

NEILIER RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR

**PERFIL PROTEÔMICO DE HIDROLASES DO INTESTINO DE LAGARTA
DA SOJA, *Anticarsia gemmatalis*, NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-
INSETO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa – Câmpus Viçosa

T

S586p
2018

Silva Júnior, Neilier Rodrigues, 1987-

Perfil proteômico de hidrolases do intestino de lagarta da
soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto /
Neilier Rodrigues Silva Júnior. – Viçosa, MG, 2018.

vi, 54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 39-51.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Bioquímica. 3. Proteômica . 4.
Anticarsia gemmatalis. 5. Soja - Doenças e pragas. 6. Relação
inseto-planta. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

NEILIER RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR

PERFIL PROTEÔMICO DE HIDROLASES DO INTESTINO DE LAGARTA DA SOJA, *Anticarsia gemmatalis*, NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

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

APROVADA: 31 de julho de 2018.



Edvaldo Barros
(Coorientador)



Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)



Eugênio Eduardo de Oliveira



Jorge Fernando Pereira



Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Eis que esta é a parte mais difícil da dissertação. Isso porque não há um modelo bioquímico, matemático ou estatístico que consiga mensurar o quão importante algumas pessoas foram (e são) na minha trajetória até aqui. Não que essas pessoas sejam difíceis de identificar, mas a dificuldade surge da minha limitação para explicar o valor dessas pessoas em minha vida.

Agradeço à minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos dessa jornada e, em especial, à minha mãe – razão pela qual busco forças e inspiração para alcançar meus objetivos. Ao Roberto pelo exemplo de valor dos estudos e de integridade que sempre me proporcionou. À minha avó, que dizia sonhar em ver o neto formando e hoje o vê concluindo o mestrado. Agradeço à minha madrinha Angélica, ao tio Celso e aos meus afilhados Marcelo e Mateus pelo amor de sempre. À minha companheira de vida Ana Clara, que continuamente esteve ao meu lado, tornando-se imprescindível para que meus dias fossem sempre mais leves. Aos meus amigos de longa data e aos novos que Viçosa me deu. Esses são irmãos que escolhi

Meu eterno agradecimento à Universidade Federal de Viçosa que me transformou como cidadão e pessoa, que me acolheu e fez do seu campus a minha casa. Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e seus servidores. Aos membros do laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos e aos técnicos do Núcleo de Biomoléculas pela fácil e prazerosa convivência.

Agradeço à minha orientadora pelo carinho maternal, direcionamento acadêmico, confiança e às oportunidades que me são dadas. Aos meus coorientadores pela dedicação, apoio e solicitude nestes um ano e meio de mestrado.

Obrigado às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCT-IPP por darem o suporte financeiro à minha pesquisa.

“The two most important days in your life are the day you are born and the day you find out why”. (Mark Twain)

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Soja	3
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae).....	5
2.3. Interação planta-praga.....	10
2.4 Proteases	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Criação da <i>Anticarsia gemmatalis</i>	17
4.2. Preparo da dieta artificial	17
4.3. Extração e obtenção do extrato proteico do intestino da lagarta da soja	17
4.4. Atividade de proteases totais.....	18
4.5. Parâmetros cinéticos	18
4.6. Efeito de inibidores de proteases.....	18
4.7. Atividades de proteases com substratos específicos.....	19
4.8. Fracionamento com PEG	19
4.9. Cromatografia de afinidade (AC).....	20
4.10. Quantificação das Proteínas	20
4.11. Eletroforese desnaturante SDS-PAGE.....	20
4.12. Zimograma	21
4.13. Digestão trípica.....	21
4.14. Identificação de proteínas por espectrometria de massas	22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Perfil proteolítico intestinal em diferentes ínstares	24
5.2. Efeito de inibidores de proteases em diferentes ínstares	25
5.3. Identificação das proteases intestinais	31
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. APÊNDICE	52

RESUMO

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Perfil proteômico de hidrolases do intestino de lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, no mecanismo de interação planta-inseto.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Edvaldo Barros.

A soja é o quarto grão mais consumido e produzido em todo o mundo. Está entre as atividades econômicas que cresceram significativamente nas últimas décadas devido às múltiplas aplicações alimentares e industriais. A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga que causa grande prejuízo na produtividade dessa cultura, mesmo em baixas densidades populacionais, devido ao desfolhamento severo durante sua fase larval. As plantas têm mecanismos de defesa ao ataque de insetos que levam à inibição da atividade proteolítica desses herbívoros, retardando seu desenvolvimento. Por outro lado, os insetos mostram uma importante diversidade e plasticidade de suas proteases digestivas. Além do papel de digerir proteínas da dieta, essas proteases também desempenham um papel importante na defesa contra inibidores de proteases (IP) de plantas. Essa complexa relação protease-inibidor é importante para a elaboração de métodos alternativos de controle. Baseado nisso, a busca por IP potentes depende do conhecimento acerca das proteases intestinais do inseto fitófago. Portanto, o trabalho teve como objetivo avaliar os perfis enzimáticos das proteases intestinais da lagarta da soja em diferentes instares e identificar as proteases encontradas no intestino. Os resultados mostraram que há uma plasticidade no perfil proteolítico do intestino da *A. gemmatalis* ao longo do desenvolvimento larval. As atividades de enzimas do tipo cisteíno proteases foram mais importantes nos primeiros instares. Por outro lado, as enzimas do tipo serino proteases tiveram maiores atividades nas etapas mais tardias da fase larval. Além disso, três proteases foram identificadas por espectrometria de massas, através de homologia do banco de dados para Lepidoptera. O comportamento proteolítico do extrato bruto do intestino da lagarta da soja seguiu a cinética de Michaelis-Menten. Foi demonstrado pela primeira vez que o perfil de proteases do intestino de *A. gemmatalis* se altera ao longo do seu desenvolvimento. Estes resultados podem mudar o foco do desenvolvimento racional de IP para a lagarta

da soja e outras Lepidoptera, uma vez que a expressão das principais proteases de insetos não é constante.

ABSTRACT

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Proteomic profile of gut hydrolases from soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in the plant-insect interaction mechanism.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos and Edvaldo Barros.

Soybean is the fourth most consumed and produced grain in the world. It is among the economic activities that have grown significantly in recent decades due to multiple food and industrial applications. The soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), is a pest that causes great damage to the productivity of this crop, even at low population densities, due to severe defoliation during its larval phase. The plants have mechanisms of defense to the attack of insects that lead to the inhibition of the proteolytic activity of these herbivores, retarding their development. On the other hand, insects show an important diversity and plasticity of their digestive proteases. In addition to the role of digesting dietary proteins, these proteases also play an important role in the defense against plant protease inhibitors (PIs). This complex protease-inhibitor relationship is important for the development of alternative methods of control. Based on this, the search for potent PI depends on the knowledge about the intestinal proteases of the phytophagous insect. Therefore, the objective of this work was to evaluate the enzymatic profiles of the intestinal proteases of the soybean caterpillar at different instars and to identify the proteases found in the intestine. The results showed that there is a plasticity in the proteolytic profile of the intestine of *A. gemmatalis* throughout larval development. The activities of cysteine protease type enzymes were more important in the first instars. On the other hand, the serine protease enzymes had greater activities in the later stages of the larval phase. In addition, three proteases were identified by mass spectrometry, through homology of the Lepidoptera database. The proteolytic behavior of the crude intestinal extract of the soybean caterpillar followed the Michaelis-Menten kinetics. It has been demonstrated for the first time that the protease profile of the gut of *A. gemmatalis* changes throughout its development. These results may shift the focus of rational PI development to the soybean caterpillar and other Lepidoptera, since the expression of major insect proteases is not constant.

1. INTRODUÇÃO

A produção de soja é uma das atividades econômicas que mais cresceram no país nas últimas décadas. O Brasil possui grande participação no âmbito mundial, tanto na oferta quanto na demanda dos produtos agroindustriais da soja (Hirakuri & Lazzarotto, 2014; Hungria *et al.*, 2014). A grande valorização atribuída a essa commodity deve-se a fatores como o elevado teor proteico (aproximadamente 40%), com grande importância para a alimentação animal e humana e o fato de alto conteúdo lipídico, em torno de 20%, fazendo desse grão uma boa matéria prima na produção de biocombustíveis e óleo comestível (Batista *et al.*, 2014). A elevada tecnologia aplicada fornece automação, mecanização e produtividade cada vez maior. No entanto, a produtividade da soja ainda é limitada por fatores bióticos, como as pragas agrícolas, que causam grandes prejuízos a essa cultura (Guzmán *et al.*, 2016).

A lagarta da soja, é uma praga chave da sojicultura devido às grandes perdas econômicas que ela acarreta à lavoura. Considerada a principal praga desfolhadora da soja, as larvas de *Anticarsia gemmatilis* chegam a promover 100% de perda foliar (Moscardi *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2011). Por outro lado, as plantas desenvolveram múltiplas estratégias coevolutivas dinâmicas de defesa contra fitófagos. Nessa interação planta-praga, as plantas podem produzir diversos inibidores de proteases (IP) e metabólitos secundários (fitoquímicos) pela via das lipoxigenases, que afetam o desempenho e a resistência dos herbívoros (Moreira *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2017; Pilon *et al.*, 2017; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018).

Os IP de plantas são proteínas, geralmente presentes em alta concentração em tecidos de reserva, contribuindo com até 10% do conteúdo total de proteínas, sendo também detectáveis em folhas em resposta ao ataque de insetos (Jamal *et al.*, 2012; Pilon *et al.*, 2013; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018). Nesse sentido, os IP podem servir como agentes controladores de pragas, seja na forma pulverizada ou, principalmente, em plantas transgênicas que super expressam esses IP (Zhan *et al.*, 2011; Pilon *et al.*, 2017; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018).

A validação o mecanismo bioquímico da via das lipoxigenases na resposta da planta frente ao ataque de insetos, foi utilizado como modelo a interação Soja – *Anticarsia gemmatilis*. A soja foi escolhida por sua importância na produção agrícola do país. A *A. gemmatilis* foi escolhida por ser uma praga importante na sojicultura e por

ser um inseto de fácil criação e bom rendimento na produção de material biológico para as análises bioquímicas.

Levando-se em conta que a necessidade de novas formulações mais apropriadas tem elevado o custo dos agroquímicos ao longo dos anos, o interesse pela pesquisa de defensivos ecologicamente corretos tem aumentado (Cruz *et al.*, 2017; Krinski *et al.*, 2018). Esse método alternativo é mais barato na aplicação, mais específico, menos poluente e apresenta vida útil prolongada – por ser mais difícil de a praga se tornar resistente (Oppert *et al.*, 2010; Petek *et al.*, 2012; Pilon *et al.*, 2017). Atualmente, o controle de pragas agrícolas tende a reduzir a utilização dos agroquímicos em decorrência de seus efeitos danosos ao meio ambiente e à saúde humana, sendo substituídos por bioinseticidas que consideram os aspectos econômicos e ecológicos (Guzmán *et al.*, 2016). Entre as alternativas para o uso de agroquímicos, destaca-se a utilização de IP (Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

É necessário, portanto, que estudos acerca das proteases alvo sejam feitos para que o desenho racional de um IP ocorra de forma efetiva. Assim, abordagens de cinética enzimática e ferramentas proteômicas visam fornecer um melhor entendimento molecular que confere a resistência de plantas a determinada praga agrícola.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, pertence à classe das Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydae, ordem Rosales, subordem Leguminosinae, família Leguminosae, subfamília Papilionaceae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* (Moench) e espécie *Glycine max* (L.) Merrill (Li *et al.*, 2018). Possui grande variedade estrutural, que é dependente da cultivar e das condições ambientais, mas varia, em média, de 60 a 110 cm de altura. Os caules das principais cultivares apresentam híspido e pouco ramificados. Possuem raízes com ramificações que partem de um eixo principal e as vagens contêm cerca de cinco grãos, que apresentam tegumento amarelo. As folhas da soja são trifoliadas e suas flores realizam fecundação autógama, realizando fecundação cruzada numa taxa de aproximadamente 1% (Brahman *et al.*, 2018; Sediyaama *et al.*, 2015; Tuelher *et al.*, 2018).

A soja possui também uma grande variedade genética, que implica diferenças tanto no ciclo vegetativo (período entre emergência da plântula e a floração) quanto no ciclo reprodutivo (período do início da floração e o fim do ciclo da cultura), além de resistência a fatores bióticos e abióticos, sendo esses fatores também influenciados pelo meio ambiente (Sediyaama *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). As principais cultivares plantadas comercialmente no Brasil têm os ciclos que podem ser classificados entre precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, que ocorrem entre 60 e 120 dias (Hirakuri & Lazzarotto, 2014; Hungria *et al.*, 2014). Em janeiro de 2018, estavam registradas 1.799 cultivares no Registro Nacional de Cultivares para a espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Destas, 1.234 são cultivares transgênicas e 565 cultivares convencionais, um aumento de 118% no número de cultivares, quando comparado ao ano de 2011 (Li *et al.*, 2018).

Diferentes combinações de aspectos agroecológicos influenciam diretamente na produtividade da soja. Fatores abióticos, como época de semeadura, fotoperíodo, temperatura, disponibilidade de água e radiação solar disponível pode influenciar drasticamente o rendimento da colheita (Bel *et al.*, 2017; Tuelher *et al.*, 2018). Nesse sentido, a escolha da cultivar também é de grande importância. Cultivares semeadas em épocas inadequadas não expressam seu potencial de crescimento e, conseqüentemente,

tem a produtividade limitada (Brahman *et al.*, 2018). Além disso, a época de plantio afeta drasticamente sua produtividade, visto que a soja é uma planta sensível ao comprimento do dia (Li *et al.*, 2018).

A soja é a principal commodity agrícola de importância econômica no Brasil, ocupando grandes áreas de plantio que visam os mercados interno e externo (Hacisalihoglu *et al.*, 2016). Os principais países produtores desse grão são os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina, que correspondem a mais de 80% da oferta mundial (Bel *et al.*, 2017; Alghamdi *et al.*, 2018). Na safra 2004/2005, a produção brasileira de soja foi de 51 milhões de toneladas, enquanto em 2015/2016 sua produção superou 100 milhões de toneladas, com produtividade média de 3,037 kg ha⁻¹ (Graça *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

O cultivo da soja está presente em todas as regiões do território nacional e já alcança uma área de 35.099,7 ha (Brahman *et al.*, 2018; Tuelher *et al.*, 2018). A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima que a produção deverá atingir 116.995,9 mil toneladas na safra 2017/18 (CONAB, 2018). Atualmente, os principais estados brasileiros, por ordem de produção são: Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, representando juntos aproximadamente 70% da produção nacional.

A cultura da soja contribui com cerca de 25% da produção mundial de óleo vegetal. Pode ser utilizada na alimentação humana, indústria têxtil, fabricação de tintas, cosméticos e biocombustíveis (Bel *et al.*, 2017; Brahman *et al.*, 2018). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a indústria brasileira transforma anualmente cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico. Grande parte dos resíduos provenientes da indústria do óleo de soja é empregado na alimentação animal por meio do farelo de soja, que entra como componente da ração de aves, caprinos, ovinos, bovinos entre outros, fornecendo aminoácidos aos animais (Hacisalihoglu *et al.*, 2016; Alghamdi *et al.*, 2018). O grão também é utilizado na fabricação de margarina, biscoitos, temperos e chocolates, além da crescente demanda por leite de soja e suco de frutas enriquecido com soja (Graça *et al.*, 2016; Tuelher *et al.*, 2018).

