

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**RAFAEL DE ALMEIDA BARROS**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CISTEÍNO-PROTEASES  
DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2016**

**RAFAEL DE ALMEIDA BARROS**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CISTEÍNO-PROTEASES  
DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

**Orientador(a): Maria Goreti de Almeida Oliveira**

**Coorientador(a): Manuel Antonio Solís Vargas**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2016**

**RAFAEL DE ALMEIDA BARROS**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CISTEÍNO-PROTEASES  
DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

APROVADO: 03 de novembro de 2016..

---

Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(orientadora)  
(UFV)

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	3
2.1. Criação da lagarta da soja .....	3
2.2. Preparo da dieta .....	3
2.3. Obtenção do extrato enzimático bruto .....	4
2.4. Avaliação da atividade enzimática de cisteíno-proteases .....	4
2.5. Precipitação diferencial com Sulfato de Amônio [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] .....	4
2.6. Coluna de afinidade Aprotinina-agarose para Serino-proteases .....	4
2.7. Eletroforese .....	5
2.8. Efeito do pH e Temperatura .....	5
2.9. Efeito das concentrações de íons Cálcio .....	5
2.10. Determinação de parâmetros cinéticos .....	5
2.11. Efeito de modificadores químicos .....	6
2.12. Análise Estatística .....	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	7
3.1. Purificação parcial de cisteíno-proteases de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	7
3.2. Efeito do pH sobre a atividade enzimática .....	8
3.3. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática .....	9
3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos .....	10
3.5. Cisteíno-proteases parcialmente purificadas de <i>A. gemmatalis</i> são cálcio- dependentes .....	12
3.6. Efeito de modificadores químicos .....	13
3.6.1. Efeito da Pepstatina A .....	13
3.6.2. Efeito de inibidores de serino-proteases .....	14
4. CONCLUSÃO .....	15
5. REFERÊNCIAS .....	16

## RESUMO

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

A cultura da soja está sujeita ao ataque de diferentes espécies de insetos. O uso de bioinseticidas afeta o desenvolvimento de insetos, controlando seu número na lavoura sem afetar o meio ambiente e o homem. Os inibidores de proteases destacam-se como uma ferramenta para minimizar o ataque de pragas à cultura. O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquímico e cineticamente cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino-médio de *Anticarsia gemmatalis* e prover informações para o ajuste do uso de inibidores de proteases no controle desta praga. Para a obtenção do extrato enzimático foram rompidos cinco intestinos de *Anticarsia gemmatalis* no 5º instar. Posteriormente, cisteíno-proteases do intestino médio de foram parcialmente purificadas utilizando-se precipitação diferencial com 30 – 60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e cromatografia de afinidade com coluna de aprotinina-agarose. Todas as proteínas que apresentaram atividade proteolítica, com exceção das serino-proteases, que ficaram retidas à coluna, foram reunidas em um pool enzimático e caracterizadas utilizando o substrato sintético L-BApNA na presença do inibidor de serino-proteases benzamidina. Para aumentar a purificação do extrato, uma nova etapa de purificação utilizando-se uma coluna de Thiol-sepharose, específica para cisteíno-proteases, foi testada. No entanto, não se obteve frações proteicas com atividade enzimática após essa etapa. A caracterização prosseguiu então utilizando o pool enzimático obtido com a coluna de aprotinina-agarose. Avaliando o efeito do pH sobre a atividade enzimática, foram observados três picos de atividade, sendo o pH 8,0 o de maior atividade. Com relação aos efeitos da temperatura, foram observados dois picos menores a 20°C e entre 35 – 45°C, e o pico de maior atividade foi entre 55-60°C. O  $K_M$  app obtido foi de 0,74 mM e a  $V_{\text{maxapp}}$  foi 0,8  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ . Em maiores concentrações de cálcio as cisteíno-proteases parcialmente purificadas apresentaram melhor desempenho, tendo a melhor atividade em 30mM, podendo desta forma serem consideradas cálcio-dependentes. Nos ensaios de inibição foram testados EDTA (inibidor de metalo-proteases), Pepstatina A (inibidor de aspartil-proteases), Aprotinina e TLCK (ambos inibidores de serino-proteases). Apenas o ensaio com EDTA apresentou resultado significativo, afirmando que as enzimas são cálcio-dependentes. Pepstatina A, Aprotinina e TLCK não apresentaram efeito significativo sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. A presença do inibidor de serino-proteases benzamidina e do agente redutor DTT no meio reacional, juntamente com o teste de dois inibidores de serino-proteases aprotinina e TLCK comprovam a atividade de cisteíno-proteases testadas no presente trabalho.

Palavras-chave: *Lepidoptera*. Soja. Inibidores de proteases.

