina.



**Figura 30:** Efeito de Aprotinina sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.4.4.5. Efeito de Pepstatina A

Quando analisamos o efeito de Pepstatina A, inibidor de aspartil protease, sobre a atividade de cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o L-BApNA verificamos (Figura 31) que não houve efeito significativo ( $p>0,05$ ) em todas as concentrações analisadas nas atividades dos extratos enzimáticos de todas as bactérias. O mesmo foi observado por MENDONÇA (2008), onde estudando o efeito de Pepstatina A sobre as cisteíno proteases do extrato solúvel e insolúvel do intestino médio de *A. gemmatlis*, verificaram que não houve efeito na atividade das proteases de ambos os extratos frente ao inibidor Pepstatina A. PARISI *et al.* (2008), em estudos sobre as cisteíno proteases de alho *Allium sativum* também verificaram que não houve inibição frente ao inibidor Pepstatina A. Portanto novamente nossos resultados não demonstram presença de aspartil proteases nos extratos enzimáticos da microbiota de *A. gemmatlis*

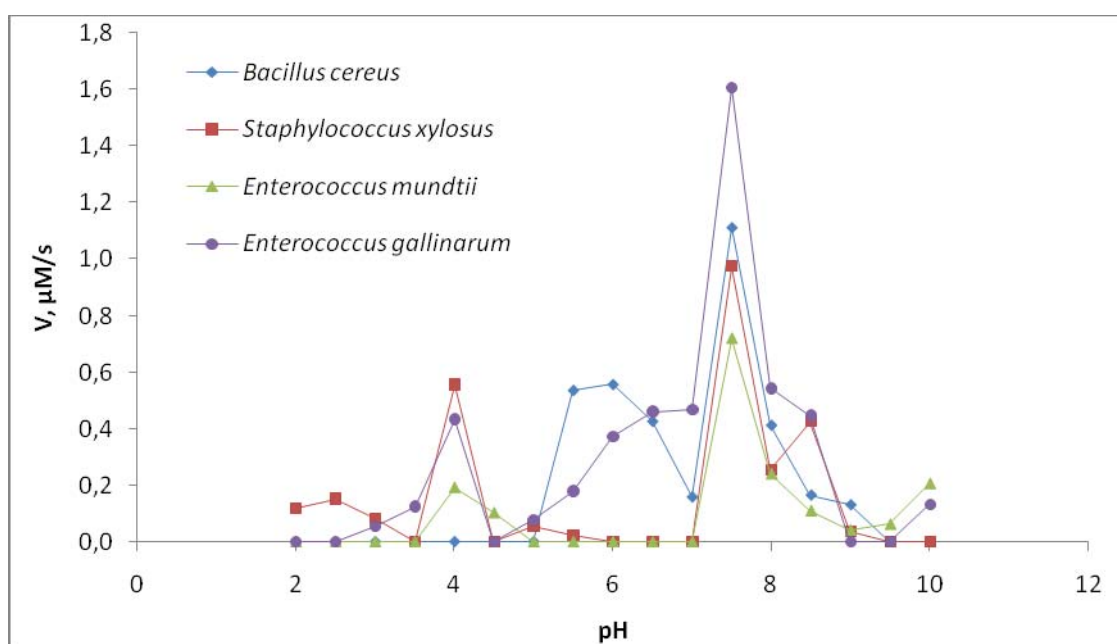


**Figura 31:** Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra e cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 5.6. Caracterização das cisteíno proteases bacterianas utilizando o substrato L-TAME

### 5.6.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade esterásica

As atividades das cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*, mostram que todos os extratos apresentam dois picos mais pronunciados de atividade em diferentes valores de pH sobre L-TAME (Figura 32). Estes resultados sugerem novamente diferentes formas de enzimas presentes nos extratos enzimáticos. Entretanto, observa-se pelos perfis da figura 32 que os maiores valores de atividade obtido nas cisteíno proteases bacterianas, foi pH 7,5 para todas as bactérias. Estes dados são análogos com os dados anteriormente encontrados quando utilizamos o substrato L-BApNA (Figura 23).



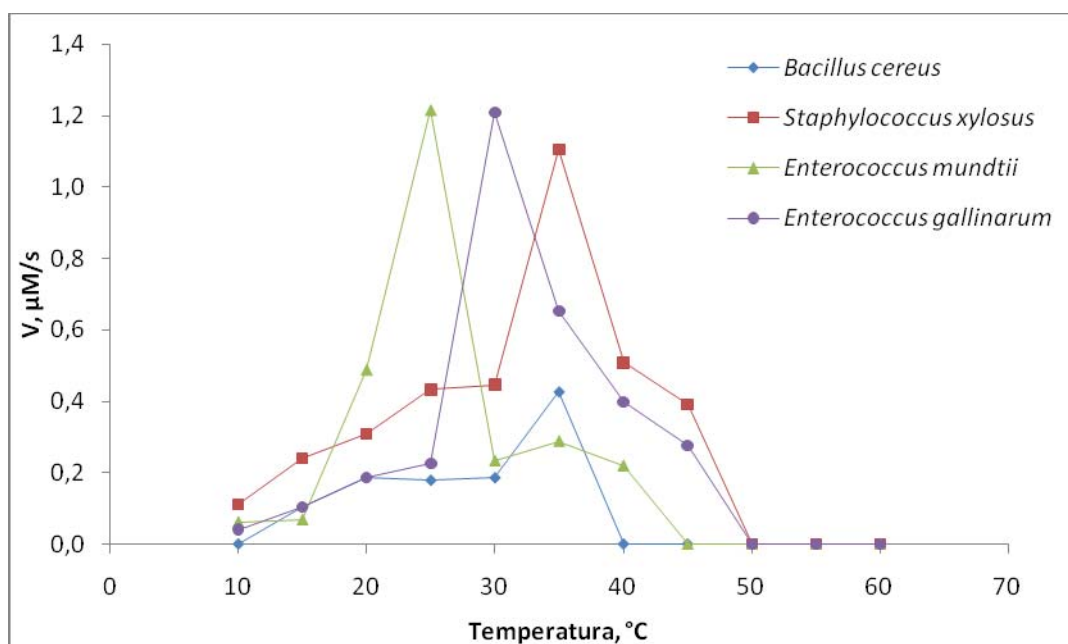
**Figura 32:** Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME

Dessa mesma forma D'AVILA-LEVY *et al.* (2003), analisando cisteíno proteases do tripanossomo *Crithidia deanei*, verificaram atividade maximizada em pH 7,0 de acordo com esses autores a atividade enzimática diminuiu acentuadamente em valores inferiores a 6,0 e superiores a pH 9,0. MATSUIISHI *et al.*, (2003) pesquisando propriedades de Catepsina H de músculo esquelético de coelho obtiveram pH ótimo para o substrato BANA em torno de pH 6,6 e para o substrato LeuNA pH 7,0.

Nossos resultados de cisteíno protease de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* estão semelhantes a outros estudos para cisteíno proteases.

A figura 33 apresenta os perfis de atividade esterásica em função da temperatura para as cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* sobre o substrato L-TAME a frente o substrato L-TAME, verificando que a temperatura de maior atividade para as proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* foram 25°C, 30°C, 30°C e 35°C, respectivamente. Estes dados são semelhantes com os dados anteriormente encontrados quando utilizamos o substrato L-BApNA (Figura 24).