De acordo com o relatório de maio de 2018 da CONAB, O principal destino da soja produzida é a indústria de esmagamento de soja. As exportações acumuladas até

maio de 2018 já somavam 311 mil toneladas, correspondendo a cerca de 13% da produção total de soja na safra 2017/2018.

O Departamento de Agricultura Americano (USDA) divulgou no seu relatório do mês de maio de 2018 que a produção mundial de soja para a safra 2017/2018 será de 334,81 milhões de toneladas, tendo os Estados Unidos com 35,70%, Brasil com 34,35% e Argentina com 11,95% da produção. Juntos esses três países são responsáveis por 82% da safra mundial. A estimativa do USDA é de que o Brasil continue como o segundo maior produtor de soja do mundo, com 115 milhões de toneladas de soja em grãos. O relatório aponta ainda que o Brasil é o maior exportador de soja em grãos do mundo, responsável por 48,60% de todas as exportações mundiais. Os Estados Unidos vêm em segundo lugar, com 37,36% e o Paraguai, em terceiro lugar, com 3,85%. Juntos, estes três países são responsáveis por 89,82% de todas as exportações mundiais.

Essa produção poderia ser maior, mas é limitada por fatores bióticos, como as pragas (Alghamdi *et al.*, 2018). A cultura intensiva da soja associada ao mau uso de agroquímicos vem intensificando a presença de diversas pragas (Bel *et al.*, 2017; Brahman *et al.*, 2018).

2.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)

Diversos insetos são encontrados na cultura de soja e, geralmente, o que possui maior densidade populacional é a *Anticarsia gemmatalis*, também conhecida como a lagarta da soja (Batista *et al.*, 2014). Devido a isso, ela destaca-se como uma das principais pragas da soja e o principal inseto desfolhador dessa cultura, chegando a provocar até 100% de perda foliar em períodos de maior população na lavoura (Moscardi *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2011; Pilon *et al.*, 2017). Esses insetos atacam desde a plântula à fase vegetativa e floração, principalmente na fase larval (Batista *et al.*, 2014) e está presente em todo o território brasileiro (Bortoli *et al.*, 2011; Massarolli *et al.*, 2018). Elas comem as folhas e provocam sérios danos na medida que crescem, comendo tanto o limbo quanto as nervuras das folhas (Pilon *et al.*, 2013; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018). A lagarta pode consumir, em média, 90 cm² de folhas a cada 24 h ao longo do seu desenvolvimento. Isso é equivalente ao dobro da sua própria massa por dia (Moreira *et al.*, 2011; Vianna *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo e possui picos populacionais a partir de janeiro. O estágio de pupa (Fig. 1a) é encontrado na superfície do solo, chegando a ficar em uma profundidade de aproximadamente 2 cm e dura cerca de sete dias, medindo de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura (Fugi *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2018). A mariposa tem um tempo de vida de cerca de quinze dias, apresentando de 30 a 38 mm de envergadura (Fig. 1b), sem dimorfismo sexual. Os ovos medem cerca de 1,5 mm de diâmetro (Fig. 1c) e são postos pela mariposa na face inferior das folhas, chegando a durar três dias até sua eclosão (Barbara, 2014; Sanches *et al.*, 2018).

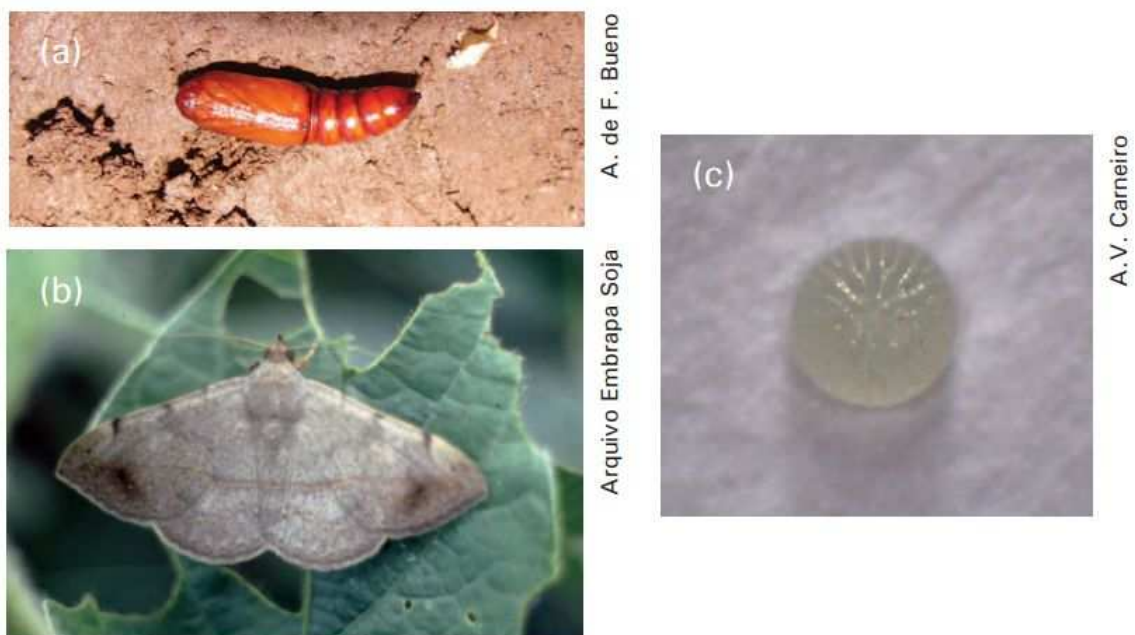


Fig. 1. Pupa (a), adulto (b) e ovo (c) de *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em Moscardi *et al.*, 2012.

Quando pequenas, com aproximadamente 1 cm, a *A. gemmatalis* apresenta cor verde (Fig. 2a) e tem quatro pares de patas abdominais. A fase larval tem duração de até vinte e cinco dias, perpassando por seis instares e chegando a medir 48 mm de comprimento (Fig. 2c). O estágio pre-pupa dura, em média, dois dias, quando a lagarta chega a diminuir seu comprimento para 25 mm (Vianna *et al.*, 2011; Sanches *et al.*, 2018).

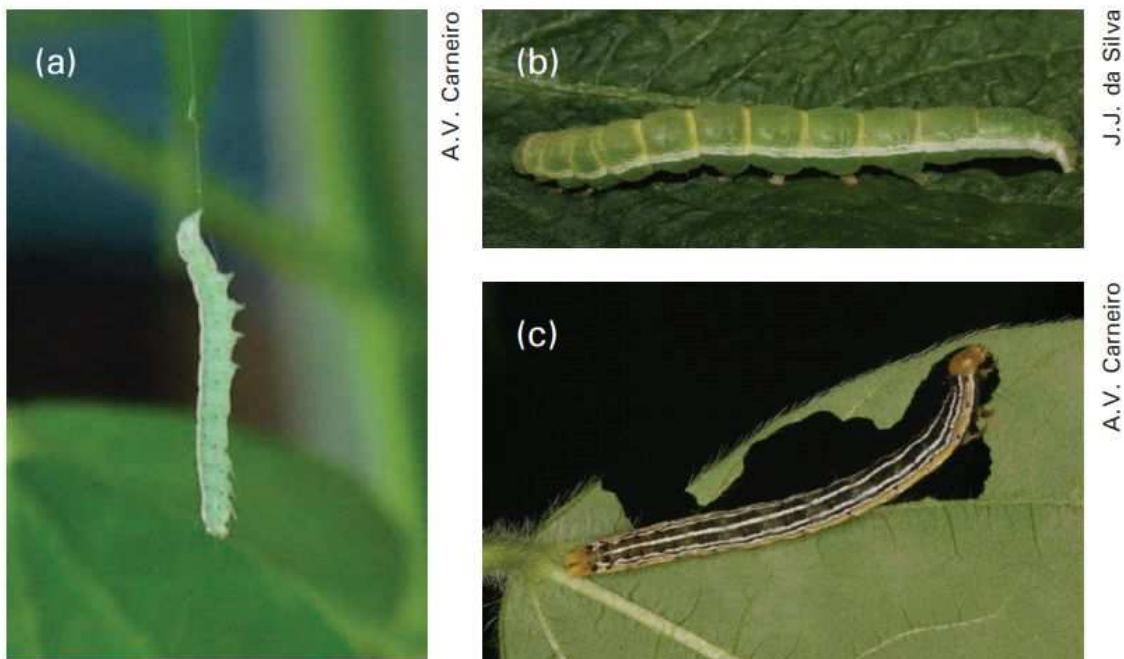


Fig. 2. Lagarta pequena (a) e grande (b) com coloração verde e escura (c) de *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em Moscardi *et al.*, 2012.

Uma única fêmea de *A. gemmatalis* chega a depositar 400 ovos durante sua vida, chegando a 1265 ovos em condições otimizadas de laboratório, quando alimentada com folhas de soja. Em condições naturais de campo ocorre numa média de 73,5 ovos por fêmea (Fugi *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2018). A duração de cada ínstar larval pode variar dependendo da planta hospedeira, da temperatura (Milano, 2008, Fiaz *et al.*, 2018), mas pode chegar a 33 dias em condições otimizadas. De acordo com Magrini *et al.*, (1999), o tempo de vida do ovo ao adulto, alimentado com soja e em condições de campo, varia entre 15,1 e 19,4 dias (Fig. 3).



Fig. 3. Ciclo de desenvolvimento da *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em Moscardi *et al.*, 2012.

O uso de métodos alternativos tem sido uma tendência cada vez mais crescente no combate da lagarta da soja - assim como para as demais pragas agrícolas - visando substituir defensivos químicos por agroquímicos orgânicos menos poluentes e mais específicos (Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). Apesar disso, os métodos de controle de pragas como a *A. gemmatalis* ainda se concentram na utilização de inseticidas (Santos *et al.*, 2018). O uso intensivo e indiscriminado causa grande impacto ao ambiente e à saúde humana, eliminação de predadores naturais e consequente desequilíbrio. Isso favorece o surgimento de pragas resistentes, exigindo o uso de produtos mais fortes ou doses elevadas (Guzmán *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018).

Novas estratégias de proteção das plantas se concentram em minimizar o uso de pesticidas e aumentar suas compatibilidades com agentes de controle ecologicamente corretos (Moreira *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2017; Fiaz *et al.*, 2018).

A *A. gemmatalis* é altamente adaptativa e essas adaptações podem ser contra vários tipos de perturbações externas, como clima, ambiente e alimento. O alto valor adaptativo e variadas situações fisiológicas no ambiente beneficiam esse inseto na evolução de múltiplos mecanismos de sobrevivência (Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

A lagarta da soja apresenta mudanças quantitativas e qualitativas no intestino quando submetida a dietas contendo inibidores de proteases (IP) de plantas. Esses IP podem ser metabolitos secundários, peptídeos ou proteínas e são encontrados constitutivamente em várias partes da planta (Jongsma *et al.*, 1997; Pilon *et al.*, 2017). Isso inclui o aumento dos níveis de proteases específicas e generalistas na tentativa de alcançar a taxa ideal da digestão proteica (Pilon *et al.*, 2013; Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017). Além disso, ocorrem respostas qualitativas que inclui a síntese de isoformas de proteases insensíveis a IP (Oliveira *et al.*, 2005; Paixão *et al.*, 2013; Pilon *et al.*, 2017). Essa tentativa de suprir deficiência de proteases ativas desvia aminoácidos destinados ao metabolismo celular para a produção de novas enzimas, o que compromete o desenvolvimento larval, podendo levá-la à morte.

Nesse sentido, as enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas. Foi demonstrado que sua inibição, na presença de inibidores de proteases, causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (Pilon *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011; Paixão *et al.*, 2013). Mendonça *et al.* (2011) caracterizaram isoformas de cisteíno protease presentes no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* e verificaram que elas auxiliam no processo de digestão proteica do inseto, podendo servir de alvos para o controle dessa praga agrícola. Portanto, o conhecimento das enzimas digestivas da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de novos programas de controle desta praga.

2.3. Interação planta-praga

As plantas desenvolveram diversas estratégias dinâmicas de defesa para melhorar sua sobrevivência e reprodução. Elas produzem uma ampla variedade de IP, que afetam o desempenho e a resistência dos insetos fitófagos (Jongsma *et al.*, 1997; Koiwa *et al.*, 1997; Habib *et al.*, 2007). Os mecanismos de defesa das plantas podem ser diretos ou indiretos. Na defesa direta há a produção de compostos tóxicos ao herbívoro. Por outro lado, na defesa indireta, ocorre a liberação de compostos voláteis que atraem predadores naturais do herbívoro (Ryan, 1990; Leo *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002). Para que essa resposta ocorra de forma eficiente e específica, é necessário que a planta identifique a lesão causada por meio de um elicitador (Kristensen *et al.*, 1999; Guzmán *et al.*, 2016).

A coevolução entre herbívoros e plantas permitiu que estas reconhecessem os principais processos metabólicos envolvidos na fisiologia dos insetos, como sistema digestivo, nervoso e endócrinos (Pilon *et al.*, 2006; Moreira, 2007; Pilon, 2008). Assim, as plantas produzem moléculas de defesa especializadas contra esses processos (Sarmiento *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2018). Os insetos revelam sua presença às plantas pela presença de compostos específicos em suas secreções salivares, intestinais e pelos fluidos de oviposição, liberados por insetos fêmeas ao depositarem ovos no tecido vegetal (Reymond, 2013; Pilon *et al.*, 2013; Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018). Esses candidatos a indutores de resposta imune das plantas incluem conjugados ácido graxo-aminoácido, caeliferinas e várias proteínas (Musser *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2012; Krinski *et al.*, 2018). Alguns desses eliciadores ativam a via de sinalização do ácido jasmônico (JA), levando a defesas diretas e defesas indiretas (Musser *et al.*, 2002; Ament *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2018). Paralelamente às pesquisas sobre a identidade e diversidade de elicitores de insetos, tem havido muitas pesquisas sobre a interação entre esses elicitores e a imunidade de plantas (Pilon *et al.*, 2017; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018).

Uma importante via de defesa da planta frente ao ataque de insetos é a via das lipoxigenases (Farmer & Ryan, 1990; Feussner & Wasternack, 2002; Shivaji *et al.*, 2010). Durante um processo de dano mecânico ocorre uma cascata de hidrólise de lipídeos iniciada pelas lipoxigenases (LOX) (Meriño-Cabrera *et al.*, 2018). As LOX formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos. Dentre eles está o JA, associado à ativação de genes que

codificam para a síntese de IP (Melan *et al.*, 1993; Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). Esses IP comprometem a digestão de proteínas no trato digestório do herbívoro, diminuindo conseqüentemente o aporte de aminoácidos biodisponíveis para o metabolismo. Com isso, o desenvolvimento do inseto fica prejudicado, podendo leva-lo à morte (Pilon, *et al.*, 2016; Paixão *et al.*, 2016).

Várias respostas adaptativas a IP têm sido descritas, mas existem mecanismos que necessitam ser elucidados sobre metabolismo dos herbívoros que contornam as barreiras impostas pelas plantas (Oppert *et al.*, 2010; Petek *et al.*, 2012; Jamal *et al.*, 2012; Pilon *et al.*, 2017). Esse conhecimento é uma ferramenta estratégica fundamental no controle sustentável de pragas (OLIVEIRA *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2017; Meriño-Cabrera *et al.*, 2018). No entanto, não há caracterização da identidade das proteases envolvidas no complexo protease-inibidor. Tampouco há na literatura uma descrição do mapeamento do centro ativo ou da estrutura primária, que é de extrema importância para que a cinética de inibição enzimática dessas proteases intestinais possa ser entendida frente a inibidores peptídicos das plantas.