## ABSTRACT

The soybean crop is up to be attacked by many herbivores. The use of bioinsecticides affects insects development, controlling their number in agriculture without affecting the environment and human health. Protease inhibitors have been highlighted as a tool to minimize damage caused by herbivores in agriculture. The objective of this study was to purify and characterize biochemical and kinetically cysteine proteases produced in the intestinal tract of caterpillar *Anticarsia gemmatalis* and provide information for the adjustment of the use of protease inhibitors to control the caterpillar. In order to obtain the enzyme extract five intestine cells suffered disruption of 5<sup>th</sup> instar *A. gemmatalis*. After that, Cysteine proteases of *Anticarsia gemmatalis* midgut were partially purified using differential precipitation with 30-60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and affinity chromatography with aprotinin-agarose column. All the proteins which presented proteolytic activity, except serine-proteases which stayed stucked in the column, were put together in an enzymatic pool and characterized using the syntetic substrate L-BApNA in the presence of the serine protease inhibitor benzamidine. Looking for purifying the enzymatic substrate even more, a new purifying step was tried using a thiol-sepharose column, specific for cysteine-proteases. However, after this step the protein fraction did not show enzymatic activity. The characterization was made using the enzyme obtained from the pool aprotinin-agarose. Assessing the effect of pH on the enzymatic activity, three activity peak were observed and the highest activity was at 8,0. Regarding the influence of temperature, we observed two peaks with more discrete activity at 20°C and between 35-45°C, and a pronounced peak of activity between 55-60°C. The K<sub>Mapp</sub> obtained was 0.74mM and V<sub>maxapp</sub> was 0.8 μM.min<sup>-1</sup>. In rising concentrations of calcium cysteine-proteases partially purified showed best performance, with highest activity in 30mM, by this reason being considered calcium dependent. In inhibition assays were tested EDTA (an inhibitor of metallo proteinases), pepstatin A (aspartyl protease inhibitor), aprotinin and TLCK (both serine-protease inhibitors). The only significant result was observed for rising concentrations of EDTA, giving more cues for the calcium dependent aspect. Pestatin A, aprotinin and TLCK had no significant effect on the activity of partially purified cysteine-proteases from *A. gemmatalis*. The presence of the serine protease inhibitor benzamidine and the reducing agent DTT in the reaction medium together with the two inhibitors of serine proteases TLCK and aprotinin demonstrate the activity of cysteine proteases tested in this study.

Keywords: *Lepidoptera*. Soybean. Protease-inhibitors

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo a soja um dos principais produtos do agronegócio brasileiro. A soja é plantada praticamente em todo território nacional, sendo o Brasil o segundo maior produtor do grão no mundo (CONAB, 2016). Acreditar positivamente na produção de soja do Brasil é um pensamento muito válido, já que entre os países produtores da oleaginosa o Brasil figura entre os que apresentam as melhores condições para expandir a produção. No entanto, existem alguns fatores que atrapalham o país a chegar na posição de líder em produção de soja, dentre estes se destaca perdas por diversas pragas.

A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura, necessitando ser controlados (EMBRAPA, 2008). As próprias plantas possuem mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, muitos destes atuando em enzimas presentes na praga. As enzimas digestivas de lepidópteros de várias espécies têm sido bastante estudadas. Contudo, pouco se sabe sobre as proteases digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, embora esta permaneça figurando como uma das principais pragas da sojicultura. A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas que atacam a soja no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. É uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. Esse desfolhamento tem como consequência o comprometimento da fase de enchimento das vagens, o que afeta a produção dos grãos. A fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo (BATISTA et al., 2005).

O entendimento das enzimas digestivas dos insetos pode ser a chave para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle. Entendendo o mecanismo enzimático e catalítico, bem como o sítio ativo dessas enzimas, poderão ser adicionados ao genoma da planta códigos para síntese de proteínas e/ou peptídeos inibidores ou esses peptídeos sintéticos poderão ser pulverizados diretamente na cultura, minimizando o uso dos inseticidas químicos tradicionais. Portanto, a caracterização das proteases as quais os inibidores irão atuar é

necessária para conhecimento de seus mecanismos catalíticos, e dessa forma ter informações suficientes para o uso efetivo de inibidores de proteases no controle de pragas.

Estudos com as serino-proteases purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* foram realizados, sendo verificada a presença de enzimas com atividade de tripsinas-*like* ligadas a membrana do intestino do inseto e também presente no extrato solúvel intestinal (OLIVEIRA et al., 2005). Também foram caracterizadas as serino-proteases do extrato bruto sintetizado 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 *A. gemmatalis* (PILON, 2008). Porém, poucos estudos foram feitos com cisteíno-proteases, que são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico do ânion sulfeto, no sítio ativo, à ligação peptídica (KUNAKBAEVA et al., 2003). O sítio ativo de uma cisteíno-protease é composto por um resíduo de cisteína, por um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo a purificação parcial e a caracterização cinético-enzimática de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis*, buscando elucidar as estruturas das proteases digestivas desse inseto, visando impedir prejuízos na cultura da soja, bem como auxiliar pesquisas futuras relacionadas ao controle de pragas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Criação da lagarta da soja

Foram mantidos no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV ovos de *A. gemmatalis*, à temperatura média de 25°C e 70% de umidade relativa. Após a eclosão dos ovos as lagartas foram mantidas em potes plásticos e alimentadas com dieta artificial. As pupas obtidas foram mantidas em um gaiola de madeira e os adultos emergidos foram alimentados com solução nutritiva, embebida em algodão e colocada no fundo da gaiola. As posturas de *A. gemmatalis* foram coletadas em papéis que revestiam internamente a gaiola. As folhas com ovos foram retiradas e cortadas em tiras de aproximadamente 5cm de largura x 10cm de comprimento e colocadas em potes plásticos juntamente da dieta artificial.