MATSUISHI *et al.* (2003), pesquisando propriedades de Catepsina H de músculo esquelético de coelho verificaram que essas proteases foram estáveis numa faixa de temperatura variando de 0°C a 50°C. D'AVILA-LEVY *et al.* (2003) estudando cisteíno proteases do tripanossomo *Crithidia deanei*, encontraram uma temperatura ótima 28°C. Desse modo nossos valores de temperatura de maior atividade esterásica para as cisteíno proteases bacterianas estão dentro da faixa de temperatura obtida em outros estudos.



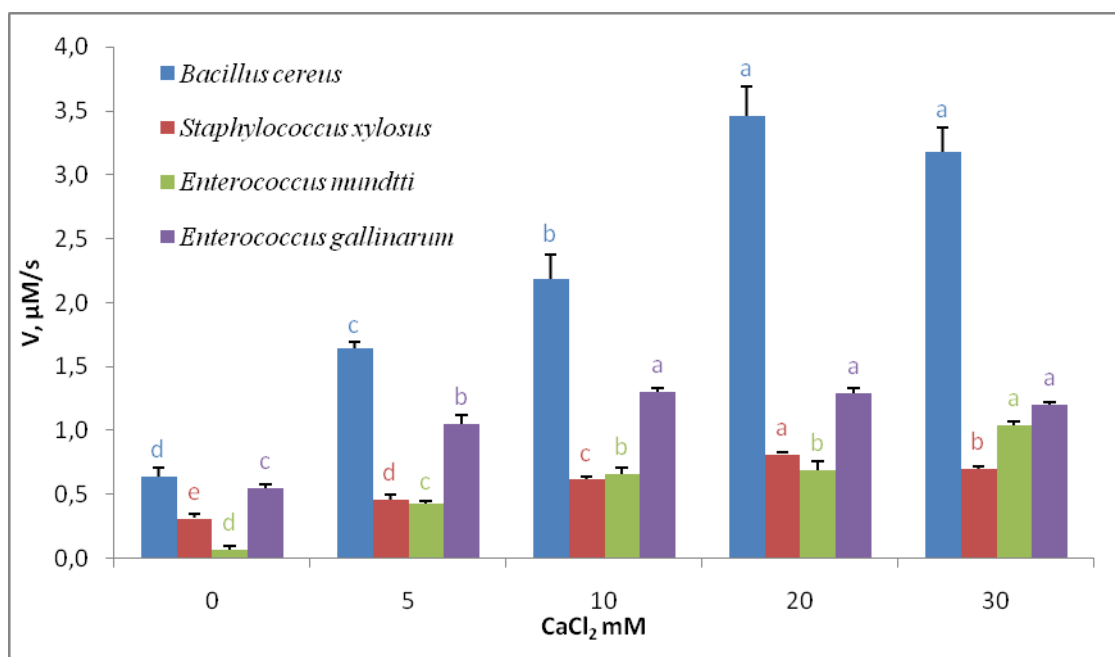
**Figura 33:** Efeito de temperatura sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME

### 5.6.2. Efeito da concentração de íons cálcio na atividade de cisteíno proteases

Podemos verificar pela figura 34 que as atividades esterásica das cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-TAME aumentaram com o aumento da concentração de íons cálcio. Pode-se verificar ainda que as cisteíno proteases de

*B. cereus* apresentaram um maior aumento na atividade esterásica do que as proteases das outras bactérias, como observado anteriormente para a atividade amidásica (figura 25). O que novamente nos permite inferir que o cálcio está atuando como um estabilizador maior das cisteíno proteases de *B. cereus*, comparativamente às proteases dos outros microrganismos.

Nossos resultados são semelhantes aos de D'AVILA-LEVY *et al.* (2003), que purificaram uma cisteíno protease cálcio-dependente do tripanosoma *Crithidia deanei*. De acordo com esses autores o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de reação aumentou a atividade da enzima, chegando a uma atividade máxima em 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Quando na ausência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a enzima não apresentou atividade. RAPHAEL *et al.* (2000), em estudos com cisteíno proteases de *Plasmodium falciparum* observaram um efeito ativador da atividade dessas proteases em presença de  $\text{CaCl}_2$ .



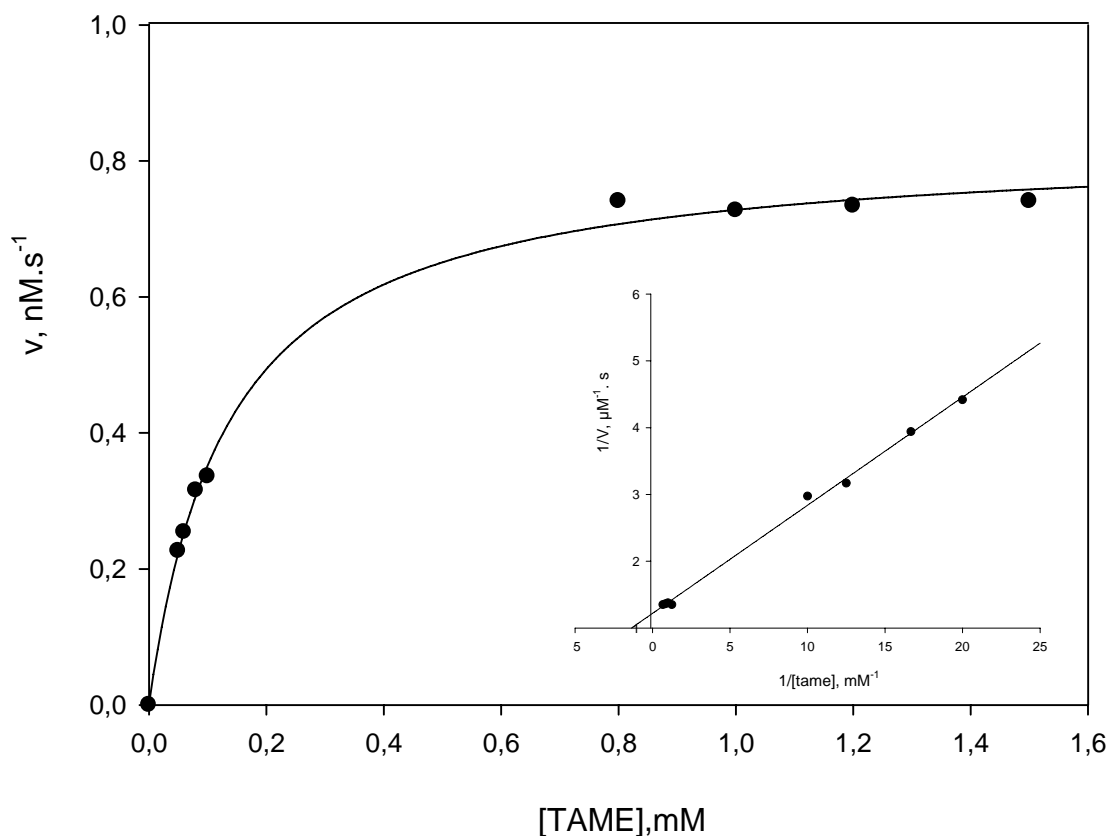
**Figura 34:** Efeito de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como o substrato L-BApNA possui um resíduo de Arg se ligando ao sítio S1 de serino proteases e de cisteíno proteases, o mesmo deve ocorrer com L-TAME, pois este também possui um resíduo Arg. Logo a estrutura do centro ativo de cisteíno deve ser semelhante ao de serino protease e conter sítios de ligação de cálcio. De acordo com OLIVEIRA *et al.* (1993) enzimas serino proteases como tripsina possuem sítios de ligação para cálcio, aumentando a atividade enzimática como também ajudando a proteger a molécula de autólise. Assim, nossos

resultados sugerem novamente que as cisteíno proteases bacterianas estejam sendo estabilizados pelos íons cálcio os quais podem ter função de proteger contra autólise e melhorar a conformação do centro ativo aumentando a atividade em presença deste íon.