Estratégias de controle da relação planta-praga precisam levar em conta que muitos aspectos da produção agrícola. Em uma monocultura de grande escala, cronogramas intensivos de produção e eliminação de inimigos naturais por pesticidas químicos de amplo espectro, promovem a colonização e o aumento populacional de pragas (Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). Além disso, os ecossistemas agrícolas altamente simplificados podem favorecer insetos generalistas - espécies que podem utilizar múltiplas culturas - e facilitam o estabelecimento de espécies invasoras (Tian *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2017; Pilon *et al.*, 2017).

Neste sentido, a exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas a injúrias de insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas. Neste caso, é necessário o conhecimento das proteases expressas pelo inseto, as quais estão envolvidas na interação planta-praga. Na tentativa de controlar a incidência de insetos em cultivares, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos clássicos. Embora os métodos de controle de pragas ainda se concentrem na utilização dessas substâncias (Moreira *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2017), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devem se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, os prejuízos ambientais e a própria pressão

de consumidores contra essa prática, tem provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna (Krinski *et al.*, 2018). A busca pelo desenvolvimento de compostos de menor custo, mais específicos e menos poluentes, como os biopesticidas, é uma prática cada vez mais frequente entre os órgãos de pesquisa (Moreira *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2017; Pilon *et al.*, 2017; Krinski *et al.*, 2018).

O fato de plantas de soja responderem com ativação da via das lipoxigenases quando submetidas a estresses bióticos e abióticos, aumentando IP e metabólitos secundários mostra que o uso de IP no controle de insetos-praga é muito promissor (Alghamdi *et al.*, 2018; Grover *et al.*, 2018). Pesquisas têm revelado a eficiência de inibidores sintéticos de proteases contra *A. gemmatalis*. Dietas contendo IP do tipo benzamidas foram utilizadas a fim de determinar o seu efeito sobre os parâmetros biológicos, bioquímicos e comportamentais do inseto e os resultados demonstraram que o desenvolvimento da lagarta da soja é comprometido quando tratada com inibidores de proteases sintéticos, implicando a morte desse inseto durante sua fase larval (Pilon *et al.*, 2006; Moreira, 2007; Pilon, 2008). No processo de interação entre os IP produzidos pela planta e as proteases do intestino do inseto, as enzimas primárias da digestão em lepidópteros são as serino proteases, dentre elas, as tripsinas (Terra *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2005; Reis, 2009). As tripsinas estão envolvidas na fase inicial da digestão de proteínas, clivando ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas preferencialmente no lado carboxil de resíduos básicos, como L-arginina e L-lisina. As tripsinas isoladas do intestino médio de vários insetos exibem massa molecular entre 20 e 35 kDa e atividade ótima em pH alcalino (Terra *et al.*, 1994; de Freitas *et al.*, 2018).

Estudos com as serino proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* foram realizados e foi verificada a presença de enzimas com atividade de tripsinas-like ligadas a membrana do intestino do inseto (Xavier *et al.*, 2005) e no extrato solúvel do intestino (Oliveira *et al.*, 2005; Reis, 2009; Wang & Zhang, 2018). Também foram caracterizadas as serino proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, onde foi observado que as características dessas enzimas bacterianas se assemelharam com as serino proteases presentes na fração solúvel (produzida pelo próprio inseto) e na fração insolúvel (proteases ligadas à membrana) extraídas do intestino de *A. gemmatalis* (Pilon, 2008).

No entanto, é necessário entender a cinética de inibição enzimática destas proteases intestinais do inseto frente a IP. Os inibidores peptídicos que mimetizam o

substrato natural, são de caráter proteico. Portanto, não são tóxicos ao ambiente no uso pulverizado. Além disso, poderia ser inserido como informação de sequência na transgenia.

Foi verificado também que *A. gemmatalis* apresenta como mecanismo de controle o fenômeno de ativação do sítio de ligação, aumentando dessa forma a atividade esterásica de tripsinas-*like* em resposta a inibidores de tripsina (Oliveira *et al.*, 2005).

Algumas das pragas agrícolas mais importantes são generalistas ou invasoras, formando populações superabundantes que são frequentemente resistentes a múltiplos inseticidas e que podem devastar a produção agrícola (Ament *et al.*, 2004; Musser *et al.*, 2002). Esses desafios devem se intensificar à medida que a crescente população humana aumenta a demanda por produção agrícola, criando uma necessidade cada vez maior de proteção efetiva contra pragas de insetos (Dillon *et al.*, 2018; Krinski *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

2.4 Proteases

O termo protease inclui endopeptidases e exopeptidases, enquanto o termo proteinase é usado para descrever apenas endopeptidases (Ryan, 1990). As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo em ligações peptídicas. As proteases 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: a) tipo de reação catalisada, b) natureza química do sítio catalítico e c) relação evolutiva de acordo com a estrutura (Barett, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais, o das exopeptidases e o das endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação.

As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos: a) serino proteases, b) aspartil proteases, c) cisteíno proteases e (d) 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).

Proteases digestivas de insetos são caracterizadas em serino, cisteíno, aspartil e metalo proteases (Terra & Ferreira, 1994). Uma espécie de inseto, muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (Liu *et al.*, 2004; Zhu-Salzman *et al.*, 2008; Ahan *et al.*, 2009).

As serino proteases são consideradas a principal classe de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteras (Terra & Ferreira, 1994). Entre elas, tripsina e quimotripsina são as mais estudadas e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas, no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (Gill *et al.*, 1996; Krem *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2005; Page & Di Cera, 2008).

Rao *et al.* (1998), em um trabalho de revisão, descreve que as serino- proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade, incluindo 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 *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Melolonthidae), cuja massa molecular, para duas enzimas tripsina-like, é de 56 e 63 kDa (Wagner *et al.*, 2002). O ponto isoelétrico das serino proteases está geralmente na faixa de pH 4,0 e 6,0.

A função catalítica das serino proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina₁₉₅reativa, histidina₅₇, e ácido aspártico₁₀₂) 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 (k_{cat}), 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 (Perona & Craik, 1995).

As serino proteases geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Essa

acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupamento hidroxila do resíduo de serina₁₉₅ sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base, leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acil-enzima, uma base imidazólica e uma amina. Esse mecanismo implica um 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 a enzima ativa e liberando o produto de degradação (Pólgar & Halász, 1982; Craik *et al.*, 1987). Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações. Este mecanismo é capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ligação peptídica mais de 10^9 vezes em relação à reação não catalisada (Hedstrom, 2002; Page & Di Cera, 2008).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os perfis enzimáticos de proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* em diferentes ínstares e identificar as proteases homólogas àquelas encontradas no intestino.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Criação da *Anticarsia gemmatalis*

A criação de *A. gemmatalis* foi mantida em condições controladas de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $70\% \pm 10\%$ de umidade no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Para obtenção dos insetos, gaiolas de 50 x 50 cm foram teladas e revestidas internamente com folhas de papel sulfite A4. As pupas foram colocadas em placas de petri (150 x 20 mm) no interior das gaiolas e, após suas eclosões, as mariposas foram alimentadas com solução nutritiva composta de mel (20,0 g), cerveja (350 mL), sacarose (50 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (650 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de petri. As folhas de papel que continham ovos de *A. gemmatalis* foram cortadas em tiras de 2,5 cm de largura e 10 cm de comprimento, acondicionadas em recipiente (500 mL) com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde estava acoplada uma tela de organza. Os recipientes foram transferidos para uma câmara climatizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de $60\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. A alimentação das lagartas foi iniciada após a eclosão dos ovos com dieta artificial colocando-se um cubo de dieta nos recipientes.

4.2. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi composta de feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, gérmen de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Ágar e água foram autoclavados por 20 minutos à pressão de $1,5\text{ kgf cm}^{-2}$ e os ingredientes foram misturados em liquidificador industrial. Em seguida foram adicionados ácido ascórbico (6,0 g), ácido sórbico (3,0 g), nipagin (metilparabeno) (5,0 g), formol 40% (6,0 mL) e 23 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1,0 mg), pantotenato de cálcio (1,0 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,5 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg) e água (1,0 L) até formar uma pasta homogênea, que foi transferida - ainda quente - para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida sob luz ultravioleta e conservada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3. Extração e obtenção do extrato proteico do intestino da lagarta da soja

Intestinos de lagartas no terceiro, quarto e quinto ínstares foram extraídos após dissecação e colocados em 1 mL de solução de ácido clorídrico 10^{-3} M a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantendo

sempre a proporção de cinco intestinos por 1 mL de solução. O extrato proteico foi obtido por meio da lise celular resultante de três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, seguido de maceração com o auxílio de gral e pistilo. A suspensão obtida foi centrifugada a 10000 g por 30 min a 4 °C e o *pellet* foi descartado. O sobrenadante contendo o material solúvel foi separado, denominado extrato proteico bruto e conservado a -20 °C.

4.4. Atividade de proteases totais

A atividade de proteases totais do intestino da lagarta da soja foi determinada utilizando azocaseína como substrato em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, CaCl₂ 20 mM (pH 8,0), a 37 °C. A velocidade de formação do produto, calculada em $M s^{-1}$, foi obtida a partir dos valores de absorvância, por meio da fórmula $V = A_{440} (\epsilon \ell t)^{-1}$, na qual A_{440} corresponde à absorvância a 440 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar ($36 M^{-1} cm^{-1}$), ℓ é o caminho óptico (1 cm) e t é o tempo de incubação da reação (120 s). Foram utilizados 5 µg de proteínas de cada amostra e 500 µL de azocaseína 0,3 mM e os valores de absorvância foram lidos a cada segundo no intervalo de 120 s no espectrofotômetro (Hitachi UV-VIS, modelo U-5100).

4.5. Parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos $K_{M \text{ app}}$ e $V_{\text{máx app}}$ foi obtida em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, CaCl₂ 20 mM, a 37 °C, com concentrações do substrato azocaseína variando de 0,031 a 4,05 mM. Foram utilizados 5 µg do extrato enzimático proveniente do quinto ínstar a fim de determinar a melhor concentração de substrato para as demais análises bem como o comportamento cinético do conjunto de proteases presentes no intestino da *A. gemmatalis*. O quinto ínstar foi escolhido por ter sido o que apresentou maior rendimento proteico e maior atividade específica. Os parâmetros cinéticos foram estimados por regressão não linear (equação de Michaelis-Menten) com o procedimento de ajuste de curva do SigmaPlot 12.0 (Systat Software).

4.6. Efeito de inibidores de proteases

Os inibidores sintéticos fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), tosil lisina clorometilcetona (TLCK), tosil fenilalanina clorometilcetona (TPCK), epoxisuccinil leucilamido butano (E-64) e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foram incubados com extratos brutos do intestino de *A. gemmatalis* do terceiro, quarto e quinto ínstars.

O extrato protease-inibidor foi adicionado à solução de azocaseína preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e o sistema reacional foi incubado a 37 °C durante 120 s enquanto a leitura de absorvância era realizada a cada segundo no modo automático do espectrofotômetro (Hitachi UV-VIS, modelo U-5100). O valor de atividade do controle (ou seja, na ausência de inibidores) foi relativizado para 100% e os demais tratamentos comparados com ele por taxa de atividade residual, também em porcentagem.

4.7. Atividades de proteases com substratos específicos

Os substratos específicos *N*- α -benzoil-L-Arg-*p*-nitroanilida (L-BApNA), substrato de tripsina-*like*, *N*-succinil-alanina-alanina-L-prolina-phenylalanina-*p*-nitroanilida (SAAPPpNA), substrato de quimotripsina-*like*, e L-piroglutamil-L-phenilalanil-L-leucina-*p*-nitroanilide (L-PFLNA), substrato de cisteíno proteases, foram solubilizados separadamente no solvente polar aprótico dimetilsulfóxido (DMSO) antes de serem diluídos em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, CaCl₂ 20 mM. Os extratos brutos do terceiro, quarto e quinto ínstares foram adicionados aos substratos sintéticos e incubados a 37 °C por 120 s (Erlanger *et al.*, 1961). Os valores de absorvância do produto formado (*p*-nitroanilida) foram lidos em 410 nm no espectrofotômetro (Hitachi UV-VIS, modelo U-5100) e as atividades foram calculadas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹ cm⁻¹.

4.8. Fracionamento com PEG

Parte do extrato bruto do intestino de lagartas no quinto ínstar foi fracionado com polietilenoglicol (PEG). Para isso, 10 mL do extrato bruto foi adicionado em 10 mL solução aquosa de PEG 4000 a 30%. A solução foi homogeneizada em vortex por 30 s, mantida no gelo por 30 min e centrifugada a 3200 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante, contendo as proteínas de baixa abundância, foi recolhido e armazenado em -20 °C até análise posterior. O *pellet* foi ressuscitado com 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Posteriormente foi centrifugado a 6000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado e o *pellet* ressuscitado e lavado por dois ciclos com acetona 80% em gelo e centrifugado a 6000 g por 10 min a 4 °C. Finalmente, o *pellet* foi lavado com etanol 70% e secado a temperatura ambiente. As diferentes frações foram utilizadas em corridas eletroforéticas.

4.9. Cromatografia de afinidade (AC)

A fim de separar as serino proteases, 5 mL do extrato bruto de lagartas do quinto ínstar foram aplicados a uma coluna *HiTrapTM benzamidine Fast Flow (high sub)* (1 x 5 mL). O quinto ínstar foi escolhido por ter sido o que apresentou maior rendimento de proteínas e maior atividade específica. A coluna foi acoplada ao sistema de FPLC *Amersham* modelo UPC-900 e a fase estacionária foi equilibrada com 25 mL de tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,2, NaCl 0,5 M. As proteínas foram eluídas com fluxo isocrático de 1,0 mL min⁻¹ do tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 3,0 e monitoradas por leituras de absorvância de 280 nm. As frações foram coletadas a cada 1,0 mL no modo automático, utilizando um coletor de frações *Amersham FRAC-920*. As frações com atividade proteolítica foram unidas e armazenadas a -20 °C.

4.10. Quantificação das Proteínas

As quantificações de proteínas das amostras do extrato bruto, do fracionamento com PEG e da AC foram realizadas pelo método de Bradford, em triplicata (BRADFORD, 1976). Uma curva padrão foi preparada com concentrações crescentes de soro albumina bovina (BSA) na faixa de concentração entre 0 e 15 µg µL⁻¹, diluído com o mesmo tampão utilizado na diluição das amostras.

4.11. Eletroforese desnaturante SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes, de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, 1970). O gel de separação utilizado teve 1,5 mm de espessura e concentração de 10% de poliacrilamida tamponada em 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Cada canelela recebeu 50 µg de proteínas totais, derivadas das amostras previamente fervidas com tampão de amostra composto por 277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 44,4% glicerol e 4,4% SDS. As proteínas separadas na eletroforese foram aquelas provenientes do extrato bruto, do fracionamento com PEG e da cromatografia de afinidade. A corrida eletroforética foi executada a 200 V para, em seguida, o gel ser fixado em solução aquosa de 10% metanol e 5% ácido acético por 2 h sob agitação. A coloração foi realizada em solução de coomassie G250 até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas.