### 2.2. Preparo da dieta

A dieta artificial é composta por feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. A água é levada ao fogão em uma panela e logo após fervida adiciona-se o ágar. A esta mistura foram adicionados os outros ingredientes, os quais foram misturados com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida foi adicionado ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (metilparabeno) (5g), formol 40% (6mL) e 10mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantotenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25mg), riboflavina (0,50mg), piridoxina (0,25mg), ácido fólico (0,25mg), biotina (0,02mg), inositol (20mg), água (1L) até formar uma pasta homogênea que então é transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A dieta então será levada ao germicida e então refrigerada a 4°C.

**Quadro 1** – Composição da dieta artificial

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

### 2.3. Obtenção do extrato enzimático bruto

Foram dissecadas 50 larvas de *Anticarsia gemmatalis* de 5º instar e obtidos os intestinos. Os intestinos foram colocados em 10mL de solução HCl  $10^{-3}$  M a 4°C. Para obtenção dos extratos enzimáticos os intestinos foram macerados em gral de porcelana com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido. O extrato obtido foi centrifugado em tubos eppendorf de 10mL com rotação 25.500 g por 10 minutos a 4°C (OLIVEIRA et al., 2005). O sobrenadante foi separado e mantido a -80°C para as futuras análises.

### 2.4. Avaliação da atividade enzimática de cisteíno-proteases

O método utilizado para avaliação de atividade de cisteíno proteases foi descrito por Erlanger et al. (1961) com modificação (MENDONÇA et al., 2011). Foram adicionados 250 µL da solução de L-BApNA 2,4 mM, 250 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo DTT 5 mM, para garantir que os grupos tiol das cisteíno proteases fiquem reduzidos, 50 µL de benzamidina inibidor de serino-proteases 12mM, para que apenas a atividade de cisteíno proteases seja avaliada, tendo em vista que serino-proteases também utilizam como substrato L-BApNA, e ao final 50 µL do extrato enzimático. A reação foi paralisada após 15min a temperatura ambiente, pela adição de ácido acético. No final, foram feitas as leituras no espectrofotômetro a 410nm. O experimento foi realizado em triplicata.

### 2.5. Precipitação diferencial com Sulfato de Amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]

Após a obtenção do extrato bruto, 5mL deste foram precipitados com 30% de sulfato de amônio. A quantidade necessário de sal para atingir 30% foi adicionada ao extrato enzimático bruto, que ficou por agitação durante 60min a 4°C. A mistura foi centrifugada a 12000 g por 30min a 4°C. A fração solúvel foi então precipitada com 60% de sulfato de amônio. O pellet foi ressuspenso em 1,0mL de tampão Tris-HCl  $10^{-3}$  M pH 7,5 e dialisado *overnight* em 200 mL do mesmo tampão a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 20000g por 60min a 4°C para remoção de impurezas. Após cada etapa de precipitação, a atividade enzimático do extrato foi avaliada.

### 2.6. Coluna de afinidade Aprotinina-agarose para Serino-proteases

Alíquota de 1mL do dialisado foi aplicada na coluna de afinidade Aprotinina-agarose sob o fluxo de 1mL/min e frações de 1mL foram coletadas. A eluição da coluna foi feita com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 e 1,5 M NaCl. Para detectar atividade proteica nas frações

coletadas, foram feitas leituras de absorvância a 280nm. Foram avaliadas as atividades enzimáticas das frações, com o objetivo de detectar cisteíno-proteases. As frações que apresentaram atividades foram reunidas para a realização dos ensaios para caracterização enzimática.

## **2.7. Eletroforese**

Após cada etapa de purificação as frações foram dissolvidas em tampão Tris-HCl (80 mM, pH 6,8, 2% de SDS, 12% de glicerol, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,05% de azul de bromofenol). A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, de acordo com procedimento descrito por Blum et al. (1987).

## **2.8. Efeito do pH e Temperatura**

Para alcançar os valores desejados, na avaliação do efeito do pH foram utilizados tampões MacIlvaine na faixa de 3,0 a 7,5 e tampões Tris-HCl na faixa de 8,0 a 10,0. Já nas avaliações de temperatura, foi utilizado banho maria na faixa de 10 a 65°C com as amostras mantidas a pH 8,0. A atividade enzimática do extrato parcialmente purificado foi então feita de acordo com o procedimento descrito para avaliação da atividade enzimática de cerino-proteases. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

## **2.9. Efeito das concentrações de íons Cálcio**

Foram avaliados efeitos das concentrações de íons cálcio, com concentrações de  $\text{CaCl}_2$  variando de 5 a 30mM, manutenção do pH igual a 8,0 com utilização de tampão Tris-HCl 0,1 M. A atividade enzimática foram analisadas de acordo com o protocolo para determinação da atividade de cisteíno-proteases. Os experimentos foram realizados em três repetições e em duplicata.