### 5.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de cisteíno proteases

O gráfico de Michaelis-Menten para as cisteíno proteases *B. cereus* sobre o substrato L-TAME encontra-se representado na figura 35. Nesta figura encontra-se ainda inserido o gráfico de Lineweaver-Burk.



**Figura 35:** Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de cisteíno-protease, de *Bacillus cereus*, isolado do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade do extrato enzimático sobre L-TAME. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de  $K_M$  app e  $V_{\max}$  app.

As cisteíno proteases dos extratos enzimáticos das bactérias apresentam gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que essas enzimas seguem a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração do substrato L-TAME analisada. Os gráficos

com as demais cisteíno proteases de *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentam perfis semelhantes (dados não mostrados).

Na tabela 9 estão apresentados, os parâmetros cinéticos  $K_{M\ app}$  e  $V_{m\áx\ app}$  de cisteíno proteases determinadas utilizando as concentrações de substrato L-TAME de 0,05 a 1,5 mM em pHs e temperaturas de acordo com a tabela 3, para os extratos enzimáticos bacterianos. Os extratos de *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* apresentaram, respectivamente  $K_{M\ app}$  com valores de 0,11 mM, 0,13 mM, 0,12 mM e 0,16 mM. Esses valores de  $K_{M\ app}$  foram semelhantes, na mesma ordem de grandeza, mostrando afinidade semelhante de L-TAME pelo centro ativo de cisteíno proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatilis*

Quando comparamos os valores de  $K_{M\ app}$  obtidos utilizando o substrato amidásico, L-BApNA (Tabela 8), com aqueles obtidos para o substrato esterásico, L-TAME (Tabela 9), observa-se que as cisteíno proteases bacterianas possuem maior afinidade pelo substrato L-TAME do que pelo L-BApNA, uma vez que os  $K_{M\ app}$  para L-BApNA foram maiores.

Logo, para as cisteíno proteases a maior eficiência do “binding” enzima-substrato éster (L-TAME), pode estar relacionada ao mecanismo da reação catalisada pela cisteíno protease. O mecanismo de ação das cisteíno proteases é muito semelhante ao das serino proteases. A presença de um resíduo de asparagina conservado (Asn175), na proximidade com a histidina catalítica (His159) cria a tríade cisteíno protease Cys-His-Asn que é considerada análoga a tríade Ser-His-Asp, arranjo encontrado em serino proteases (RAO *et al.*, 1998). Como nas serino proteases, durante a atividade amidásica a etapa de acilação, com formação de acil-enzima é lenta e a etapa de deacilação, com formação de produto é rápida. Por outro lado, durante a atividade esterásica, a etapa de acilação é rápida e a deacilação é lenta. Portanto, a etapa determinante da velocidade da reação de hidrólise de substratos amidas por enzimas tripsina-*like* é a etapa de acilação com formação de acil-enzima, enquanto que a etapa determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a deacilação, com conseqüente formação de produto (INAGAMI, 1971; FASTREZ & FERSHT, 1973). Nesse sentido, para as cisteíno proteases deve estar ocorrendo o mesmo, de modo que a etapa determinante da velocidade da reação de hidrólise de substratos amidas por enzimas papainas-*like* é a etapa de acilação com formação de acil-enzima, enquanto que a etapa determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a deacilação, com conseqüente formação de produto.

**Tabela 9:** Parâmetros cinéticos de cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* sobre o substrato L-TAME

Bactérias produtoras de proteases	Substrato	$K_M$ app	$V_{max}$ app
<i>Bacillus cereus</i>	L-TAME	0,11 mM	0,82 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
<i>Staphylococcus xylosus</i>	L-TAME	0,13 mM	1,08 $\mu\text{M s}^{-1}$
<i>Enterococcus mundtii</i>	L-TAME	0,12 mM	0,79 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
<i>Enterococcus gallinarum</i>	L-TAME	0,16mM	2,41 $\mu\text{M s}^{-1}$

Assim a tabela 10 mostra valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos para as cisteíno proteases dos extratos de enzimas do intestino médio de *A. gemmatalis* utilizando o substrato L-BApNA e das cisteíno proteases das bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* utilizando como substrato L-BApNA e L-TAME. Verificamos então que os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* são semelhantes aos das enzimas presentes no extrato insolúvel do intestino deste inseto quando utilizando o substrato L-BApNA.

Verificando a tabela 7 e a tabela 10, observa-se que os valores de  $K_M$  de cisteíno proteases são bem maiores do que o de serino proteases, tanto para as proteases presentes no intestino de *A. gemmatalis* como para as proteases excretadas pelas bactérias isoladas do seu intestino. Portanto, sugere-se que as principais proteases presentes no trato intestinal de *A. gemmatalis* e expressas por microrganismos associados são as serino proteases seguidas pelas cisteíno-proteases. Porém, dessa mesma forma, as serino proteases são também o alvo primário de inibidores de proteases produzidos pela planta em resposta ao ataque do inseto, sendo posteriormente bloqueadas as cisteíno proteases.

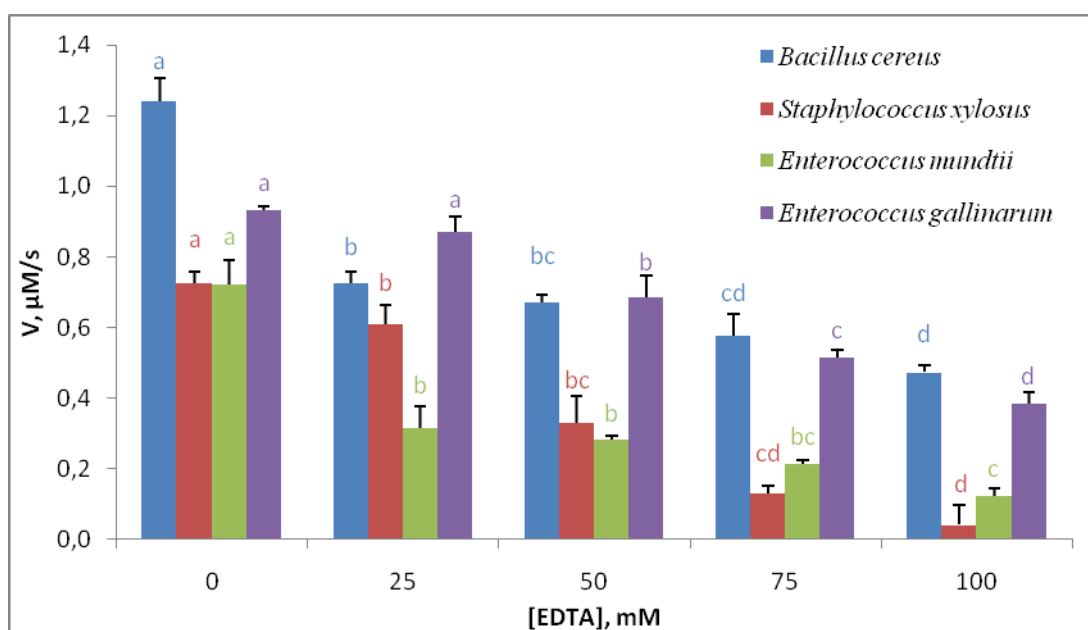
**Tabela 10:** Propriedades das atividades enzimáticas de proteases presentes extratos do intestino médio de *A. gemmatalis* (produzidas pelos insetos) e proteases presentes em extratos de bactérias isoladas do seu trato intestinal