4.12. Zimograma

As proteases foram detectadas por meio de suas atividades sobre colágeno, em zimograma. Para isso, 0,1% de colágeno foi copolimerizado em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) e 1,0 µg de extrato bruto de intestino de lagartas do quinto ínstar foi aplicado em cada canaleta do gel. A eletroforese foi feita a corrente constante de 20 mA por gel e sob banho de gelo. Após o término, o gel passou por 3 lavagens de 40 min em tampão de renaturação composto por 100 mM de Tris-base, pH 8,0, 2,0 mM de CaCl₂ e 2,5% Triton X-100. O gel foi incubado em tampão contendo 100 mM de Tris-base, pH 8,0, 2,0 mM de CaCl₂ por 18h a 37 °C. Por fim, o gel foi corado com solução de coomassie G250 por 72 h.

4.13. Digestão triptica

As bandas bem definidas do SDS-PAGE e do zimograma foram retiradas do gel com o auxílio de um bisturi, picadas e colocadas em microtubos devidamente identificados. Nesses microtubos continham amostras provenientes do extrato bruto do intestino, do fracionamento por PEG, da eluição da AC e dos halos com atividade proteolítica do zimograma. Os fragmentos de gel foram descorados por meio de sucessivas lavagens em solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM, à temperatura ambiente (Shervchenko *et al.*, 2006).

A solução de descoloração foi removida e os géis foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 min (2 vezes) e secos em *speed vac* por 15 min. As proteínas foram reduzidas em solução de 65 mM DTT e 100 mM bicarbonato de amônio por 30 min a 56 °C utilizando banho termostático. Em seguida, as proteínas foram alquiladas em solução 200 mM de iodoacetamida e 100 mM bicarbonato de amônio a por 30 min à temperatura ambiente e protegido de luz. Os géis foram lavados com 100 mM bicarbonato de amônio durante 10 min por 2 vezes, desidratados em acetonitrila 100% durante 5 min. Após repetir esse ciclo de lavagem por 3 vezes, os géis foram secos em *speed vac* durante 15 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (*Trypsin, from porcine pancreas, Proteomics grade*) 25 ng mL⁻¹ em solução de 40 mM bicarbonato de amônio pH 8,0 e acetonitrila 10%. 20 µL da solução com enzima foram adicionados a cada microtubo contendo os géis e submetidos a banho de gelo durante 45 min para penetração no gel. Decorrido esse tempo, 50 µL de solução 50 mM

bicarbonato de amônio foram adicionadas e as amostras foram incubadas a 37 °C em banho termostático por 20 h (*overnight*). Posteriormente, os géis foram submetidos a banho ultrassônico durante 10 min, centrifugados a 200 g por 2 min e a solução removida para novos microtubos devidamente nomeados. 40 µL de solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% foram adicionados nos géis restantes para recuperar uma maior quantidade de fragmentos trípticos. Os microtubos contendo fragmentos de géis foram novamente submetidos a banho ultrassônico durante 10 min, centrifugados e a solução transferida aos novos microtubos. As soluções contendo os fragmentos trípticos foram concentradas em *speed vac* até secagem total e armazenados a -20 °C.

4.14. Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para a análise por espectrometria de massas, os peptídeos digeridos foram dessalinizados utilizando-se micro colunas do tipo Zip-Tip (Millipore®), contendo resina de fase reversa (C18) previamente ativada com acetonitrila 100% e equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos trípticos foram solubilizados em solução de ácido fórmico 0,1%. Após a solubilização, 10 µL foram usados para a análise por LC-MS, utilizando um sistema UPLC (nanoAcquity-Waters), contendo uma coluna *trap* e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 µm - 100 µm × 100 mm operando com uma taxa de fluxo de 0,5 µL min⁻¹. Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas do tipo *Q-TOF* (Bruker), atuando no modo *online*, usando uma agulha de ionização nanoESI. Os tampões de fase móvel utilizados para o programa de gradiente foram: água e ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). A programação de gradiente consistiu de 5% de B durante 5 min, rampa de subida linear até 50% de B em 35 min, rampa de subida linear até 90% de B por 10 min, manutenção de 95% de B por 10 min, rampa de descida linear para 5% de B durante 5 min, seguido pela manutenção a 5% de B durante 5 min. O escaneamento dos íons realizado pelo espectrômetro massas foi entre 300 e 1500 m/z em modo positivo e os dados foram adquiridos durante 70 min em cada análise LC-MS/MS. O espectrômetro de massas operou no modo auto-MSn, o qual coletou espectros MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de cargas simples. A aquisição dos dados do instrumento LC-MS foi gerida pelo *software Hystar*(Bruker) e os espectros foram processados com o *software Data Analysis*(Bruker) utilizando as configurações padrões para proteômica.

Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7 (Ma *et al.*, 2003) com uma licença de *Client* local, conectado com um servidor remoto, para identificação de proteínas pelo método de *sequenciamento de novo* assistido por *software* e pesquisa em banco de dados de sequências de proteínas de Lepidopteras. Os parâmetros utilizados no programa foram: lista de proteínas em formato fasta obtidos do site *NCBI*, contendo todas as proteínas descritas para Lepidópteras como banco de dados; a oxidação da metionina como uma modificação variável, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de cargas de 2+, 3+, 4+, tripsina como a enzima de clivagem e erro de massa de 0,15 Da. Foram consideradas como positivos verdadeiros, identificações com FDR menor que 1,0% e com pelo menos um peptídeo sequenciado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil proteolítico intestinal em diferentes instares

A atividade proteolítica do extrato bruto do intestino de *A. gemmatalis* sobre o substrato azocaseína é mostrada pelo modelo hiperbólico de Michaelis-Menten (Fig. 4A) e pelo duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Fig. 4B). Os parâmetros cinéticos aparentes obtidos foram $V_{\text{máx app}} = 289,8571 \text{ nM s}^{-1}$ e $K_{\text{M app}} = 0,296817 \text{ mM}$. Como o valor de K_{M} reflete a concentração fisiológica de substrato, estes resultados serviram de base para a determinar qual a melhor concentração de azocaseína a ser utilizada nas demais determinações de parâmetros cinéticos das enzimas. Além disso, esses parâmetros revelam o comportamento cinético médio das proteases presentes no intestino da lagarta da soja em seu quinto instar, o qual segue a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato analisada. O coeficiente de correlação não linear ajustado para a equação de Michaelis-Menten foi $R^2 = 0,9987$, enquanto o valor de correlação linear para o gráfico de Lineweaver-Burk foi $R^2 = 0,9941$.

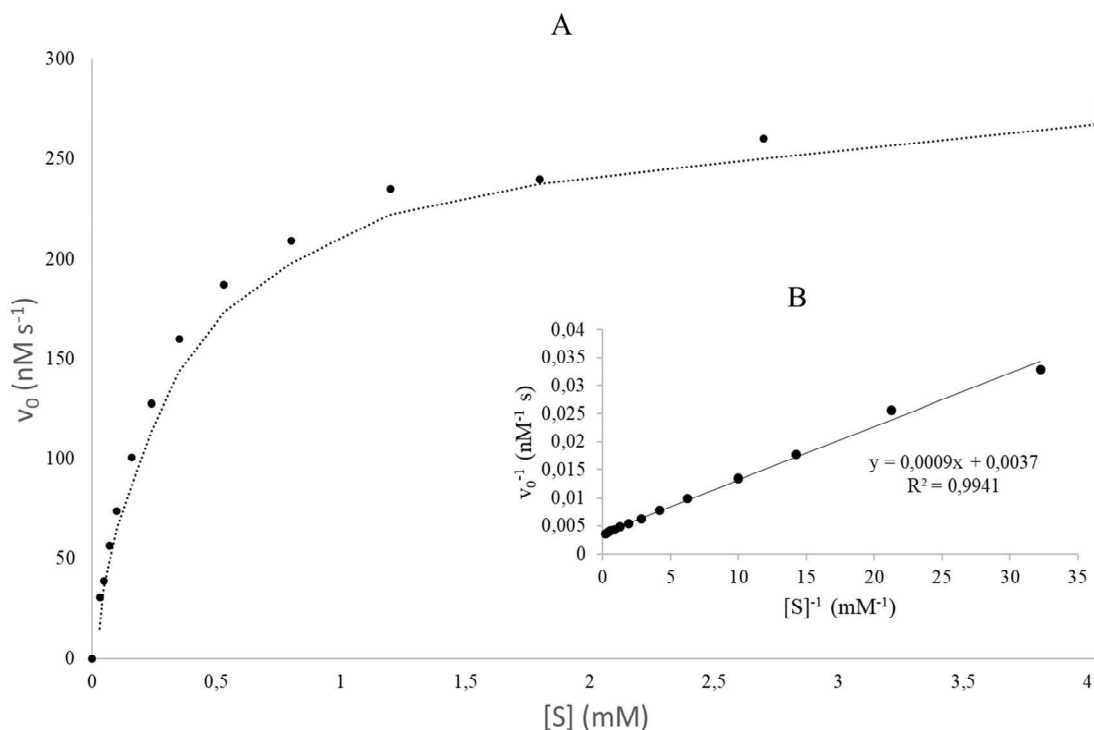


Fig. 4. Gráficos de Michaelis-Menten (A) e de Lineweaver-Burk (B) para a atividade de proteases do intestino de *Anticarsia gemmatalis* sobre o substrato azocaseína.

A atividade proteolítica do intestino de *A. gemmatalis* apresentou diferença entre os ínstar (Fig. 5), tanto na a atividade total (Fig. 5A) quanto na atividade específica (Fig. 5B). O quinto ínstar foi o que apresentou maior atividade específica, com $1,63 \mu\text{M s}^{-1} \text{mg}^{-1}$, indicando uma necessidade metabólica crescente do inseto por aminoácidos, visto que, nos últimos ínstar que precedem à pupa, o inseto precisa armazenar o máximo de nutrientes disponíveis da dieta para a metamorfose (Wheeler *et al.*, 2000; Hagedon & Kaltenbach, 2018). Além disso, bactérias endossimbiontes têm importante impacto sobre a atividade proteolítica no intestino de Lepidopteras (Pillon *et al.*, 2013; Pillon *et al.*, 2017), contribuindo para a atividade encontrada, principalmente nos últimos ínstar do estágio larval (Visôto *et al.*, 2009; Regode *et al.*, 2016; Shinde *et al.*, 2017).

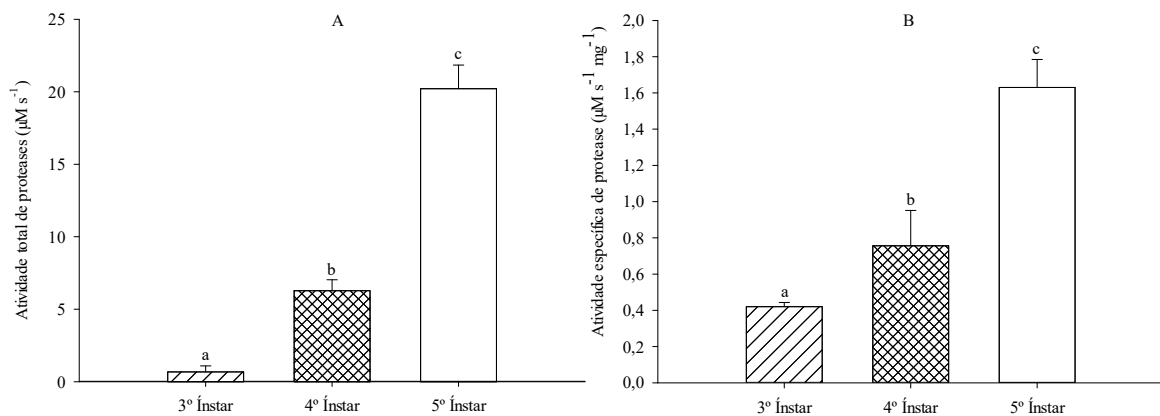


Fig. 5. Atividade de proteases total (A) e atividade específica (B) de proteases do intestino de *Anticarsia gemmatalis* em diferentes ínstar, tendo a azocaseína como substrato. Médias com mesmas letras não diferem pelo teste-t de Student ($P < 0,05$).

5.2. Efeito de inibidores de proteases em diferentes ínstar

O efeito de inibidores de proteases comerciais, específicos para cada classe, foi avaliado para os extratos enzimáticos provenientes do intestino de lagartas no terceiro, quarto e quinto ínstar. As atividades residuais de proteases foram avaliadas e comparadas a fim de caracterizar a evolução do perfil proteolítico no intestino da lagarta da soja nessas diferentes etapas da fase larval. O impacto das inibições sobre a hidrólise

da azocaseína está apresentado na Fig. 6. Todos os tratamentos diferiram dos controles, sem adição de inibidores, que tiveram as atividades relativizadas para 100%.

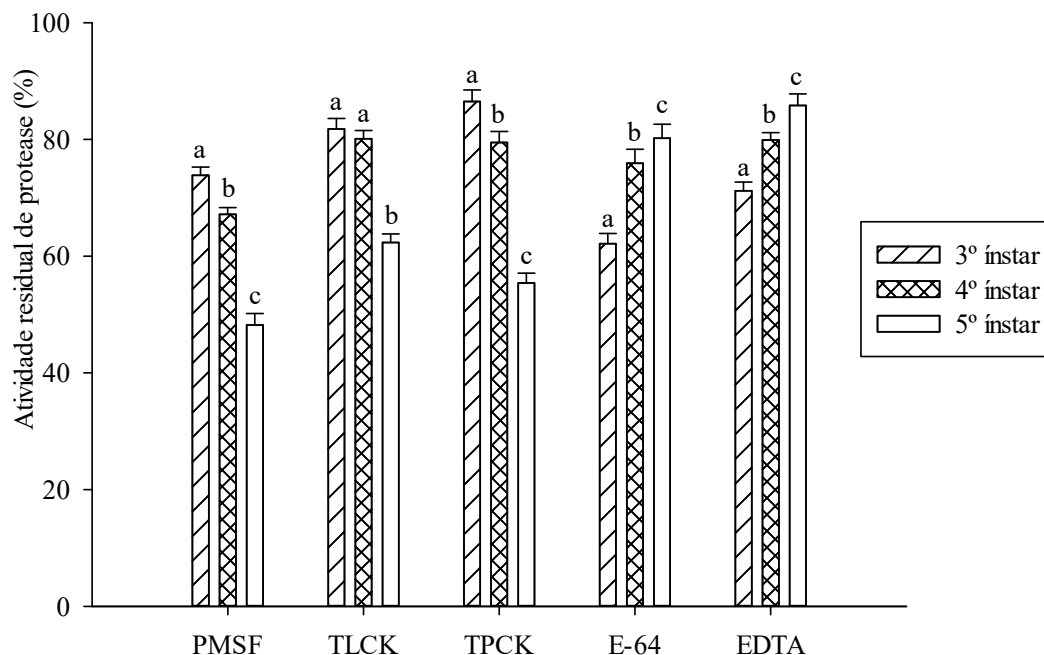


Fig. 6. Impacto de inibidores proteases específicos sobre a atividade de proteases totais utilizando a azocaseína como substrato. A atividade foi realizada em diferentes ínstars de *Anticarsia gemmatalis*. Médias com mesmas letras não diferem pelo teste-t de Student ($P < 0,05$).

O PMSF afetou drasticamente a atividade das serino proteases no quinto ínstar, deixando uma atividade residual de 48,2%, corroborando com Oliveira *et al.*, 2005. Esse inibidor irreversível de serino proteases reage com o resíduo de serina do sítio ativo, inativando a enzima (Barrett 1994; Compton *et al.*, 1997). A sub-subclasse das serino endopeptidases (E.C. 3.4.21) é conhecida por compreender as principais proteases de Lepidopteras (Oliveira *et al.*, 2005; Paixão *et al.*, 2013; Pilon *et al.*, 2017). No entanto, o presente estudo indicou que essa relevância ocorre fortemente apenas para o quinto ínstar – etapa do desenvolvimento larval na qual os estudos de caracterização enzimática são comumente realizados, por fornecerem um melhor rendimento de proteases totais. No terceiro e no quarto ínstar, as atividades residuais diferiram entre si e foram 73,86% e 67,15% respectivamente.