## **2.10. Determinação de parâmetros cinéticos**

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{\max}$  foi feita utilizando-se dos valores de melhor atividade para temperatura e pH. Foram acrescentados DTT 5mM, com o substrato L-BApNA variando de 0,02 a 2,0mM. Inibidor de serino-proteases benzamidina foi acrescentado na concentração final de 1mM. Os ensaios foram realizadas como descrito anteriormente. As velocidades iniciais foram determinadas durante 15min a 410nm para L-BApNA, utilizando-se para o cálculo coeficiente de extinção molar igual a 8800  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Os

parâmetros cinéticos no estados estacionário foram obtidos por regressão não-linear utilizando o programa SigmaPlot.

### **2.11. Efeito de modificadores químicos**

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

### **2.12. Análise Estatística**

Para a determinação dos efeitos de pH e temperatura sobre a atividade enzimática das cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino-médio de *A. gemmatalis*, foi utilizado estatística descritiva, apoiando sua validade na eficácia dos protocolos bioquímico. A média de cada ponto foi calculada com base em três repetições. Para a determinação da atividade enzimática sobre o efeito dos modificadores químicos (Cálcio, EDTA, Pepstatina A, Aprotinina e TLCK], foram feitas análises de regressão e determinados os coeficientes de correlação R<sup>2</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

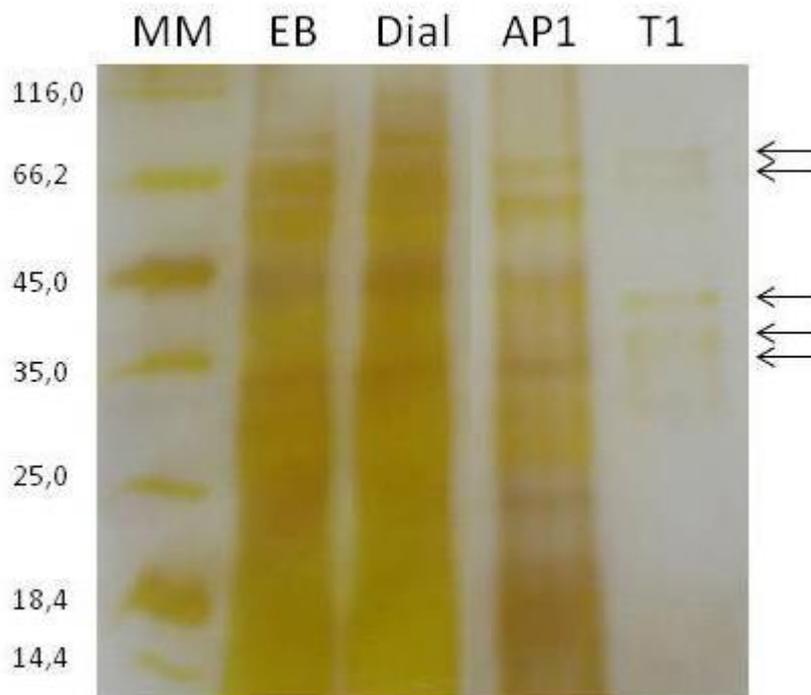
#### 3.1. Purificação parcial de cisteíno-proteases de *Anticarsia gemmatalis*

Analisando os dados da tabela é possível perceber que a purificação foi parcial. O fator de purificação final foi de 0,8, com rendimento de 2,6% e atividade específica de 6,22mM/min/mg. A queda brusca da atividade total do extrato bruto para a etapa de precipitação evidencia que grande parte das cisteíno-proteases foram perdidas na etapa de precipitação. No entanto, a etapa de purificação utilizando a coluna de afinidade aprotinina-agarose resultou num aumento da atividade específica da enzima, o que revela um aumento no fator de purificação.

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

<b>Fração</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade Total (mM/min)</b>	<b>Atividade específica (mM/min/mg)</b>	<b>Fator de purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	28,55	214,43	7,51	1	100
<b>Precipitação(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 30-60%</b>	2,00	8,48	4,25	0,6	4,0
<b>Aprotinina-agarose</b>	0,88	5,48	6,22	0,8	2,6

O gel de poliacrilamida representado na figura 1 representa a purificação de cisteíno-proteases de *A. gemmatalis*. A primeira canaleta representa o perfil migratório do marcador com seus valores de peso molecular conhecidos. As outras canaletas representam, respectivamente, o extrato bruto, o dialisado obtido a partir da precipitação diferencial com 30 – 60% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o pool proteico obtido a partir do volume não ligado da coluna de aprotinina-agarose. A quinta canaleta representa o perfil migratório das proteínas eluídas da thiol-sepharose, as quais não apresentaram atividade enzimática. Provavelmente essas enzimas perderam a atividade devido as altas concentrações do agente redutor DTT, o qual pode ter causado uma desnaturação das enzimas a ponto de não restar atividade remanescente de cisteíno-proteases. No perfil das bandas do pool proteico (frações que apresentaram atividade de cisteíno-proteases) obtido da cromatografia de afinidade aparecem duas bandas entre 25 e 45kDa que podem supostamente representar as cisteíno-proteases de *A. gemmatalis*. Terra e Ferreira, (1994) relataram que cisteíno-proteases comuns presentes no intestino de Lepidopteras apresentam peso molecular por volta da faixa 25 – 45kDa.