<b>Espécie</b>	<b>Classe protease</b>	<b>Substrato</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>K<sub>M app</sub></b>	<b>V<sub>max app</sub></b>	<b>Referências</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Cisteíno-protease	L-BApNA	7,5	0,67 mM	75,57 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Stapylococcus xylosus</i>	Cisteíno-protease	L-BApNA	7,5	0,63 mM	27,83 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus mundtii</i>	Cisteíno-protease	L-BApNA	7,5	0,67 mM	47,30 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Cisteíno-protease	L-BApNA	7,5	0,70 mM	30,75 nM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato solúvel)	Cisteíno-protease	L-BApNA	8,0	2,28 mM	297.68 nM.min <sup>-1</sup>	MENDONÇA,2008
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Extrato insolúvel)	Cisteíno-protease	L-BAPNA	8,0	0,44 mM	122.95 nM.min <sup>-1</sup>	MENDONÇA,2008
<i>Bacillus cereus</i>	Cisteíno-protease	L-TAME	7,5	0,11 mM	0,82 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Stapylococcus xylosus</i>	Cisteíno-protease	L-TAME	7,5	0,13 mM	1,08 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus mundtii</i>	Cisteíno-protease	L-TAME	7,5	0,12 mM	0,79 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Cisteíno-protease	L-TAME	7,5	0,16mM	2,41 μM.s <sup>-1</sup>	Presente trabalho

## 5.6.4. Efeito de modificadores químicos na atividade de cisteíno proteases

### 5.6.4.1. Efeito de EDTA

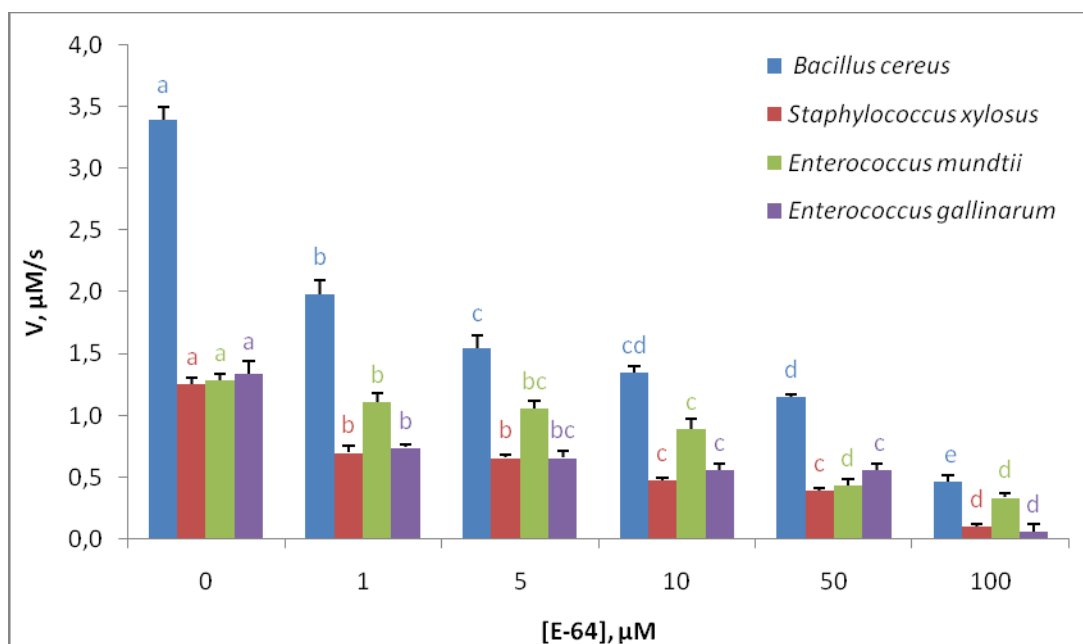
A Figura 36 apresenta o efeito da concentração de EDTA sobre as cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao substrato L-TAME. Verificou-se que ocorreu um decréscimo nos valores das atividades esterásicas com o aumento da concentração de EDTA para as cisteíno proteases de todas as bactérias como anteriormente observado para a atividade amidásica (Figura 27). As atividades foram determinadas na presença 20 mM de íons cálcio na mistura de reação, e possivelmente o EDTA, agiu sequestrando estes íons, levando a diminuição da atividade esterásica. Observamos também que proteases de *B. cereus* tiveram uma maior diminuição na atividade esterásica do que as proteases das outras bactérias, demonstrando assim que o cálcio tem um papel importante na estabilização das cisteíno proteases bacterianas apresentando maior eficiência de hidrólise em presença desses íons, sendo as cisteíno proteases de *B. cereus* as mais sensíveis aos íons cálcio.



**Figura 36:** Efeito de EDTA sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.6.4.2. Efeito de E-64

O aumento da concentração de E-64 causou uma redução significativa da atividade das cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME(Figura 37), como também foi observado quando utilizamos o substrato L-BApNA (Figura 28).



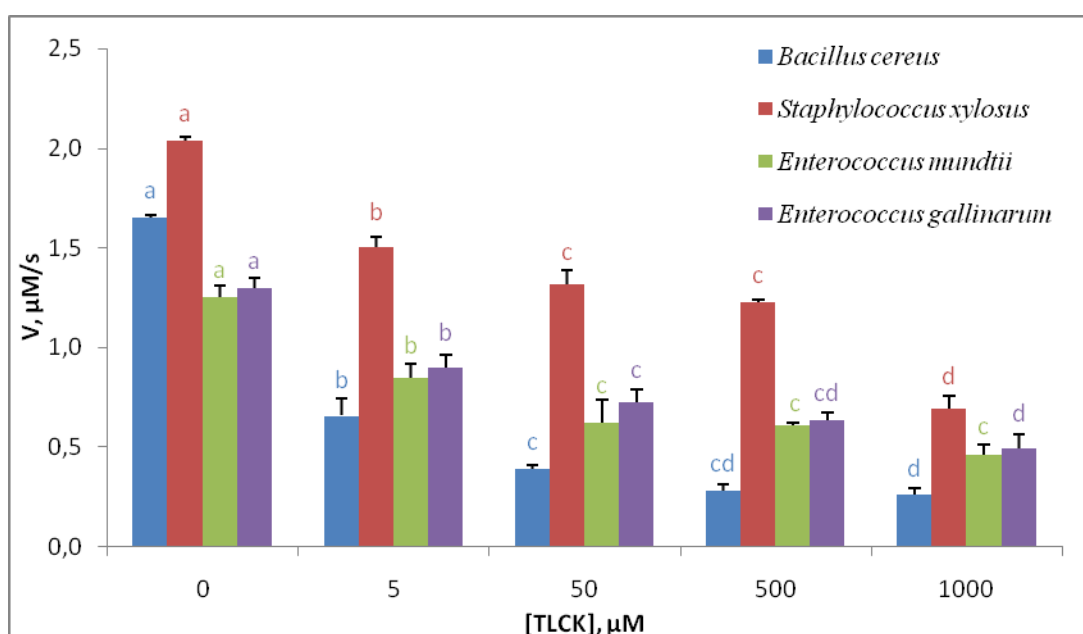
**Figura 37:** Efeito de E-64 sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Da mesma forma VALASAKI *et al.* (2008), caracterizando cisteíno proteases extracelulares de *Lactobacillus helveticus* verificaram que a adição de E-64 inibiu essas proteases. MARTONE *et al.*(1999), também observaram a perda de 95% de atividade das cisteíno proteases de parasitas *Kudoa rosenbuschi* de animais de sangue frio em presença de 0,1 mM de E-64. Outras evidências da perda de atividade de cisteíno-protease por E-64 são mostradas por RAPHAEL *et al.* (2000), em estudos com cisteíno proteases de *Plasmodium falciparum* e MAGBOU *et al.* (2001), pesquisando cisteíno proteases de leite bovino verificaram inibição de 93% por E-64.