O inibidor irreversível TLCK foi utilizado para avaliar o impacto de tripsinas-*like* na hidrólise de proteínas. Isso foi possível pois o TLCK alquila o resíduo de histidina da tríade catalítica, próximo ao sítio de clivagem da enzima, enquanto o resíduo de lisina do inibidor se posiciona no sítio S1 da enzima, inibindo-a (Porter *et al.*, 1971; Kourteva *et al.*, 1987; Griscavage *et al.*, 1995; Grammer *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2006; Trenholme *et al.*, 2014). Os resultados mostraram que a digestão intestinal do inseto depende de enzimas tripsina-*like* principalmente no quinto ínstar, apresentando uma atividade residual de 62,33% quando inibida, corroborando com Oliveira *et al.*, 2005. Por outro lado, o terceiro e o quarto ínstar não apresentaram diferença, tendo uma atividade residual de cerca de 80% (Fig. 6).

Assim como o TLCK, o TPCK também alquila o resíduo de histidina próximo do sítio ativo da enzima. No entanto, a parte do inibidor que se posiciona no sítio de clivagem da enzima é o resíduo de fenilalanina (Shaw *et al.*, 1965; Stefanis *et al.*, 1997; King *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Frydrych, 2008). Essa inibição irreversível das quimotripsinas-*like* do intestino de *A. gemmatalis* apresentou um forte efeito sobre o quinto ínstar, abaixando a atividade para 55,4% em relação ao controle. Já no terceiro e no quarto ínstar, as atividades residuais foram de 86,5% e 79,46%. As inibições diferiram entre o terceiro e no quarto ínstar, mas foram inferiores às observadas no quinto ínstar (Fig. 6).

Os resultados das inibições por TLCK e TPCK corroboraram com os resultados obtidos da inibição por PMSF, visto que tanto as tripsina-*like* quanto as quimotripsina-*like* são serino proteases. Ou seja, a contribuição das serino proteases para a atividade hidrolítica no intestino de *A. gemmatalis* aumenta do terceiro ao quinto ínstar.

O tratamento das amostras com o inibidor irreversível E-64 foi realizado no intuito de avaliar a contribuição das cisteíno proteases (E.C. 3.4.22) presentes no intestino da lagarta da soja frente à digestibilidade de proteínas, devido à sua elevada seletividade a cisteíno proteases (Grozdanović *et al.*, 2013; Tanabe *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011). Os resultados mostraram que, diferentemente das serino proteases, a contribuição das cisteíno proteases ocorre principalmente nos ínstars iniciais. Os extratos enzimáticos do intestino de *A. gemmatalis* tratados com E-64 diferiram entre si e apresentaram uma atividade residual de apenas 62,13% no terceiro ínstar, contra 75,9% no quarto ínstar e 80,2% no quinto ínstar (Fig. 6).

O impacto da inibição sobre a azocaseína também foi avaliado na adição de EDTA, um agente quelante que forma complexos com íons metálicos, inibindo a atividade de metaloproteases e enzimas com modulação positiva realizada por cátions (Oliveira *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2018). Os resultados mostram que a dependência da atividade proteolítica por metaloproteases decresce do terceiro ao quinto ínstar, comportamento semelhante ao apresentado pelas cisteíno proteases. A atividade residual de enzimas proteolíticas no terceiro ínstar foi de 71,21% contra 79,9% no quarto ínstar e 85,83% no quinto ínstar (Fig. 6).

Cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} são componentes essenciais para o bom funcionamento de algumas enzimas, mas podem ser tóxicos ao inseto em quantidades elevadas (Lu *et al.*, 2011; Zan *et al.*, 2011). Huang *et al.* (2012) demonstraram que baixas concentrações de íons metálicos favorecem o desenvolvimento de *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nos primeiros ínstares larvais, mas um “efeito retardado” faz com que esses metais sejam prejudiciais nos últimos ínstares, levando a uma diminuição do tempo larval e aumento da mortalidade. Huang *et al.* (2012) sugerem ainda que uma concentração de até 50 mg kg⁻¹ de Cu^{2+} na dieta de *S. litura* favorece o desenvolvimento da lagarta entre o primeiro e o terceiro ínstar. Valores acima de 50 mg kg⁻¹ provocariam efeito cumulativo no inseto, principalmente nos ínstares mais tardios, levando à morte. Essas constatações podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelos resultados obtidos no presente trabalho. O fato de as metaloproteases terem apresentado maior atividade nos primeiros ínstares é uma evidência de que os metais foram utilizados como cofatores enzimáticos e, na medida em que o aporte de metaloproteases diminui nos últimos ínstares, os metais se acumulam.

A mudança do perfil proteolítico ao longo do desenvolvimento entre o terceiro e o quinto ínstar da *A. gemmatilis* fica mais evidente ao agrupar as atividades residuais de proteases por ínstares (Fig. 7). A atividade das serino proteases passou a ser significativamente predominante apenas no quinto ínstar.

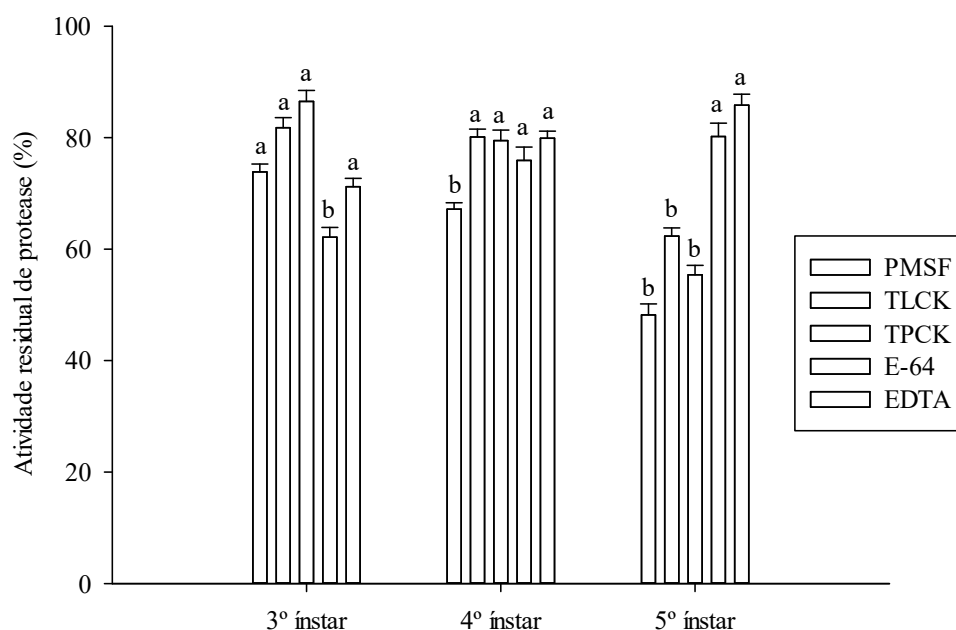


Fig. 7. Atividade residual de proteases totais, utilizando a azocaseína como substrato, em diferentes instares de *Anticarsia gemmatalis*. Foram utilizados diferentes inibidores para diferentes sub-subclasses de proteases. Médias com mesmas letras não diferem pelo teste-t de Student ($P < 0,05$).

Os insetos apresentam adaptações fisiológicas na expressão enzimática quando há presença de inibidores na dieta (Paixão *et al.*, 2013; Pilon *et al.*, 2017). Estudos têm concluído, ainda, que as proteases do intestino de *Helicoverpa armígera* são reguladas não apenas pela natureza ou demanda da dieta, mas por diferentes expressões gênicas intrínsecas de cada instar (Patankar *et al.*, 2001). Além disso, expressões diferenciadas de proteases em *Spodoptera littoralis* foram encontradas durante o desenvolvimento larval (Keller *et al.*, 1996). Algumas delas são responsáveis pela inativação de toxinas no quinto instar, como Bt (Keller *et al.*, 1996). Outros estudos também mostraram que o perfil de proteases de Lepidopteras, pode sofrer alterações durante o desenvolvimento larval, tais como *Naranga aenescens* (Zibae *et al.*, 2011), *Helicoverpa armígera* (Kipgen *et al.*, 2014) e *Conogethes punctiferalis* (Josephraj Kumar *et al.*, 2006). É a primeira vez que essa constatação é realizada em *Anticarsia gemmatalis*.

Diferentes substratos cromogênicos foram utilizados para delinear as atividades de proteases específicas do intestino de *A. gemmatalis* em diferentes instares (Fig. 8). As diferenças nessas atividades específicas foram comparadas entre o terceiro, quarto e quinto instares, sendo significativamente distintas a um P valor menor que 0,005. A atividade amidásica de tripsina-like foi avaliada utilizando-se o substrato L-BApNA. A atividade aumentou consideravelmente ao longo dos três instares analisados, sendo $0,0746 \mu\text{M s}^{-1}$ no terceiro instar, $0,2166 \mu\text{M s}^{-1}$ no quarto instar e $0,379 \mu\text{M s}^{-1}$ no quinto instar.

A atividade amidásica de quimotripsina-like foi realizada com o substrato SAAPPpNA e houve um aumento de atividade específica para essas enzimas ao longo do desenvolvimento larval, tendo apresentado $0,0338 \mu\text{M s}^{-1}$ no terceiro instar contra $0,1349 \mu\text{M s}^{-1}$ no quarto e $0,309 \mu\text{M s}^{-1}$ no quinto. O fato de tripsina-like e quimotripsina-like terem aumentado significativamente do terceiro para quarto e do quarto para o quinto instar corrobora e confirma os resultados obtidos por meio de inibidores específicos. Os resultados mostram ainda que as enzimas tripsina-like são mais eficientes que as quimotripsina-like no quinto instar, corroborando com estudos anteriores que demonstraram a prevalência desse grupo de enzimas em Lepidopteras de quinto e sexto instar (Grover *et al.*, 2018; Chandra *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2018).

A atividade de cisteíno proteases foi determinada por meio do substrato PFLNA e os resultados mostraram que a atividade específica dessa sub-subclasse diminuiu com o tempo. A atividade no terceiro instar foi de $0,338 \mu\text{M s}^{-1}$, $0,164 \mu\text{M s}^{-1}$ no quarto instar e $0,0889 \mu\text{M s}^{-1}$ no quinto instar. Mais uma vez, esses resultados confirmam aqueles obtidos por meio de inibidores específicos, mostrando que a prevalência de atividade de cisteíno proteases diminui com o desenvolvimento larval, dando lugar para as serino proteases. Elevadas atividades de cisteíno proteases já foram detectadas em trabalhos envolvendo larvas jovens de Lepidopteras (Liu *et al.*, 2018; Senthil-Nathan *et al.*, 2018), bem como o controle da expressão gênica dessas enzimas, mostrando que há aumento da síntese de serino proteases em detrimento da diminuição de cisteíno proteases em *Tribolium castaneum* (Lomate *et al.*, 2018).

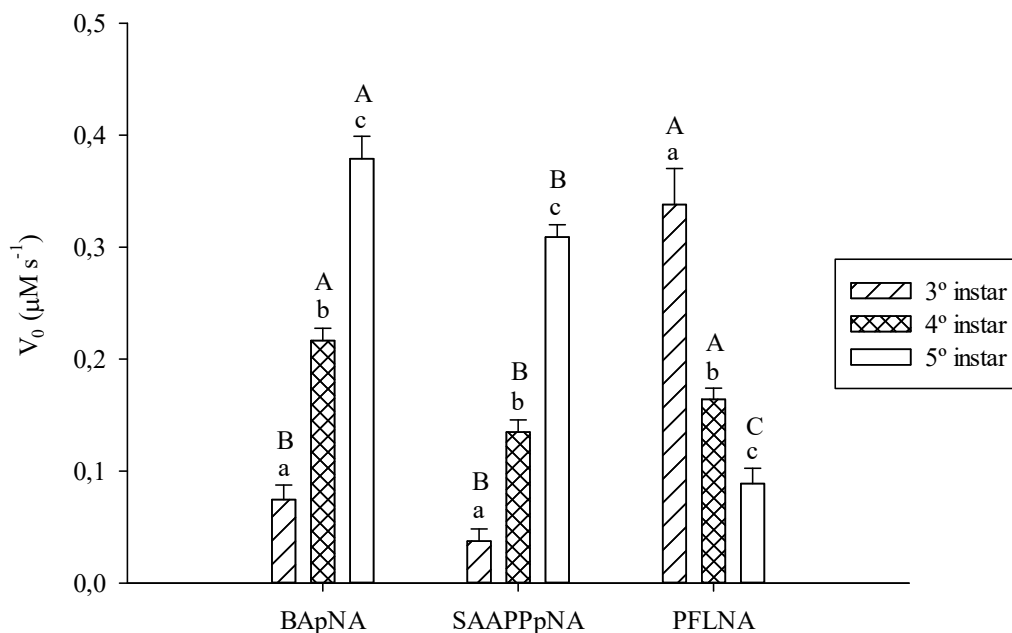


Fig. 8. Atividade de tripsina-like, quimotripsina-like e cisteíno proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* em diferentes ínstares com os substratos específicos BApNA, SAAPPpNA e PFLNA. Médias com mesmas letras não diferem pelo teste-t de Student ($P < 0,05$). Letras minúsculas mostram comparação entre diferentes ínstares submetidos ao mesmo substrato. Letras maiúsculas comparam o mesmo ínstar sob diferentes substratos.

5.3. Identificação das proteases intestinais

A figura 9 representa as análises de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (Fig. 9A e Fig. 9B) e semidesnaturante (Fig. 9C). As corridas eletroforéticas revelaram diferentes perfis proteicos obtidos a partir dos tratamentos realizados sobre o extrato bruto. A precipitação por PEG foi eficiente, removendo boa parte das proteínas mais abundantes do extrato bruto e, com isso, aumentando a concentração relativa das menos abundantes (Fig. 9A). Essa diferença é revelada no padrão de bandas. Espera-se que as enzimas estejam em baixa concentração no meio fisiológico, quando comparadas com as concentrações de proteínas com função estrutural, transporte, armazenamento, reguladoras e de defesa. Portanto, essa

precipitação fez-se necessária, porque a utilização de amostras complexas em espectrometria de massas pode provocar supressão de sinais, principalmente no uso de plataformas com baixa sensibilidade e resolução. A finalidade nesse tratamento foi priorizar a identificação das proteínas de menor concentração.

A cromatografia de afinidade (AC) foi realizada visando separar e recuperar as serino proteases presentes no extrato bruto (Fig. 9B). O perfil de proteases obtido da amostra semipurificada na AC sofreu alterações em relação ao extrato bruto e muitas bandas foram reveladas. O zimograma mostrou a presença de, pelo menos, cinco proteases (Fig. 9C), que formaram halos na malha do gel copolimerizado com gelatina. As bandas bem definidas dos géis SDS-PAGE e do zimograma foram excisadas e analisadas por espectrometria de massas.