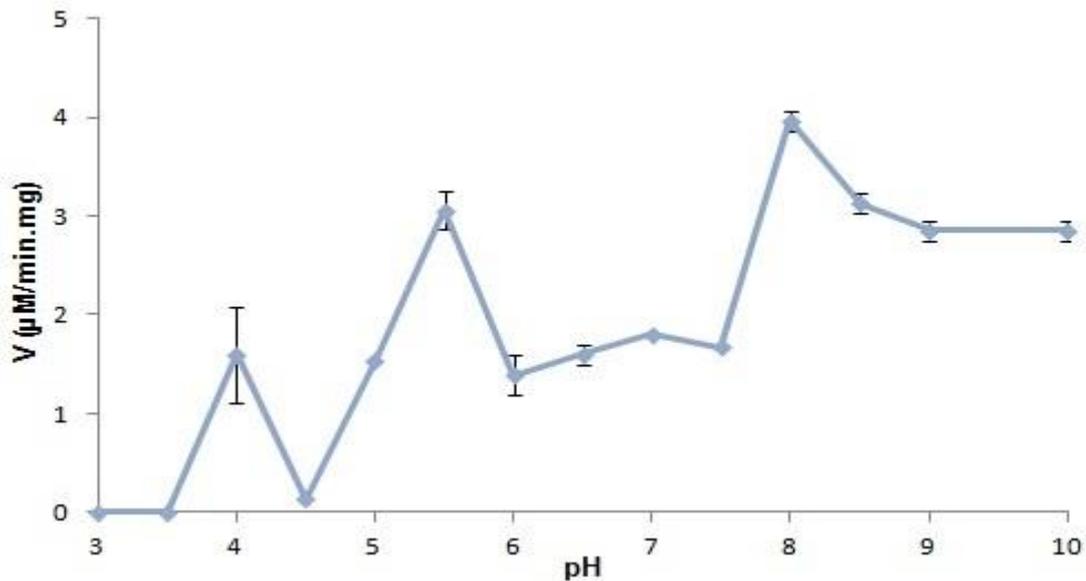
**Figura 1.** Purificação de cisteíno-proteases de *Anticarsia gemmatalis* em SDS-PAGE 12%. As setas representam as bandas, que supostamente, representam as cisteíno-proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*. EB: Extrato Bruto; Dial: Dialisado obtido pela precipitação com sulfato de amônio; AP1: Fração obtida da coluna de afinidade Aprotinina-agarose; T1: Fração obtida da coluna de Thiol-sepharose, a qual não apresentou atividade enzimática.

### 3.2. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Na figura 2 está representado o efeito do pH sobre a atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*. Foram observados 4 picos de atividade, em pH 4,0; 5,5; 7,0 e 8,0. Os resultados sugerem a presença de diferentes formas da enzima no pool enzimático. Fahmy et al. (2004) trabalhando com cisteíno-proteases do trigo, encontrou valores entre pH 3,5 a 4,5, que estão dentro da faixa do resultado obtido. O segundo pico em pH 5,5 está de acordo com o trabalho realizado por Mohamed *et al.* (2005), que obteve pico de atividade em pH 5,5 em estudos com cisteíno-proteases de *Fasciola gigantica*.

O pico de melhor atividade, encontrado a pH 8,0, está próximo ao pH alcalino do intestino médio de lepidópteros, cujo pH gira em torno de 10,0 a 10,5. Pereira et al. (2001)

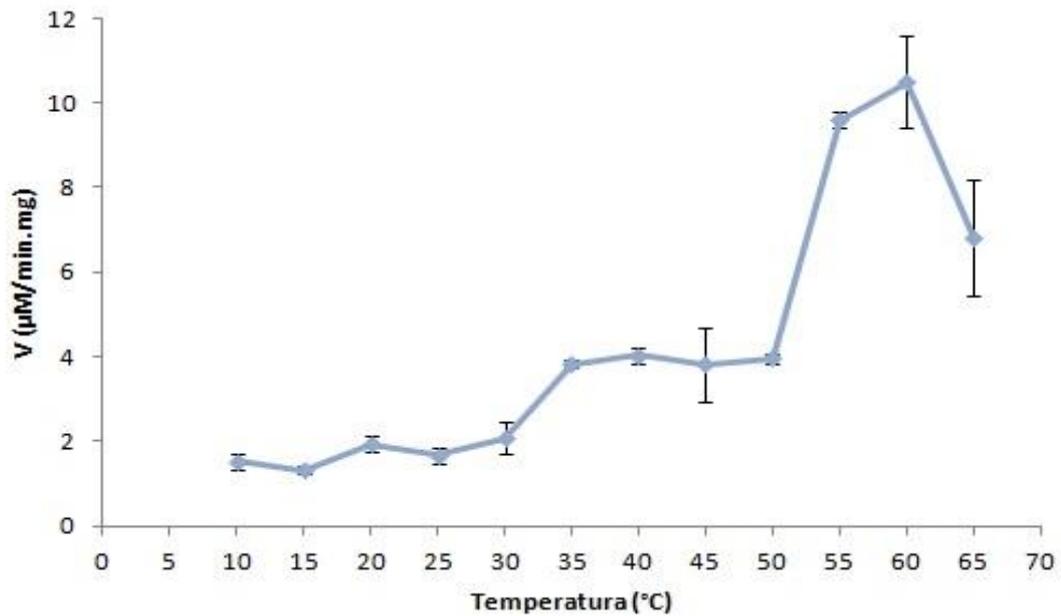
obtiveram o melhor valor em pH 8,0 para uma cisteíno-protease purificada de *Carica candamarcensis* L, uma espécie da família do mamão.