Assim como foi observada para a atividades amidásica (figura 28) e esterásica (figura 37), pequenas concentrações de E-64 são suficientes para inibir a atividade das cisteíno proteases presente de bactérias isoladas do intestino de *A. gemmatalis*, mostrando novamente a presença de cisteíno proteases papaína-like.

### 5.5.4.3. Efeito de TLCK

O aumento da concentração de TLCK, causou uma redução significativa da atividade das cisteíno proteases dos extratos enzimáticos de *B. cereus*, *S. xyloso*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME (Figura38). Esses resultados são semelhantes com os de ARANISHI, *et al.* (1997), que trabalhando com Catepsina purificada de carpas, demonstraram que essa cisteíno protease sofreram interferência negativa quando na presença de TLCK. O mesmo foi observado por NELSON *et al.* (1999), que caracterizaram cisteíno proteases da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, e verificaram uma inibição de 91% na atividade frente ao inibidor TLCK



**Figura 38:** Efeito de TLCK sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com os resultados obtidos, as atividades esterásica (Figura 38) e amidásica (figura 29) foram inibidas por TLCK. Como descrito anteriormente, TLCK é geralmente classificado como inibidor de serino protease porque tem uma afinidade com resíduos de histidina em proteínas. Porém, a tríade catalítica de cisteíno proteases possui uma histidina semelhante à tríade catalítica de serino proteases.

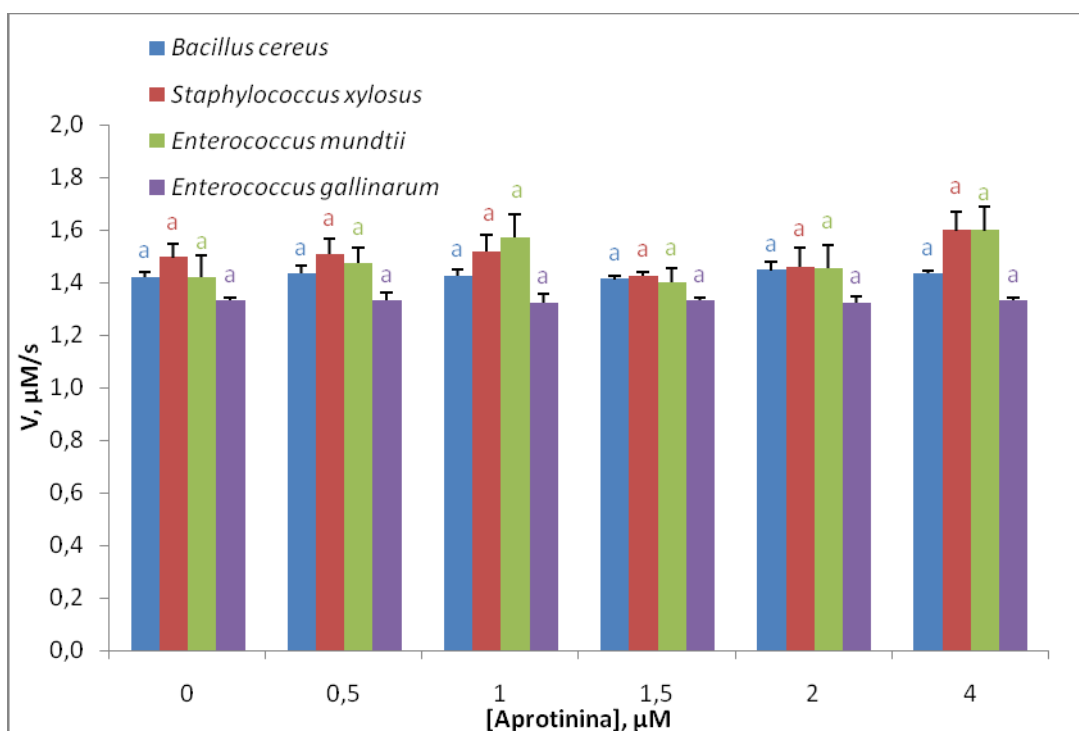
Assim, esses resultados sugerem que cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* estão possivelmente sofrendo alquilação de resíduos de histidina

da tríade catalítica de seus centros ativos, causando conseqüente diminuição da atividade esterásica sobre o L-TAME (Figura 38) tal como a atividade amidásica sobre o L-BApNA (figura 29).

#### 5.5.4.4. Efeito de Aprotinina

Analisamos o efeito de aprotinina, inibidor protéico competitivo de serino proteases, sobre as cisteíno proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente ao L-TAME, mostram que os valores das atividades esterásicas diferem ( $p < 0,05$ ) em função do aumento da concentração de aprotinina para todas as bactérias (Figura 39).

Nossos resultados estão semelhantes aos encontrados por MAGBOU *et al.* (2001), que estudando cisteíno proteases de leite bovino não verificaram inibição por aprotinina constatando uma atividade residual de 107,4%.

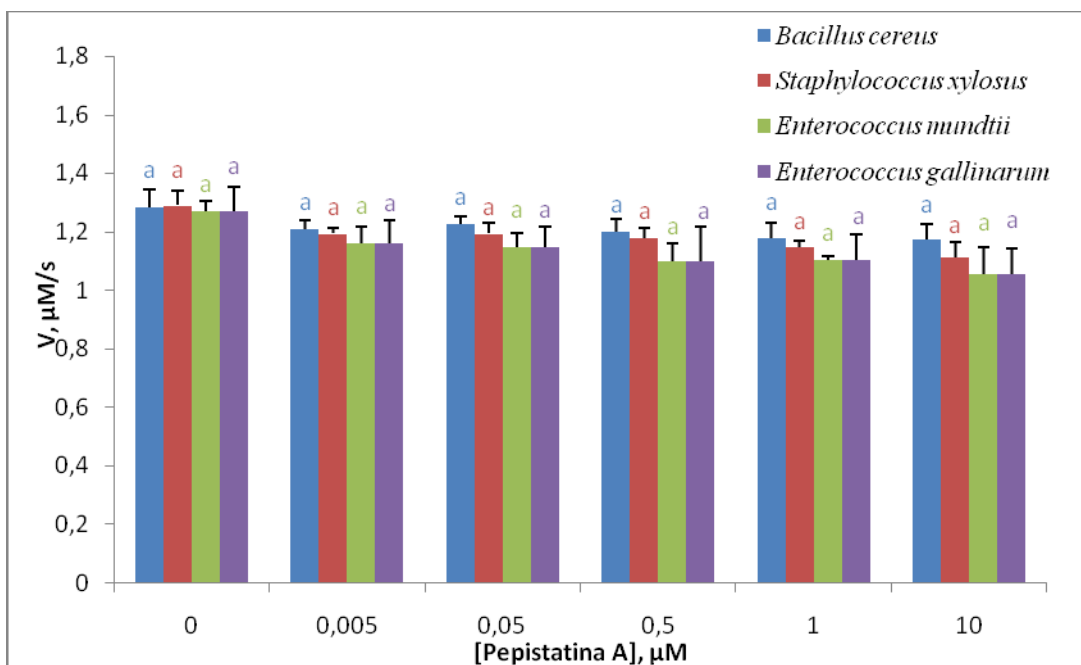


**Figura 39:** Efeito de Aprotinina sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 5.4.4.6. Efeito de Pepstatina A

O efeito de Pepstatina A, um inibidor de aspartil protease, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-TAME não diferiu ( $p>0,05$ ) nas concentrações analisadas sobre as atividades esterásica(Figura 40).