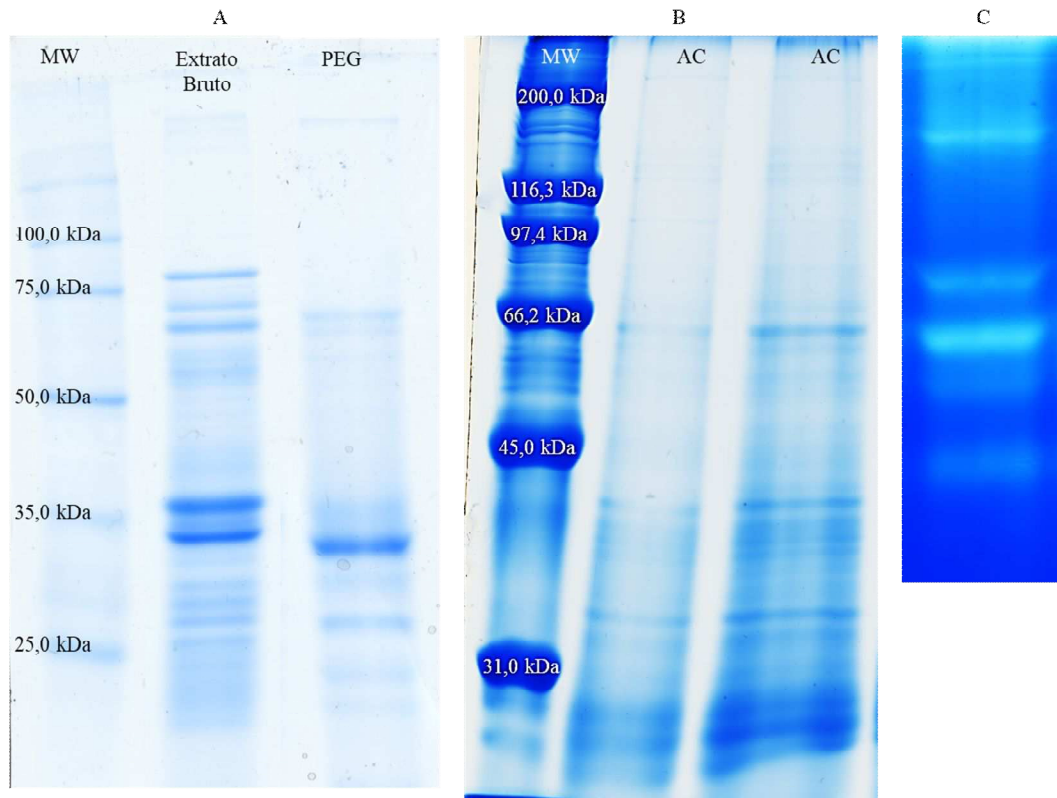


Fig. 9. SDS-PAGE e zimograma das amostras de do intestino de *A. gemmatalis*. As canaletas correspondem a: marcador (Broad Range - Promega), extrato bruto e amostras precipitadas com PEG (A); marcador (Broad Range – BioRad) amostra proveniente da AC nas concentrações de 26 e 52 μ g de proteínas (B) e zimograma do extrato bruto (C).

A análise proteômica do intestino de *A. gemmatalis* resultou na identificação de 173 proteínas, listadas no resultado exportado pelo PEAKS 7 (Material suplementar), das quais 28 foram hidrolases. Dentre estas, apenas 3 representam proteases. As hidrolases do intestino de *A. gemmatalis* identificadas estão listadas na tabela 1. Os espectros foram confrontados com o banco de dados de Lepidoptera pelo programa PEAKS 7. A protease de com número de acesso do NCBI XP_022822939.1 trata-se de uma dipeptidase citosólica pertencente à superfamília zincopetidase-*like*, composta por 526 aminoácidos. A protease com número de acesso no NCBI AWL83214.1 é uma tripsina, com 73 aminoácidos e a protease com número de acesso no NCBI XP_022835671.1 é uma dipeptidase de 540 aminoácidos, pertencente à família das aminopeptidases.

Os picos obtidos do espectrômetro de massas apresentaram boa qualidade. No entanto, os peptídeos identificados tiveram baixa cobertura sobre as proteínas homólogas presentes no banco de dados de Lepidoptera. Nesse caso, um banco específico de *A. gemmatalis* poderia melhorar a identificação das proteínas.

Uma outra possibilidade para o baixo número de proteases identificadas é o fato de a plataforma utilizada não possuir sensibilidade muito elevada. Com isso, apenas os íons mais abundantes foram detectados pelo espectrômetro, enquanto os sinais menos intensos, provenientes dos íons menos abundantes, ficam muito próximos da linha de base e é interpretado como ruído pelo equipamento. Para essa possibilidade, faz-se necessário que o preparo da amostra seja aperfeiçoado a fim de aumentar o montante e o grau de pureza das proteases provenientes do intestino da lagarta da soja.

Tabela 1 – Hidrolases identificadas em intestino de *A. gemmatalis* utilizando o algoritmo PEAKS. As proteases estão indicadas com *.

Número da proteína	Número de acesso	Score da proteína	Cobertura (%)	#Peptídeos	Sequência do(s) peptídeo(s)	Massa média	Descrição
73	NP_001299206.1	127.67	17	4	YAAGFLNEGR IGTIYEGTSNM SIYSFQGISYQIAHLQTELEAAR VDPAVAAYVDIHNTLVNSLFM	46431	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial [<i>Papilio xuthus</i>]
119	KOB78559.1	142.05	22	4	K.VPEANILGEYGK R.KLATEQIAPLVK.K K.LATEQIAPLVK.K VDPAVAAYVDIHNTLVNSLFM	23181	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, partial [<i>Operophtera brumata</i>]
72	BAM18207.1	127.67	17	4	YAAGFLNEGR IGTIYEGTSNM SIYSFQGISYQIAHLQTELEAAR VDPAVAAYVDIHNTLVNSLFM	46431	acyl-coa dehydrogenase [<i>Papilio xuthus</i>]
87	ADD81699.1	124.56	40	3	EVQQKLIDDHFLFK FLQAANAC R.LISM(+15.99)QM(+15.99)GGDLK.Q	10125	arginine kinase, partial [<i>Pieris rapae</i>]

Número da proteína	Número de acesso	Score da proteína	Cobertura (%)	#Peptídeos	Sequência do(s) peptídeo(s)	Massa média	Descrição
122	XP_022814707.1	88.92	4	2	K.ADVDLAVAAAK.K K.LAELIESQAR.Y	52394	aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like [<i>Spodoptera litura</i>]
127	XP_013189379.1	85.41	5	2	K.SGQVVPGYGHAVLR.K K.LPVIAATIYR.N	51920	PREDICTED: probable citrate synthase 2, mitochondrial [<i>Amyelois transitella</i>]
141	KPI92726.1	81.74	5	2	K.ADVDLAVAAAK.K R.EEIFGPVQSIFK.F	48473	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial [<i>Papilio xuthus</i>]
1511	XP_022116408.1	76.18	9	2	R.ILFRPVPDQLPK.I K.IYTILGIDYDER.V	29946	protein l(2)37Cc [<i>Pieris rapae</i>]
174	XP_021199627.1	69.97	3	1	R.FVSNVFPHR.G	37244	inorganic pyrophosphatase [<i>Helicoverpa armigera</i>]
*154	XP_022822939.1	69.68	5	2	K.LVFDYVNKK.W R.YPSLSLHGIEGAAFQPGAK.T	58908	cytosolic non-specific dipeptidase [<i>Spodoptera litura</i>]
164	OWR43337.1	64.83	2	1	K.FETFEEVIDR.A	55301	mitochondrial aldehyde dehydrogenase, partial [<i>Danaus plexippus plexippus</i>]
4194	XP_004925119.1	62.53	3	1	R.IASNFDVLDFK.L	35836	aldose reductase isoform X2 [<i>Bombyx mori</i>]

Número da proteína	Número de acesso	Score da proteína	Cobertura (%)	#Peptídeos	Sequência do(s) peptídeo(s)	Massa média	Descrição
*4196	AWL83214.1	61.75	16	1	R.VSYYSNWIVANA	7669	trypsin 2, partial [<i>Anticarsia gemmatalis</i>]
167	XP_013185082.1	61.12	6	2	R.AHVNYVVTEQGIANLFGK.T R.SDAIPIFLQDIPK.L	51967	PREDICTED: acetyl-CoA hydrolase [<i>Amyelois transitella</i>]
2788	ADF43475.1	54.88	2	1	K.FDYVGELNISNK.I	82369	carboxyl/choline esterase CCE014a [<i>Helicoverpa armigera</i>]
*148	XP_022835671.1	53.06	2	1	K.LIYEAVLAGR.D	60451	xaa-Pro dipeptidase isoform X1 [<i>Spodoptera litura</i>]
4323	KOB73924.1	50.44	4	1	R.LPQELKDTLANK	30667	putative bisphosphate 3'-nucleotidase bpnt1/inositol polyphosphate 1-phosphatase [<i>Operophtera brumata</i>]
4509	AFO83996.1	46.06	6	1	R.DAVLLIFANK.Q	20580	ADP-ribosylation factor, partial [<i>Antheraea yamamai</i>]
165	KOB68143.1	42.01	2	1	K.IGLQVAAVK.A	61152	Heat shock protein 60 [<i>Operophtera brumata</i>]
4993	PCG74391.1	41.42	4	1	K.QFLDYFQPAIR.Y	32369	hypothetical protein B5V51_13383, partial [<i>Heliothis virescens</i>]
3568	KOB74116.1	40.70	3	1	R.YVFLVYK.Q	27889	Phosphatidylethanolamine binding protein [<i>Operophtera brumata</i>]

Número da proteína	Número de acesso	Score da proteína	Cobertura (%)	#Peptídeos	Sequência do(s) peptídeo(s)	Massa média	Descrição
5286	XP_021188830.1	39.78	3	1	K.YGDEFLLK.A	31160	cilia- and flagella-associated protein 161-like [<i>Helicoverpa armigera</i>]
4710	BAJ12015.1	39.04	4	1	R.YLSDKYEYDLTEAR.K	41341	translation elongation factor 2, partial [<i>Samia cynthia walkeri</i>]
4509	AFO83996.1	46.06	6	1	R.DAVLLIFANK.Q	20580	ADP-ribosylation factor, partial [<i>Antheraea yamamai</i>]
1259	BAE48742.1	38.59	2	1	K.ADLVNNLGTIK.S	82385	heat shock protein 90 [<i>Plutella xylostella</i>]
2134	ACL77779.1	38.59	2	1	K.ADLVNNLGTIK.S	82581	heat shock protein 90 [<i>Spodoptera exigua</i>]
3683	XP_022824213.1	38.52	3	1	R.TPTISHITQEQR.D	41607	lachesin [<i>Spodoptera litura</i>]
232	XP_013180155.1	38.20	3	1	K.FEEASHDLC(+57.02)ESLK.I	42521	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [<i>Papilio xuthus</i>]

6. CONCLUSÃO

O comportamento proteolítico do extrato bruto do intestino de *A. gemmatalis* seguiu a cinética de Michaelis-Menten, apresentando parâmetros de $V_{\text{máx app}}$ e $K_M \text{ app}$ semelhantes àqueles encontrados na literatura para o extrato semi-purificado. Houve um aumento nas atividades das proteases na medida em que as lagartas progrediram do terceiro ao quinto instar, o que é consistente visto que no quinto instar a lagarta da soja é mais voraz e, portanto, requer maior digestibilidade. As atividades das proteases foram identificadas indiretamente por meio de inibidores específicos e confirmadas diretamente utilizando substratos específicos. Foi demonstrado pela primeira vez que o perfil de proteases do intestino de *A. gemmatalis* se altera ao longo do seu desenvolvimento, ou seja, de um instar para outro, mostrando a complexidade do perfil proteolítico do intestino desse inseto. No terceiro instar a atividade de cisteíno protease é predominante sobre as demais. No quarto e no quinto instar a atividade proteolítica deve-se majoritariamente às serino proteases. Essa diferença de atividade nos diferentes instares da *A. gemmatalis* sugere que a expressão dos genes que codificam para proteases também se altera ao longo do desenvolvimento do inseto. A estratégia de usar inibidores de serino protease é bem sucedida, uma vez que essas são as principais enzimas proteolíticas de Lepidopteras; entretanto, a presença de outras sub-classes de proteases importantes na digestibilidade do inseto sugere que uma combinação de inibidores de serino e cisteíno protease possa ser promissora. Os resultados de identificação por espectrometria de massas confirmaram que as enzimas ocorrem em baixas concentrações no meio fisiológico, quando comparadas com as demais proteínas do inseto. Uma abordagem metodológica de purificação e enriquecimento de proteases associada a um banco de dados específico para *Anticarsia gemmatalis* pode favorecer a identificação de um número maior de proteases. Este estudo abre possibilidades para o desenvolvimento de inibidores de proteases que atuam mais eficazmente no controle da lagarta da soja.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alghamdi, S. S., Khan, M. A., El-Harty, E. H., Ammar, M. H., Farooq, M., & Migdadi, H. M. (2018). Comparative phytochemical profiling of different soybean (*Glycine max* (L.) Merr) genotypes using GC–MS. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 15-21.

Ali, S., Arash, Z., Jalali, S. J., & Talebi, J. K. (2018). Effects of specific inhibitors on the gene expression of a digestive trypsin in *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Plant Protection Research*.

Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology*, 135(4), 2025-2037.

Barbara, K.A. **Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).** 2014. Disponível em: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm>> Acesso em: 17 de junho de 2018.

Barrett, Alan J. [1] Classification of peptidases. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1994. p. 1-15.

Bel, Y., Sheets, J. J., Tan, S. Y., Narva, K. E., & Escriche, B. (2017). Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis* (*Pseudoplusia*) *includens*. *Applied and environmental microbiology*, 83(11), e00326-17.

Bourguet, D., Genissel, A., & Raymond, M. (2000). Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of economic entomology*, 93(6), 1588-1595.

Bortoli, S.A.; Murata, A.T.; De Bortali, C.P. Magalhães, G.O.; Dibelli, W. Aspectos nutricionais e preferência da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818

(Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja com e sem injúria. **Com. Scie.**, 2: 149-155. 2011.

Brahman, S. K., Awasthi, A. K., & Singh, S. (2018). Studies on insect-pests of soybean (*Glycine max*) with special reference to seasonal incidence of lepidopteran defoliators. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 1808-1811.

Chandra, G. S., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., & Kumar, N. K. (2018). Double-Stranded RNA-Mediated Suppression of Trypsin-Like Serine Protease (t-SP) Triggers Over-Expression of Another t-SP Isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(2), 746-761.

Compton, D. R., & Martin, B. R. (1997). The effect of the enzyme inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride on the pharmacological effect of anandamide in the mouse model of cannabimimetic activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), 1138-1143. de Freitas, M. M., de Souza, B. H. S., Nogueira, L., Di Bello, M. M., & Júnior, A. L. B. (2018). Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position. *Arthropod-Plant Interactions*, 12(1), 85-96.

Dillon, F. M., Tejedor, M. D., Ilina, N., Chludil, H. D., Mithöfer, A., Pagano, E. A., & Zavala, J. A. (2018). Solar UV-B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in field-grown soybean. *Plant, cell & environment*, 41(2), 383-394.

Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7713-7716.

Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology*, 53(1), 275-297.

Fiaz, M., Martínez, L. C., da Silva Costa, M., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., & Serrão, J. E. (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 1-8.

Frydrych, I., & Mlejnek, P. (2008). Serine protease inhibitors N- α -Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone (TLCK) and N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases. *Journal of cellular biochemistry*, 103(5), 1646-1656.

Fugi, C. G. Q., Lourenção, A. L., & Parra, J. R. P. (2005). Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*, 62(1), 31-35.

Graça, J. P., Ueda, T. E., Janegitz, T., Vieira, S. S., Salvador, M. C., de Oliveira, M. C., & Hoffmann-Campo, C. B. (2016). The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug, *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*. *Phytochemistry*, 131, 84-91.