**Figura 2.** Efeito do pH sobre a atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino-médio de *A. gemmatalis*. Cada ponto representa a média de 3 repetições e as barras o erro padrão.

### 3.3. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

Na figura 3 estão representados os efeitos de temperaturas crescentes sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. A melhor atividade foi na faixa de 55 a 60°C, no entanto os quatro picos observados a 20, 40, 55 e 60°C juntamente com os quatro picos de pH confirmam a purificação parcial com pelo menos 4 formas de cisteíno-proteases presentes.

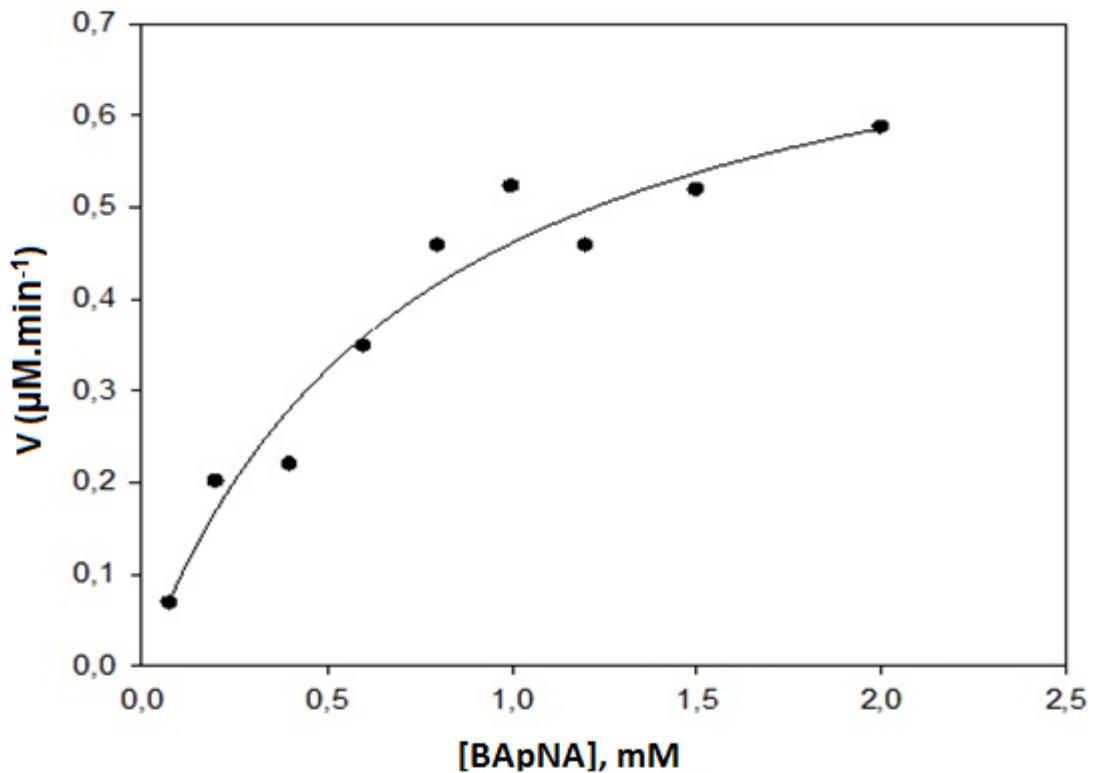


**Figura 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*. Cada ponto é a média de 3 repetições. Barra representa o erro padrão.

Valasaki et al. (2008), utilizando substratos semelhantes ao L-BApNA, encontrou melhor atividade de cisteíno-proteases extracelulares purificadas de *Lactobacillus helveticus* a 60°C. Portanto, as cisteína-proteases apresentaram temperatura de melhor atividade semelhantes às obtidas em outros estudos com enzimas purificadas.

### 3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

A figura 4 representa o gráfico de Michaelis-Menten para as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*, utilizando-se do substrato L-BApNA. Os parâmetros foram obtidos variando as concentrações do substrato de 0,2 a 2,0 mM. Por apresentarem curva hiperbólica, as cisteíno-proteases seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentrações testadas. Como se trata de uma purificação parcial, os parâmetros cinéticos obtidos se tratam de valores aparentes. O valor de  $K_{m_{app}}$  das cisteíno proteases do intestino médio de *A. gemmatalis* foi de 0,74mM. O valor de  $V_{max_{app}}$  foi de 0,8  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ .



**Figura 4.** Curva de Michaelis-Menten para as cisteíno proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*. Com base nesses dados é possível se obter parâmetros cinéticos  $K_{m_{app}}$  e  $V_{max_{app}}$ . Equação ajustada:  $f = 0,8047 * (x) / (0,7438 + (x))$ .

Na tabela 2 estão representados propriedades bioquímico-cinéticas importantes da atividade das cisteíno-proteases parcialmente purificadas avaliadas no presente trabalho.