Da mesma forma D'AVILA-LEVY *et al.* (2003), purificaram uma cisteíno-protease cálcio-dependente do tripanosoma *Crithidia deaneie* e verificaram que o inibidor Pepstatina A não influenciou a atividade dessas proteases. LIU *et al.* (2008), também não verificaram influência do inibidor Pepstatina A em cisteíno proteases de Catepsina B isolada de músculos de carpa *Hypophthalmichthys molitrix*.



**Figura 40:** Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de cisteíno proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-TAME. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os inibidores de proteases têm função de proteger plantas contra danos causados por vários tipos de estresses bióticos e abióticos por inibir as atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos de forma significativa. A ingestão desses inibidores de faz com que os insetos, utilizem as suas reservas de aminoácidos para a síntese de maior quantidade de proteases para compensar as formas destas enzimas indisponíveis à catalise justamente por estar na forma do complexo EI (Enzima-Inibidor. Consequentemente, os aminoácidos biodisponíveis para a síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução estará sendo utilizado para a biossíntese de novas proteases, para realizar a hidrólise de sua dieta. Este mecanismo de defesa pode comprometer a fisiologia do inseto e causar a morte dos mesmos. Assim, considerando o efeito antinutricional dos inibidores de proteases, a avaliação da eficiência destes para a produção de plantas resistentes a pragas tem despertado grande interesse.

Já foi mostrada 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 de enzima é importante no processo de interação planta-inseto. Durante o ataque de plantas de soja pôr insetos ocorre a resposta da planta às injúrias, como o de aumento de inibidores de tripsina-like (FORTUNATO *et al.* 2007, FORTUNATO *et al.* 2004, SILVA *et al.* 2002, SILVA *et al.* 2004). Estudos recentes também mostram que a presença de papaína-like no intestino de *A. gemmatalis* são importantes na digestão de *A. gemmatalis* (MENDONÇA, 2008).

No presente trabalho, foram realizados estudos de caracterização bioquímica e cinética de serino e cisteíno proteases produzidas por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. As enzimas presentes em todos os sobrenadantes das culturas desses microorganismos apresentaram atividade proteásica sobre caseína, substrato protéico, atividade amidásica sobre o L-BApNA, substrato amida e atividade esterásica sobre o L-TAME, substrato éster tanto para as serino quanto para as cisteíno proteases. O efeito de inibidores clássicos de serino e cisteíno proteases sobre a atividade enzimática demonstrou a ocorrência de queda na hidrólise dos mesmos substratos. Nesse sentido, o conjunto dos resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de serino e cisteíno proteases sobre as atividades das enzimas bacterianas mostraram que, as bactérias isolados de *A. gemmatalis* sintetizam enzimas da família de serino e cisteíno proteases e provavelmente

essas sejam enzimas tripsina-*like* e papaína-*like*. As características bioquímicas e cinético enzimáticas das proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* se assemelham com as serino e cisteíno proteases presentes na fração solúvel (produzida pelo próprio inseto) e na fração insolúvel (proteases ligadas à membrana) extraídas do intestino *A. gemmatalis* (OLIVEIRA *et al.* 2005, XAVIER *et al.* 2005, MENDONÇA, 2008).

Essas enzimas se produzidas por essas bactérias no intestino do inseto, provavelmente contribuem com a digestibilidade protéica de *A. gemmatalis*, desempenhando um papel importante no processo de interação planta-inseto. Possivelmente, após bloqueio das proteases produzidas pelo inseto causado por ingestão contínua de inibidores de proteases no processo de defesa de plantas, essas bactérias passem a produzir essas proteases, como um mecanismo alternativo de defesa do inseto

O mapeamento dos centros ativos destas proteases deverá possibilitar a realização de estudos sobre a seqüência de aminoácidos no centro ativo que seriam possíveis alvos em trabalhos sobre a inibição da atividade biológica, capazes de comprometer o sistema digestivo do inseto e leva-lo à morte. Esta seqüência, uma vez conhecida, poderá então ser utilizada para a produção de potentes inibidores orgânicos, peptídeos ou peptídeos miméticos para serem utilizados na defesa da planta, como controle contra pragas agrícolas, ou então para a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos praga.

Este caminho é considerado como promissor na busca novos métodos de controle biológicos que, por não envolverem uso de agroquímicos não representam sérios riscos de danos ao homem e ao meio ambiente. Neste contexto, a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas ou a produção de potentes peptídeos inibidores de proteases aparecem também como uma estratégia promissora para o controle de insetos-praga.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizamos caracterização bioquímica e cinética de serino e cisteíno proteases produzidas por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatilis*. Observamos que as serino e cisteíno proteases induzidas no meio de cultura infusão cérebro coração (BHI) acrescido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA), apresentaram atividade específica mais elevada para todas as serino e cisteíno. Verificou-se também que essas proteases apresentaram atividade proteásica sobre caseína

Os pHs nos quais foi possível detectar as maiores atividades das serino proteases bacterianas, utilizando os substratos L-BApNA e L-TAME, foram pH 8,5 para *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. gallinarum*, e pH 7,5 para *E. mundtii*. O efeito da temperatura foi testado com os mesmos substratos sendo que *B. cereus* mostrou uma maior atividade a 25<sup>0</sup>C, *S. xylosus* e *E. mundtii* a 30<sup>0</sup>C e *E. gallinarum* a 35<sup>0</sup>C. Para as cisteíno proteases verificou-se maior atividade sobre o L-BApNA e L-TAME em pH 7,5 para todas as proteases bacterianas. O efeito da temperatura para as cisteíno proteases bacterianas sobre esses substratos mostraram maior atividade a 35<sup>0</sup>C para *B. cereus* e *S. xylosus*, 25<sup>0</sup>C para *E. mundtii* e 30<sup>0</sup>C para *E. gallinarum*.

Os valores de  $K_{Mapp}$  obtidos para as serino proteases utilizando L-BApNA foram de 0,15 mM, 0,12 mM, 0,14 mM, e 0,26 mM, respectivamente para *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* e utilizando o substrato L-TAME foram de 12,40  $\mu$ M, 48,40  $\mu$ M, 18,20  $\mu$ M e 45,20  $\mu$ M, respectivamente para *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*. Para cisteíno proteases utilizando L-BApNA os valores de  $K_{Mapp}$  obtidos foram de 0,67 mM, 0,63 mM, 0,67 mM, e 0,270 mM, respectivamente para *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* e com substrato L-TAME foram de 0,11 mM, 0,13 mM, 0,12 mM e 0,16 mM, respectivamente para *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*.

Na análise do efeito de íons cálcio na atividade proteolítica sobre os L-BApNA e L-TAME, observou-se que as atividades das serino e cisteíno proteases bacterianas aumentaram em presença de CaCl<sub>2</sub>. Com relação ao efeito da concentração de EDTA, verificou-se uma diminuição na atividade com o aumento da concentração de EDTA na mistura de reação para todas as serino e cisteíno proteases bacterianas.