Grammer, Timothy C.; Blenis, John. The serine protease inhibitors, tosylphenylalanine chloromethyl ketone and tosyllysine chloromethyl ketone, potently inhibit pp70s6k activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23650-23652, 1996.

Griscavage, Jeanette M.; Wilk, Sherwin; Ignarro, Louis J. Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 215, n. 2, p. 721-729, 1995.

Grover, S., Kaur, S., Gupta, A. K., Taggar, G. K., & Kaur, J. (2018). Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and its potential

inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(1), 49-56.

Grozdanović, M. M., Drakulić, B. J., & Gavrović-Jankulović, M. (2013). Conformational mobility of active and E-64-inhibited actinidin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(10), 4790-4799.

Habib, H., & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(3), 68-85.

Hacisalihoglu, G., Gustin, J. L., Louisma, J., Armstrong, P., Peter, G. F., Walker, A. R., & Settles, A. M. (2016). Enhanced single seed trait predictions in soybean (*Glycine max*) and robust calibration model transfer with near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 1079-1086.

Hagedorn, H. H., & Kaltenbach, J. C. (2018). Effects of Nutrition on Metamorphosis. In *Handbook of Nutritional Requirements in a Functional Context* (pp. 81-96). CRC Press.

Hirakuri, M. H., & Lazzarotto, J. J. (2014). O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. *Londrina: Embrapa Soja*, 9-15.

Huang, D., Kong, J., & Seng, Y. (2012). Effects of the heavy metal Cu²⁺ on growth, development, and population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*, 105(1), 288-294.

Hungria, M., Mendes, I. C., Nakatani, A. S., Dos Reis-Junior, F. B., Morais, J. Z., De Oliveira, M. C. N., & Fernandes, M. F. Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. *Field Crops Research*, v.158, p.43-54., 2014.

James, C. (2015). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. *ISAAA brief*, 49.

Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Peters, J., Bosch, D., & Stiekema, W. J. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 8041-8045.

Jongsma, M. A., & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43(10), 885-895.

Josephraj Kumar, A., Chakrabarty, R., & Thomas, G. (2006). Midgut proteases of the cardamom shoot and capsule borer *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and their interaction with aprotinin. *Bulletin of entomological research*, 96(1), 91-98.

Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., ... & Zilberstein, A. (1996). Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(4), 365-373.

King, Malcolm A.; Halicka, Dorota; Darzynkiewicz, Zbigniew. Pro-and anti-apoptotic effects of an inhibitor of chymotrypsin-like serine proteases. *Cell Cycle*, v. 3, n. 12, p. 1566-1571, 2004.

Kipgen, Lunminlal; Aggarwal, Kamal K. Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 34, n. 3, p. 172-178, 2014.

Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2(10), 379-384.

Kourteva, Iordanka; Sleight, Robert W.; Hjertén, Stellan. Assay for enzyme inhibition: detection of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 2, p. 345-349, 1987.

- Krinski, D., Foerster, L. A., & Deschamps, C. (2018). Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian Piper species: controlling *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 40.
- Kristensen, N. P. (1999). Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *European Journal of Entomology*, 96, 237-254.
- Lawrence, P. K., & Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(1), 5-6.
- Leo, F. D., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., & Ceci, L. R. (2002). PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic acids research*, 30(1), 347-348.
- Li, Z. F., Guo, Y., Ou, L., Hong, H., Wang, J., Liu, Z. X., ... & Qiu, L. (2018). Identification of the dwarf gene GmDW1 in soybean (*Glycine max* L.) by combining mapping-by-sequencing and linkage analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(5), 1001-1016.
- Liu, J., Sharma, A., Niewiara, M. J., Singh, R., Ming, R., & Yu, Q. (2018). Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion. *BMC genomics*, 19(1), 26.
- Lomate, P. R., Dewangan, V., Mahajan, N., Kumar, Y., Kulkarni, A., Wang, L., ... & Giri, A. P. (2018). Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-RA117.
- Lopes, A. R., Juliano, M. A., Marana, S. R., Juliano, L., & Terra, W. R. (2006). Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(2), 130-140.

Lu, G., Di, S., & Xueping, Z. (2011). Analysis on the current pollution situation of Cu, Pb and Zn in the cultivated black soil of songnen plain. *Chin. Agric. Sci. Bull*, 27(6), 261-265.

Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., & Lajoie, G. (2003). PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 17(20), 2337-2342.

Magrini, E. A., Botelho, P. S. M., & Silveira Neto, S. (1999). Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. *Scientia agricola*, 56(3), 547-555.

Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2015). Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotisca neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Science*, 15(1).

Melan, M.A.; Dong, X.; Endara, M.E.; Davis, K.R.; Ausubel, F.M.; Petterman, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 101:441-450, 1993.

Meriño-Cabrera, Y., Zanuncio, J. C., da Silva, R. S., Solis-Vargas, M., Cordeiro, G., Rainha, F. R., ... & de Almeida Oliveira, M. G. (2018). Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. *Annals of Applied Biology*, 172(2), 236-243.

Milano, P. (2008). *Influência da nutrição e temperatura na reprodução de representantes de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Moscardi, F., Bueno, A. F., Sosa-Gómez, D. R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C. B., Pomari, A. F., ... & Yano, S. A. C. (2012). Artrópodes que atacam as folhas da soja. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, cap, 4, 859.

Musser, R. O., Hum-Musser, S. M., Eichenseer, H., Peiffer, M., Ervin, G., Murphy, J. B., & Felton, G. W. (2002). Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature*, *416*(6881), 599.

Massarolli, A., Hoffmann, A. R. L., Favetti, B. M., & Butnariu, A. R. (2018). Ichneumonids (Hymenoptera) and Tachinid Flies (Diptera) Associated to Lepidopterans in Soybean Crops. *Journal of Agricultural Science*, *10*(7), 167.

Nicholson, G. M. (2007). Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, *49*(4), 413-422.

Oliveira, M. G. A., De Simone, S. G., Xavier, L. P., & Guedes, R. N. C. (2005). Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *140*(3), 369-380.

Paixão, G. P., Lourenção, A. L., Silva, C. R., Mendonça, E. G., Silva, P. L., Oliveira, J. A., ... & Oliveira, M. G. A. (2013). Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(34), 8034-8038.

Pilon, F. M., Visôto, L. E., Guedes, R. N. C., & Oliveira, M. G. A. (2013). Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Comparative Physiology B*, *183*(6), 735-747.

Pilon, F. M., Silva, C. D. R., Visôto, L. E., Barros, R. D. A., da Silva Júnior, N. R., Campos, W. G., & de Almeida Oliveira, M. G. (2017). Purification and characterization of trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatalis*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, *96*(2), e21407.

Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2001). Complexity in specificities and expression of

Helicoverpa armigera gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4-5), 453-464.

Patarroyo-Vargas, A. M., Merino-Cabrera, Y. B., Zanuncio, J. C., Rocha, F., Campos, W. G., de Almeida, O., & Maria, G. (2017). Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. *Protein and peptide letters*, 24(11), 1040-1047.

Porter, William H.; Cunningham, Leon W.; Mitchell, William M. Studies On The Active Site Of Clostripain The Specific Inactivation By The Chloromethyl Ketone Derived From A-N-Tosyl-L-Lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 24, p. 7675-7682, 1971.

Reymond, P. (2013). Perception, signaling and molecular basis of oviposition-mediated plant responses. *Planta*, 238(2), 247-258.

Regode, V., Kuruba, S., Mohammad, A. S., & Sharma, H. C. (2016). Isolation and characterization of gut bacterial proteases involved in inducing pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1567.

Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual review of phytopathology*, 28(1), 425-449.

Sanches, M. M., Sihler, W., GOMES, A., Benito, N. P., Sosa-Gómez, D. R., Silva, C. E. P., ... & De SOUZA, M. L. (2018). Avaliação de co-infecção de *Anticarsia gemmatalis* MNPV e *Chrysodeixis includens* NPV em cultura de células de inseto. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.

Santos, L. S. D. (2018). Flutuação populacional, distribuição espacial e plano de amostragem sequencial de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)(Lepidoptera: Erebidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858)(Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes cultivares de soja.

Sarmiento, R. A., Lemos, F., Bleeker, P. M., Schuurink, R. C., Pallini, A., Oliveira, M. G. A., ... & Janssen, A. (2011). A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology letters*, 14(3), 229-236.

Sediyama, T., Silva, F., & Borém, A. (2015). Soja: do plantio à colheita. *Viçosa: UFV*.

Sharma, V., Panwar, P., O'Donoghue, A. J., Cui, H., Guido, R. V., Craik, C. S., & Brömme, D. (2015). Structural requirements for the collagenase and elastase activity of cathepsin K and its selective inhibition by an exosite inhibitor. *Biochemical Journal*, 465(1), 163-173.

Senthil-Nathan, S. (2018). Effect of methyl jasmonate (MeJA)-induced defenses in rice against the rice leaf-folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)(Lepidoptera: Pyralidae). *Pest management science*.

Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN microbiology*, 2014.

Shinde, A. A., Shaikh, F. K., Gadge, P. P., Padul, M. V., Govindwar, S. P., & Kachole, M. S. (2017). Conserved nature of *Helicoverpa armigera* gut bacterial flora on different host plants and in vitro interactions with PI proteins advocates role in host digestive physiology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.

Shivaji, R., Camas, A., Ankala, A., Engelberth, J., Tumlinson, J. H., Williams, W. P., ... & Luthe, D. S. (2010). Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. *Journal of chemical ecology*, 36(2), 179-191.

Shaw, Elliott; Mares-Guia, Marcos; Cohen, William. Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from N α -tosyl-L-lysine. **Biochemistry**, v. 4, n. 10, p. 2219-2224, 1965.

Stefanis, L., Troy, C. M., Qi, H., & Greene, L. A. (1997). Inhibitors of trypsin-like serine proteases inhibit processing of the caspase Nedd-2 and protect PC12 cells and sympathetic neurons from death evoked by withdrawal of trophic support. *Journal of neurochemistry*, 69(4), 1425-1437.

Tanabe, F., Nakajima, T., & Ito, M. (2013). The thiol proteinase inhibitor E-64-d ameliorates amyloid- β -induced reduction of sAPP α secretion by reversing ceramide-induced protein kinase C down-regulation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 441(1), 256-261.

Tian, D., Peiffer, M., Shoemaker, E., Tooker, J., Haubruge, E., Francis, F., ... & Felton, G. W. (2012). Salivary glucose oxidase from caterpillars mediates the induction of rapid and delayed-induced defenses in the tomato plant. *PLoS One*, 7(4), e36168.

Trenholme, K., Marek, L., Duffy, S., Pradel, G., Fisher, G., Hansen, F. K., ... & Goodman, C. D. (2014). Lysine acetylation in sexual stage malaria parasites is a target for antimalarial small molecules. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-02721.

Tuelher, E. S., da Silva, É. H., Rodrigues, H. S., Hirose, E., Guedes, R. N. C., & Oliveira, E. E. (2018). Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science*, 91(2), 849-859.

Vianna, U.R.; Pratissoli, D.; Zanoncio, J.C.; Alencar, J.R.C.C.; Zinger, F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arq. Inst. Biol.**, 78: 81-87. 2011.

Visôto, L. E., Oliveira, M. G. A., Guedes, R. N. C., Ribon, A. O. B., & Good-God, P. I. V. (2009). Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of Insect Physiology*, *55*(3), 185-191.

Wang, D., & Zhang, S. (2018). Advances in pest-resistant varieties of soybean. In *Achieving sustainable cultivation of soybeans Volume 2* (pp. 161-190). Burleigh Dodds Science Publishing.

Wheeler, D. E., Tuchinskaya, I., Buck, N. A., & Tabashnik, B. E. (2000). Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology*, *46*(6), 951-958.

Yang, R., Song, J., Gu, Z., & Li, C. (2011). Partial purification and characterisation of cysteine protease in wheat germ. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(13), 2437-2442.

Zan, S. T., Yang, R. Y., & Wang, W. W. (2011). The correlation of soil physicochemical properties and copper-zinc accumulation of *Elsholtzia splendens*. *J. Biol*, *28*, 46-49.

Zanuncio, J. C., Mourão, S. A., Martínez, L. C., Wilcken, C. F., Ramalho, F. S., Plata-Rueda, A., Serrão, J. E. (2016). Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific reports*, *6*, 30261.

Zavala, J. A., Patankar, A. G., Gase, K., Hui, D., & Baldwin, I. T. (2004). Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiology*, *134*(3), 1181-1190.

Zhu, F., Jiang, T., Wu, B., & He, B. (2018). Enhancement of Z-aspartame synthesis by rational engineering of metalloprotease. *Food chemistry*, *253*, 30-36.

Zibae, A., Bandani, A. R., Fazeli-Dinan, M., Zibae, I., Sendi, J. J., & Maleki, F. A. (2011). A trypsin-like protease in rice green semi-looper, *Naranga aenescens moore* (Lepidoptera: Noctuidae): purification and characterization. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 78(1), 1-16.