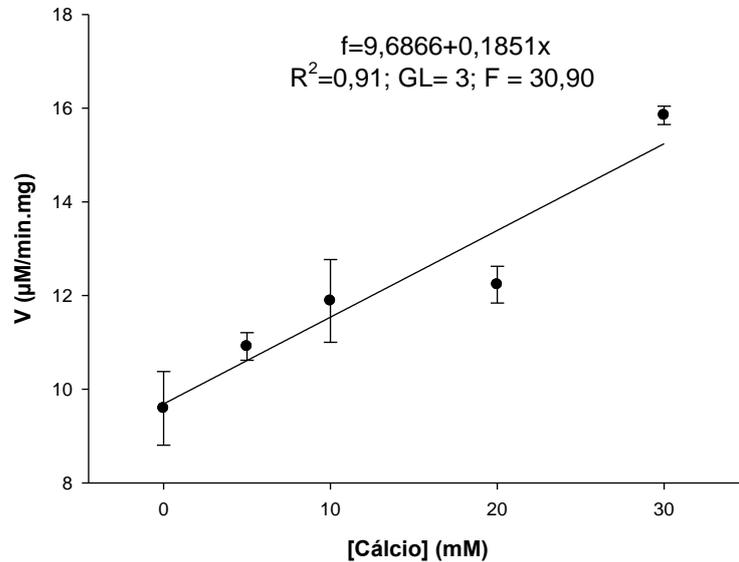
**Tabela 2.** Propriedades bioquímica-cinéticas de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Substrato	pH de melhor atividade	T°C de melhor atividade	$K_{M_{app}}$	$V_{m_{app}}$
L-BApNA	8	55-60°C	0,74mM	0,8 μM.min <sup>-1</sup>

Caracterizando cisteíno-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato-intestinal de *A. gemmatalis*, Pilon (2008) obteve valores de  $K_{M_{app}}$  para cisteíno-proteases de *Enterococcus galinarum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* de 0,70 mM, 0,67 mM, 0,63 mM e 0,67 mM, respectivamente. Sob o ponto de vista cinético, parâmetros cinéticos com a mesma ordem de grandeza são iguais (BORGES et al., 2006). Portanto, considerando os estudos citados, o valor de  $K_{m_{app}}$  0,74mM encontrado no presente trabalho, está dentro da faixa para cisteíno-proteases.

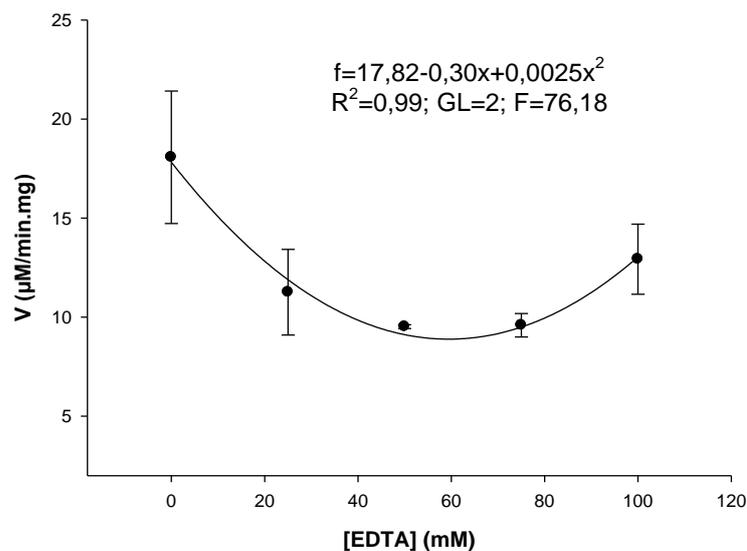
### 3.5. Cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes

A figura 5 representa a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*, a qual foi maior na concentração de 30mM de íons cálcio.



**Figura 5.** Efeito da concentração de íons cálcio sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Na figura 6 está representado o efeito do quelante de íons metálicos, tais como Cálcio, EDTA. O EDTA forma complexos estáveis com os íons cálcio, os retirando do meio. Pode-se notar a perda de atividade consequente do aumento da concentração de EDTA no meio.



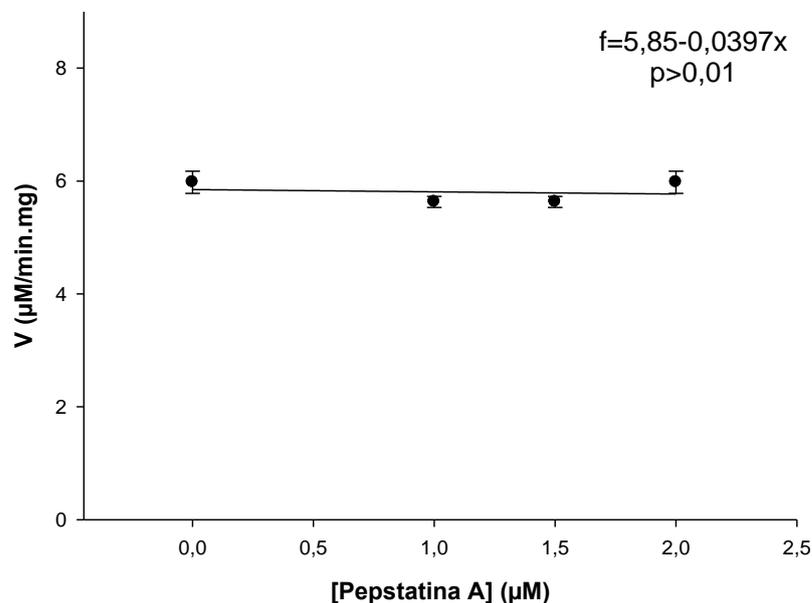
**Figura 6.** Efeito da concentração de EDTA sobre a atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*.