Quando determinamos o efeito de inibidores clássicos de serino proteases, TLCK, e Aprotinina, na atividade de serino proteases bacterianas, verificou-se queda na hidrólise do L-

BApNA e L-TAME, substratos específico de tripsina. O inibidor de aspartil proteases Pepstatina A e E-64, inibidor de cisteíno proteases, não influenciaram as atividades de serino proteases bacterianas. Para as cisteíno proteases bacterianas, verificamos uma diminuição das atividades esterásica e amidásica frente o inibidor E-64. O efeito de TLCK na atividade das cisteíno proteases ajuda a identificar o mecanismo catalítico utilizado na hidrólise dos substratos. Apesar de ser um inibidor clássico de serino proteases, TLCK bloqueia histidina na tríade catalítica, provando ser esse aminoácido parte integrante dessa catálise, uma vez que a atividade das cisteíno proteases foi diminuída por esse inibidor. Os inibidores Aprotinina, e Pepstatina A não afetaram as atividades de cisteíno proteases bacterianas.

Assim, os resultados de caracterização cinética e de efeito de inibidores de proteases sobre a atividade das proteases produzidas por *B. cereus*, *S. xylosum*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* concluem que essas bactérias sintetizam e excretam no lúmen intestinal de *A. gemmatilis*, enzimas da família das serino e cisteíno proteases.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. & DOUGLAS, A.E. How symbiotic bacteria influence plant utilisation by the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Oecologia*, 110: 528-532, 1997.
- 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.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W. & TAKABYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature.*, 406: 512-515, 2000.
- 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., RAWLINGS, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Journal of Biological Chemistry* 382, 727–733. 2001.

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

BARRETT, A.J., KEMBHAVI, A.A., BROWN, M. A., KIRSCHKE H., KNIGHT, C. G., TAMAI M. AND HANADA K. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido( 4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201: 189-198, 1982.

BARRETT AJ, KIRSCHKE H. CATHEPSIN B, CATHEPSIN H, AND CATHEPSIN L. *Methods Enzymol.* 100:535–561, 1981.

BEACH, R. M.; TODD, J. W. Foliage consumption and developmental parameters of the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) reared on susceptible and resistant soybean genotypes. *J. Econ. Entomol.* v. 81, p. 310-316, 1988.

BEG Q. K.; GUPTA R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enz. and Microb. Tech.* v. 32, p. 294 – 304, 2003.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiology*, 4: 430-435, 1996.

BEYNON, R.J. e SALVESEN, G. commercially available protease inhibitors. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Edited by Beynon R. and Bond J.S.), pp. 241-249, 1989.

BHAT, T.K.; SINGH, B. & SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins – a current perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357, 1998.

BIRO, A. HE'RINCS, Z., FELLINGER, E., SZILA'GYI, L., BARAD, Z., GERGELY, J., GRA'F, L., SA'RMAY, G. Characterization of a trypsin-like serine protease of activated B

cells mediating the cleavage of surface proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1624: 60–69, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* v. 72, p. 248, 1976.

BRAUMAN, A.; DORÉ, J.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D.; BREZNAK, J.A. & KANE, M.D. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 27-36, 2001.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; HEALEY, S.; HERNÁNDEZ, M.; KELLER, M.; LI, K.; PALACKAL, N.; SITTENFELD, A.; TAMAYO, G.; WELLS, S.; HAZLEWOOD, G. P.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; ROBERTSON, D. E.; STEER, B. A. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. And Environmen. Microbiol.* v. 70(6), p. 3609-3617, 2004.

BREZNAK, J. A. & BRUNE, A. Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, 39: 453-487, 1994.

BREZNAK, J. A. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology*, 42 (3): 13-18, 2002.

BROWN, S.L.; The University of Georgia. Image Number: 1432034. Abril de 2002. [www.forestryimages.org](http://www.forestryimages.org). Acesso em Março de 2008.

BRUNE, A. & FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut : struture and function on a microscale. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 263-269, 2000.

BRUNE, A.; MIAMBI, E. & BRESNAK, J. A. Roles of oxygen and the intestinal microflora in the metabolism of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds by termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2688-2695, 1995.

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.

CALDAS, C., CHERQUI, A., PEREIRA, A., SIMÕES, N. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Xenorhabdus nematophila* Involved in Insect Immunosuppression. *Applied and environmental microbiology*, v 68: 1297–1304, 2002.

CAMPBELL, B. C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press, Boca Raton. v.1: 1-44, 1990.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- Conab. 4º Levantamento de grãos 2006/2007- Jan/2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4levsafra.pdf>>, acessado em 26 de janeiro 2007.

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.

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

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic plants. *Trends in Plant Science*, v.11, p.302-308, 2006.

DASCH, G. A.; WEISS, E. & CHANG, K. P. Endosymbionts of insects. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. NR Krieg, JG Holt, Baltimore Williams & Wilkins, p. 811-813, 1984.

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.

DIENES, D., BÖRJESSON, J., HAGGLUND, P., TJERNELD, F., LIDÉN, G., RĘCZEY, K., STÅLBRAND, H. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. Enzyme and Microbial Technology 40: 1087–1094, 2007.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. Annu. Rev. Entomol. v. 49, p. 71-92, 2004.

DILLON, R.J.; VENNARD, C.T.; BUCKLING, A. & CHARNLEY, A.K. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. Ecology Letters, 8: 1291-1298, 2005.

DOUGLAS, A. E. Nutricional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology, 43: 17-37, 1998.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2006. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina. 225p.

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.

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

FEDATTO, L. M.; STENICO, M. E. S. ;ETCHEGARAY, A; PACHECO, F. T. H.; RODRIGUES,J. L. M.; TSAI, S. M. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research* 161:263-272,2006.

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

FISCHER, J., BECKER, C., HILLMER, S., HORSTMANN, C., NEUBOLN, C.B., SCHLERETH, A., SENYUK, V., SHUTOV, A., MUNTZ, 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 gemmatalis* 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 gemmatalis* injury on the lipoxygenases activity from soybean leaves. *Bioscience Journal*, 20: 37-46, 2004

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

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

GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Genetic engineering of plants for insect resistance. Disponível em: < [http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcg1/Chapter/GM\\_InsectResistant\\_Plants](http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcg1/Chapter/GM_InsectResistant_Plants)>, acessado em 31 de janeiro de 2006.

GENOV, N., B. FILIPPI, P. DOLASHKA, K. S. WILSON, AND C. BETZEL.. Stability of subtilisins and related proteinases (subtilases). *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:391–400, 1995

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

GORMAM, M.J.; ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 30: 35-46, 2000a.

GORMAM, M.J.; ANDREEVA, O.V.; PASKEWITZ, S.M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene.* 251: 9-17, 2000b.

HADJ-ALI, N. E., AGREBI, R., GHORBEL-FRIKHA, B. SELLAMI-KAMOUN, A., KANOUN, S., NASRI, M., Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology* 40:515–523, 2007.

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

HASHIDA S., Towatari T., Kominami E. and Katunuma N. Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochemical(Tokyo)*. 88: 1805-1811, 1980

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

HINNEBUSCH, B. J.; ROSSO, M. L.; SCHWAN, T. G. & CARNIEL, E. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Molecular Microbiology*, 46: 349-354, 2002.

HIRAZAWA, N., UMEDA, N., HATANAKA, A., KURODA, A. Characterization of serine proteases in the monogenean *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture* 255 :188–195, 2006.

HIRASE, H., MOLIN, W. T. Characterization of Cysteine Synthase in *Echinochloa crus-galli* L. and Its Inhibition by Substrate Analogues. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 69, 189–197, 2001.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, e trombin. *Canadian J. Biochem. Physiol.* v. 37 (12), p.1393-1399, 1959.

INAGAMI, T. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K., MURACHI, T.; NARITA, K., ed. *Proteins structure and Function*. Tokio, Kodanska, p. 1-83, 1972.

Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes Universidade Federal do Rio de Janeiro. Proteases de Microrganismos. Disponível em <<http://acd.ufrj.br/proteases>>. Acessado em: 10 de Mai. 2008

JOO, H.S., KUMAR, C. G., PARK, G.C., KIM, K.T, PAIK, S.R,CHANG, C.S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry* 38 : 155- 159,2002.

JAOUADI, B., ELLOUZ-CHAABOUNI, S., RHIMI, M., BEJAR, S. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie xx* : 1-15, 2008.

KARBALAEI-HEIDARI, H. R., ZIAEE, A.,SCHALLER, J., AMOOZEGAR, M. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 *Enzyme and Microbial Technology* 2006

KAWALEC, M., POTEMPA,J. L, MOON,J.L., TRAVIS, J., MURRAY, B. E. Molecular Diversity of a Putative Virulence Factor: Purification and Characterization of Isoforms of an Extracellular Serine Glutamyl Endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with Different Enzymatic Activities. *Journal of bacteriology*, 187: 266–275, 2005

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

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

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology, Chile*, 2002, Disponível em:<<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/3/>>.Acesso em: 18 mar. 2008.

LASKOWSKI, J. M.; KATO, I. Protein inhibitor of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* v. 49, p. 593-626, 1980.

LEE, C., CHENG, M., YU, M., PAN, M. Purification and characterization of a putative virulence factor,serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology Letters* 209 : 31-37, 2002.

LIU, H., YIN, L., ZHANG, N, LI, S., MA, C. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. *Food Chemistry* 110: 310–318, 2008

MAGBOUL, A.A.A., LARSEN, L. B., MCSWEENEY, P. L. H., KELLY, A. L. Cysteine protease activity in bovine Milk. *International Dairy Journal* 11:865–872, 2001.

MARTONE, C.B., SPIVAK, E., BUSCONI, L. , FOLCO, E.J.E., SA´NCHEZ, J.J. A cysteine protease from myxosporean degrades host myofibrils in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 123:267–272, 1999.

MATOS, T.G.T.; GIUGLIANO, L.G.; RIBEIRO, B.M.; B´AO, 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.

MATSUISHI, M., SAITO, G., OKITANI, A., KATO, H. Purification and some properties of cathepsin H from rabbit skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 : 474–485, 2003.

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.

MENDOÇA, 2008. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja . UFV, 2008. 49p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, 2008.

MINKLEY, N.; FUJITA, A.; BRUNE, A. & KIRCHNER, W.H. Nest specificity of the bacterial community in termite guts (*Hodotermes mossambicus*). *Insectes Sociaux*, 53: 339-344, 2006.

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.

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.

MURDOCK, L.L., SHADE, R.E., Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22): 6605-6611,2002

NASCIMENTO, W. C. A., MARTINS, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:91-96, 2004

NELSON, D., POTEPA, J., KORDULA, T., TRAVIS, J. Purification and Characterization of a Novel Cysteine Proteinase (Periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. *The journal of biological chemistry* Vol. 274, 12245–12251, 1999

NEURATH, M. J. The diversity of proteolytic enzymes. In R. J. Beynon & J. S. Bond (Eds.), *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Oxford: IRL Press, 1989.

NIKANDROV, N. N., DESHIMARU, M., TANI, A., CHIJIWA, T., SHIBATA, H., CHANG, S., FUKUMAKI, Y., ITO, T., OHNO, M. Purification, primary structures and evolution of coagulant proteases from *Deinagkistrodon actus* venom. *Toxicon* 46:907–917,2005.

OHKUMA, M.; IIDA, T. & KUDO, T. Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. *FEMS Microbiology Letters*, 181: 123-129, 1999.

OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. & SOARES, M. J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus*. *Bulletin of Entomological Research*, 96 : 1-8, 2006.

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 gemmatilis*. *Comparative Biochem. and Physiol.* v. 140(B), p. 369-380, 2005.

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.

PARISI, M., MORENO, S., FERNANDEZ, G. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. *Plant Physiology and Biochemistry* 46 : 403-413, 2008

PARKES C., KEMBHAVI A. A. AND BARRETT A.J. Calpain inhibition by peptide epoxides. *Biochem. J.* 230: 509-516, 1985.

PELOQUIN, J. J.; LAUZON, C. R.; POTTER, S. & MILLER, T. A. Transformed bacterial symbionts re-introduced to and detected in host gut. *Current Microbiology*, 45: 41-45, 2002.

PERONA, J.J. & CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*. 4: 337-360, 1995.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. & GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 23-29, 2006.

PÓLGAR, L. & HALÁSZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteases. *Biochemical Journal*. 207: 1-10, 1982.

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.

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

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 27, 325–331. 1999.

RAWLING, N.D. & BARRET, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 290(1): 205-218, 1993.

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.

RYAN, C.A.; JANDENDORF, A. Self Defense by Plants. *Proceed. Nation. Acad. Scie. USA (PNAS)*. v.92, p. 4075, 1995.

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.

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.

ROMERO, F.J.; GARCÍA, L.A.; SALAS, J.A.; DIÁZ, M.; QUIRO'S ,L.M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process. Biochem.*36, 507–515, 2001.

SAFADI, F., MYKLES, D.L., REDDY, A.S.N. Partial purification and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase from *Arabidopsis* roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 348, 143–151. 1997

SAID, S & PIETRO, R. *Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico*, Eventos Ed.,, 122p, 2002.

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

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-JUNIOR, F. P., GUEDES, H. L. M., GARVEY, L.C.,AGUIAR, A.S., BOURGUIGNON, S. C., CERA, E. D.,SALVATORE G.S., BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1:Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* 50 : 18–31,2007.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto : Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. v.12, p. 38-42, 2000.

SILVA-LOPEZ, R.E. GIOVANNI-DE-SIMONE, S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Experimental Parasitology* 107 :173–182, 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.

SOUZA, M.L. Utilização de microrganismo na agricultura – uso de agentes microbianos na agricultura brasileira. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. n 21, julho/ agosto 2001.

SPITELLER, D.; DETTNER, K. & BOLAND, W. Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acetylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *The Journal Biological Chemistry*, 381: 755-762, 2000.

STEINHAUS, E. A. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. *Archives of Bacteriological Reviews*, 24: 365-373, 1960.

STEVENS, C. E. & HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, 78: 393-427, 1998.

TANADA, Y. KAYA, H.K. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. In *Insect Pathology*, pp.12-51. New York: Academic. 666p. 1993.

TAKATSUKA, J.; KUNIMI, Y. Intestinal bacteria affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 222-26, 2000.

TILLMAN, J. A.; SEYBOLD, S. J.; JURENKA, R. A. & BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 481-514, 1999.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1): 1-62, 1994.

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

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. *As pragas também morrem pela boca*. *Pesquisa Fapesp*, 54: 20-27, 2000.

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*, 2008.

VISÔTTO, L. E. ; Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 110 p, 2007.

WANG, S. L., CHEN, Y. H., WANG, C. L., YEN, Y. H., CHERN, M.K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigates* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology* 36 : 660–665, 2005.

WATANABE, K.; HARA, W. & SATO, M. Evidence for growth of strains of the plant epiphytic bacterium *Erwinia herbicola* and transconjugation among the bacterial strains in guts of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 104-111, 1998.

WILSON, I.; VOGEL, J.; SOMERVILLE, S. Signalling pathways: A common theme in plants and animals? *Current Opinion in Biology*. 7(3):175-178, 1997

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). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.