8. APÊNDICE

Protein List

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
17	119	KOB78559.1	142.05	22	4	1	Y	23181	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, partial [Operophtera brumata]
29	71	KPJ03758.1	127.67	17	4	1	Y	46408	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial [Papilio xuthus]
29	72	BAM18207.1	127.67	17	4	1	Y	46431	acyl-coa dehydrogenase [Papilio xuthus]
29	73	NP_001299206.1	127.67	17	4	1	Y	46431	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial [Papilio xuthus]
11	87	ADD81699.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	88	ADD81714.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	89	ADD81701.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	90	ADD81711.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	91	ADD81704.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	92	ADD81708.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	93	ADD81693.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	94	ADD81718.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	95	ADD81716.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	96	ADD81705.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	97	ADD81707.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	98	ADD81691.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	99	ADD81713.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	100	ADD81702.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	101	ADD81694.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	102	ADD81712.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	103	ADD81703.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	104	ADD81709.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	105	ADD81697.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	106	ADD81698.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	107	ADD81690.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	108	ADD81700.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	109	ADD81715.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	110	ADD81719.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	111	ADD81689.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	112	ADD81695.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	113	ADD81720.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	114	ADD81692.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	115	ADD81717.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
11	116	ADD81706.1	124.56	40	3	1	Y	10125	arginine kinase, partial [Pieris rapae]
66	122	XP_022814707.1	88.92	4	2	1	N	52394	aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like [Spodoptera litura]
24	127	XP_013189379.1	85.41	5	2	2	N	51920	PREDICTED: probable citrate synthase 2, mitochondrial [Amyelois transitella]
24	128	XP_022832422.1	85.41	5	2	2	N	51668	probable citrate synthase 2, mitochondrial [Spodoptera litura]
241	141	KPI92726.1	81.74	5	2	1	N	48473	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial [Papilio xuthus]
241	142	XP_014363626.1	81.74	5	2	1	N	52698	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like isoform X1 [Papilio machaon]
241	143	XP_013178893.1	81.74	5	2	1	N	52711	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like [Papilio xuthus]
241	144	XP_014363627.1	81.74	5	2	1	N	52698	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like isoform X2 [Papilio machaon]
241	145	KPJ11230.1	81.74	4	2	1	N	58768	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial [Papilio machaon]
593	125	XP_013200467.1	76.18	9	2	2	N	29990	PREDICTED: protein I(2)37Cc [Amyelois transitella]
593	1511	XP_022116408.1	76.18	9	2	2	N	29946	protein I(2)37Cc [Pieris rapae]
242	174	XP_021199627.1	69.97	3	1	1	N	37244	inorganic pyrophosphatase [Helicoverpa armigera]
120	140	XP_013167126.1	69.68	5	2	2	N	58361	PREDICTED: cytosolic non-specific dipeptidase [Papilio xuthus]
120	146	KPI93311.1	69.68	6	2	2	N	53621	Cytosolic non-specific dipeptidase [Papilio xuthus]
120	154	XP_022822939.1	69.68	5	2	2	N	58908	cytosolic non-specific dipeptidase [Spodoptera litura]
1437	164	QWR43337.1	64.83	2	1	1	N	55301	mitochondrial aldehyde dehydrogenase, partial [Danaus plexippus plexippus]
1437	4191	XP_023936166.1	64.83	2	1	1	N	52257	aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like isoform X2 [Bicyclus anynana]
1437	4192	XP_023936158.1	64.83	2	1	1	N	52899	aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial-like isoform X1 [Bicyclus anynana]
1903	4194	XP_004925119.1	62.53	3	1	1	N	35836	aldose reductase isoform X2 [Bombyx mori]
1903	4195	XP_004925118.1	62.53	3	1	1	N	35843	aldose reductase isoform X1 [Bombyx mori]
133	4196	AWL83214.1	61.75	16	1	1	N	7669	trypsin 2, partial [Anticarsia gemmatalis]
131	167	XP_013185082.1	61.12	6	2	1	N	51967	PREDICTED: acetyl-CoA hydrolase [Amyelois transitella]
1599	2784	XP_021199578.1	54.88	2	1	1	N	80524	juvenile hormone esterase-like isoform X3 [Helicoverpa armigera]
1599	2788	ADF43475.1	54.88	2	1	1	N	82369	carboxyl/choline esterase CCE014a [Helicoverpa armigera]
1599	2789	XP_021199577.1	54.88	2	1	1	N	82488	juvenile hormone esterase-like isoform X2 [Helicoverpa armigera]
1599	2818	XP_021199576.1	54.88	1	1	1	N	93120	juvenile hormone esterase-like isoform X1 [Helicoverpa armigera]
501	148	XP_022835671.1	53.06	2	1	1	N	60451	xaa-Pro dipeptidase isoform X1 [Spodoptera litura]
501	153	XP_021201484.1	53.06	2	1	1	N	53296	xaa-Pro dipeptidase isoform X3 [Helicoverpa armigera]
501	155	XP_021201483.1	53.06	2	1	1	N	58489	xaa-Pro dipeptidase isoform X2 [Helicoverpa armigera]
501	156	XP_021201482.1	53.06	2	1	1	N	60377	xaa-Pro dipeptidase isoform X1 [Helicoverpa armigera]
501	172	XP_022835673.1	53.06	2	1	1	N	53024	xaa-Pro dipeptidase isoform X2 [Spodoptera litura]
501	173	XP_022835672.1	53.06	2	1	1	N	53024	xaa-Pro dipeptidase isoform X2 [Spodoptera litura]
501	3434	PCG76152.1	53.06	2	1	1	N	53259	hypothetical protein B5V51_10219 [Heliopsis virescens]

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
501	3435	PCG76149.1	53.06	2	1	1	N	53259	hypothetical protein B5V51_10219 [Heliothis virescens]
501	3436	PCG76150.1	53.06	2	1	1	N	53259	hypothetical protein B5V51_10219 [Heliothis virescens]
501	3470	PCG76151.1	53.06	2	1	1	N	60226	hypothetical protein B5V51_10219 [Heliothis virescens]
501	4204	BAM19953.1	53.06	5	1	1	N	22709	dipeptidase C, partial [Papilio xuthus]
501	4207	XP_013173015.1	53.06	2	1	1	N	53102	PREDICTED: xaa-Pro dipeptidase [Papilio xuthus]
501	4208	KPI92504.1	53.06	2	1	1	N	53088	Xaa-Pro dipeptidase [Papilio xuthus]
594	311	XP_013183386.1	50.44	4	1	1	N	33514	PREDICTED: 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 isoform X2 [Amyelois transitella]
594	313	XP_013183377.1	50.44	3	1	1	N	37881	PREDICTED: 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 isoform X1 [Amyelois transitella]
594	4323	KOB73924.1	50.44	4	1	1	N	30667	putative bisphosphate 3'-nucleotidase bpn1/inositol polyphosphate 1-phosphatase [Operophtera brumata]
1764	3167	KOB73737.1	46.06	3	1	1	N	41132	putative sugar transporter, partial [Operophtera brumata]
1764	4508	XP_013194537.1	46.06	10	1	1	N	11263	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 1-like, partial [Amyelois transitella]
1764	4509	AFO83996.1	46.06	6	1	1	N	20580	ADP-ribosylation factor, partial [Antheraea yamamai]
1764	4510	XP_023946922.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Bicyclus anynana]
1764	4511	BAM17886.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP ribosylation factor [Papilio xuthus]
1764	4512	XP_022837981.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Spodoptera litura]
1764	4513	AET74048.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor [Spodoptera exigua]
1764	4514	XP_022113851.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Pieris rapae]
1764	4515	KPI94406.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Papilio xuthus]
1764	4516	NP_001091755.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor [Bombyx mori]
1764	4517	NP_001299081.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Papilio xuthus]
1764	4518	KPI08457.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Papilio machaon]
1764	4519	XP_022837979.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Spodoptera litura]
1764	4520	QWR41595.1	46.06	5	1	1	N	20766	ADP-ribosylation factor [Danaus plexippus plexippus]
1764	4521	BAM19142.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP ribosylation factor [Papilio polytes]
1764	4522	ABD36090.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor [Bombyx mori]
1764	4523	XP_011565457.1	46.06	5	1	1	N	20736	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 1 [Plutella xylostella]
1764	4524	XP_021189830.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Helicoverpa armigera]
1764	4525	XP_022837980.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Spodoptera litura]
1764	4526	JAT90539.1	46.06	5	1	1	N	20736	hypothetical protein g.6244 [Pectinophora gossypiella]
1764	4527	JAA89117.1	46.06	5	1	1	N	20736	ADP-ribosylation factor 1 [Pararge aegeria]
1764	4528	XP_014367400.1	46.06	5	1	1	N	20736	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 1 [Papilio machaon]
1764	4529	XP_013145319.1	46.06	4	1	1	N	28489	PREDICTED: ADP-ribosylation factor 1 [Papilio polytes]
1190	165	KOB68143.1	42.01	2	1	1	N	61152	Heat shock protein 60 [Operophtera brumata]
1190	3610	XP_022116233.1	42.01	2	1	1	N	62411	63 kDa chaperonin, mitochondrial-like [Pieris rapae]
1767	4993	PCG74391.1	41.42	4	1	1	N	32369	hypothetical protein B5V51_13383, partial [Heliothis virescens]
240	3568	KOB74116.1	40.70	3	1	1	N	27889	Phosphatidylethanolamine binding protein isoform 2 [Operophtera brumata]
245	5286	XP_021188830.1	39.78	3	1	1	N	31160	cilia- and flagella-associated protein 161-like [Helicoverpa armigera]
245	5287	PCG77638.1	39.78	3	1	1	N	31277	hypothetical protein B5V51_6772 [Heliothis virescens]
630	4710	BAJ12015.1	39.04	4	1	1	N	41341	translation elongation factor 2, partial [Samia cynthia walkeri]
1324	1259	BAE48742.1	38.59	2	1	1	N	82385	heat shock protein 90 [Plutella xylostella]
1324	1778	ABY55234.1	38.59	2	1	1	N	80892	Hsp90 [Mythimna separata]
1324	2028	BAF03554.1	38.59	2	1	1	N	82506	heat shock protein 90 [Mamestra brassicae]
1324	2065	BAM17884.1	38.59	2	1	1	N	72184	heat shock protein 83 [Papilio xuthus]
1324	2120	ADA61011.1	38.59	2	1	1	N	81567	90 kDa heat shock protein [Thitarodes pui]
1324	2124	ABM89112.1	38.59	2	1	1	N	82337	heat shock protein 90 [Dendrolimus superans]
1324	2125	ABM89111.1	38.59	2	1	1	N	82291	heat shock protein 90 [Dendrolimus tabulaeformis]
1324	2126	ABN09626.1	38.59	2	1	1	N	82161	heat shock protein 90 [Dendrolimus punctatus x Dendrolimus tabulaeformis]
1324	2127	ABN09628.1	38.59	2	1	1	N	82333	heat shock protein 90 [Dendrolimus tabulaeformis x Dendrolimus punctatus]
1324	2130	ABP93404.1	38.59	2	1	1	N	82555	heat shock protein 90 [Omphisca fuscidentalis]
1324	2131	ABM90804.1	38.59	2	1	1	N	82447	heat shock protein 90 [Dendrolimus punctatus]
1324	2134	ACL77779.1	38.59	2	1	1	N	82581	heat shock protein 90 [Spodoptera exigua]
1324	2135	ADK55516.1	38.59	2	1	1	N	82614	heat shock protein 90 [Spodoptera litura]
1324	2136	ADD91573.1	38.59	2	1	1	N	82473	heat shock protein 90 [Antheraea pernyi]
1324	2137	BAE44307.1	38.59	2	1	1	N	82472	heat shock protein 90 [Chilo suppressalis]
1324	2138	ADP37710.1	38.59	2	1	1	N	82509	heat shock protein 90 [Helicoverpa armigera]
1324	2139	ADM66139.1	38.59	2	1	1	N	82640	90 kDa heat shock protein [Spodoptera litura]
1324	2140	BAM19042.1	38.59	2	1	1	N	82486	heat shock protein 83 [Papilio polytes]
1324	2141	ACV32639.1	38.59	2	1	1	N	82589	heat shock protein 90 [Helicoverpa zea]
1324	2378	BAD15163.1	38.59	2	1	1	N	82307	heat shock protein [Antheraea yamamai]
1324	2429	ABW87791.1	38.59	2	1	1	N	82650	heat shock protein 90 [Loxostege sticticalis]
1324	4754	AFQ40691.1	38.59	5	1	1	N	25535	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius numata]
1324	4834	ABA54273.2	38.59	2	1	1	N	82607	90 kDa heat shock protein 83 [Sesamia nonagrioides]
1324	5997	AFQ40695.1	38.59	6	1	1	N	23466	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	5998	AFQ40694.1	38.59	6	1	1	N	23466	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	5999	AFQ40696.1	38.59	5	1	1	N	27678	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	6000	AFQ40697.1	38.59	5	1	1	N	27678	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	6001	AFQ40698.1	38.59	5	1	1	N	28320	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	6002	AFQ40692.1	38.59	5	1	1	N	28520	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	6003	AFQ40693.1	38.59	5	1	1	N	28520	heat shock protein 90kDa, partial [Heliconius heurippa]
1324	6004	ADJ67098.1	38.59	4	1	1	N	38244	heat shock protein, partial [Heliconius melpomene melpomene]

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
1765	3683	XP_022824213.1	38.52	3	1	1	N	41607	lachesin [Spodoptera litura]
1765	3891	XP_023940529.1	38.52	4	1	1	N	39000	lachesin isoform X2 [Bicyclus anynana]
1765	4861	XP_021198817.1	38.52	5	1	1	N	32202	lachesin-like, partial [Helicoverpa armigera]
1765	4862	XP_021198390.1	38.52	4	1	1	N	39564	lachesin [Helicoverpa armigera]
1765	4863	KPI19653.1	38.52	4	1	1	N	39603	Lachesin [Papilio machaon]
1765	4864	XP_011562037.1	38.52	4	1	1	N	40360	PREDICTED: lachesin-like isoform X3 [Plutella xylostella]
1765	4865	JAA89294.1	38.52	4	1	1	N	40959	lachesin precursor [Pararge aegeria]
1765	4866	XP_023940528.1	38.52	4	1	1	N	41029	lachesin isoform X1 [Bicyclus anynana]
1765	4867	XP_011565506.1	38.52	4	1	1	N	40658	PREDICTED: lachesin-like isoform X2 [Plutella xylostella]
1765	4868	XP_021206740.1	38.52	4	1	1	N	41426	lachesin isoform X2 [Bombyx mori]
1765	4869	XP_014365035.1	38.52	4	1	1	N	41289	PREDICTED: lachesin isoform X2 [Papilio machaon]
1765	4870	XP_011565498.1	38.52	4	1	1	N	40658	PREDICTED: lachesin-like isoform X1 [Plutella xylostella]
1765	4871	XP_011562024.1	38.52	4	1	1	N	40658	PREDICTED: lachesin-like isoform X1 [Plutella xylostella]
1765	4872	XP_013176346.1	38.52	4	1	1	N	41171	PREDICTED: lachesin-like [Papilio xuthus]
1765	4873	XP_011562032.1	38.52	4	1	1	N	40658	PREDICTED: lachesin-like isoform X2 [Plutella xylostella]
1765	4874	XP_013185405.1	38.52	4	1	1	N	41085	PREDICTED: lachesin [Amyelois transitella]
1765	4875	XP_014365026.1	38.52	4	1	1	N	40844	PREDICTED: lachesin isoform X1 [Papilio machaon]
1765	4876	XP_004930766.1	38.52	4	1	1	N	41237	lachesin isoform X1 [Bombyx mori]
1765	4877	XP_013146661.1	38.52	4	1	1	N	40692	PREDICTED: lachesin-like [Papilio polytes]
1765	4878	PCG69972.1	38.52	3	1	1	N	41909	hypothetical protein B5V51_3491 [Heliothis virescens]
1765	4879	XP_022125631.1	38.52	3	1	1	N	42184	lachesin [Pieris rapae]
1765	4880	KPI96252.1	38.52	3	1	1	N	44299	Lachesin [Papilio xuthus]
557	232	XP_013180155.1	38.20	3	1	1	Y	42521	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [Papilio xuthus]
557	233	KPI92838.1	38.20	3	1	1	Y	46684	Hsc70-interacting protein [Papilio xuthus]
557	3847	KPI11127.1	38.20	3	1	1	Y	42177	Hsc70-interacting protein [Papilio machaon]
557	3848	XP_014363415.1	38.20	3	1	1	Y	42177	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [Papilio machaon]
557	3849	XP_013136878.1	38.20	3	1	1	Y	42354	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [Papilio polytes]
557	3886	XP_021183598.1	38.20	3	1	1	Y	44130	hsc70-interacting protein-like [Helicoverpa armigera]
557	3979	PCG77599.1	38.20	2	1	1	Y	57679	hypothetical protein B5V51_6886 [Heliothis virescens]
557	4801	JAA80136.1	38.20	4	1	1	Y	32841	Hsc70-interacting protein 1, partial [Pararge aegeria]
557	4802	XP_013196827.1	38.20	3	1	1	Y	41812	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [Amyelois transitella]
557	4803	XP_013196826.1	38.20	3	1	1	Y	41812	PREDICTED: hsc70-interacting protein-like [Amyelois transitella]
557	4804	XP_022814824.1	38.20	3	1	1	Y	44873	hsc70-interacting protein-like [Spodoptera litura]
1498	3086	PCG70188.1	37.33	0	1	1	N	200577	hypothetical protein B5V51_3269 [Heliothis virescens]
1468	2375	XP_022126074.1	36.96	3	1	1	N	46808	protein disulfide-isomerase A6 homolog [Pieris rapae]
1468	3329	XP_004932411.1	36.96	3	1	1	N	46451	protein disulfide-isomerase A6 homolog [Bombyx mori]
1468	5389	XP_013188709.1	36.96	3	1	1	N	46352	PREDICTED: protein disulfide-isomerase A6 [Amyelois transitella]
total 173 proteins									