Nota-se a ativação enzimática com o aumento das concentrações de Cálcio e redução da atividade com aumento das concentrações de EDTA. Com este resultado obtido, pode-se concluir que as cisteíno-proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis* são cálcio-dependentes. O resultado está de acordo com outros trabalhos. D'Avila-Levy et al. (2003) purificaram uma cisteíno-proteases cálcio-dependente do tripanosoma *Crithidia deanei*. Valasaki et al. (2008) também caracterizaram uma cisteíno-protease cálcio-dependente de *Lactobacillus helveticus*. Raphael et al. (2000) observaram efeito ativador de íons cálcio em cisteíno-proteases de *Plasmodium falciparum*.

### 3.6. Efeito de modificadores químicos

#### 3.6.1. Efeito da Pepstatina A

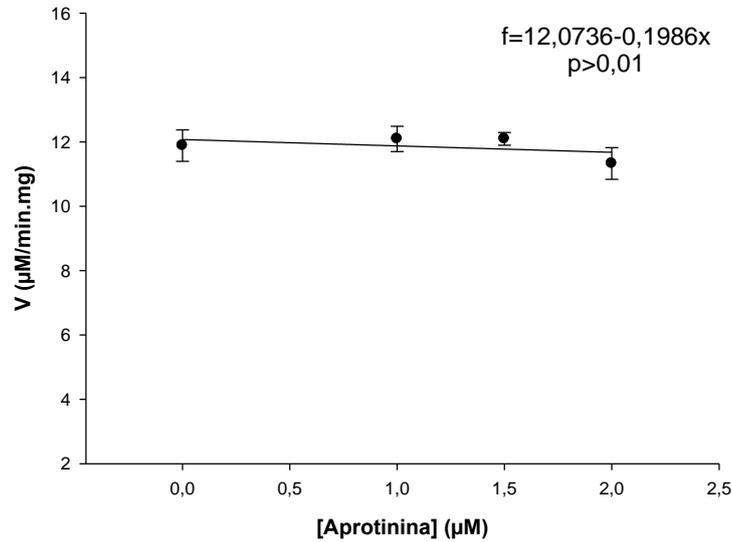
A Pepstatina A, um inibidor de aspartil-proteases, não apresentou mudança significativa ( $P > 0,01$ ) na atividade de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino-médio de *A. gemmatalis*, como apresentado na figura 7. Esses resultados confirmam que a enzima parcialmente purificada não pertence à família da aspartil-proteases.



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

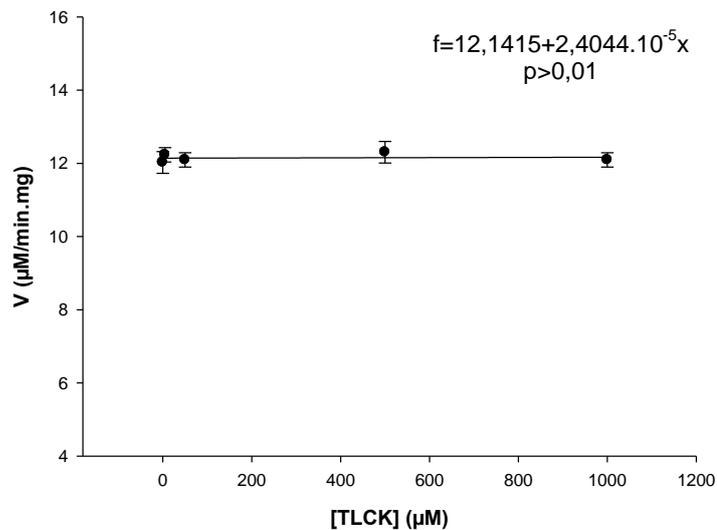
### 3.6.2. Efeito de inibidores de serino-proteases

Na figura 8 está representado o efeito do inibidor competitivo de serino-proteases aprotinina na atividade enzimática de cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino-médio de *A. gemmatalis*, o qual não apresentou efeito significativo na atividade ( $p > 0,01$ ).



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

Na figura 9 está representado o efeito de outro inibidor de serino-proteases, TLCK, o qual não apresentou efeito significativo na atividade ( $p > 0,01$ ). Esses resultados mostram que a enzima purificada tem pouca contaminação de serino-proteases e que se trata de cisteíno-proteases.



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

#### 4. CONCLUSÃO

A melhor atividade para as cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* foi encontrada a pH 8,0, tendo outros dois picos de atividade a pH 4,0 e 5,5. A faixa de temperatura de melhor atividade foi entre 55-60°C, no entanto outros picos de menores atividades foram encontrados a 20°C e na faixa entre 35°C e 40°C. Os valores dos parâmetros cinéticos aparentes,  $K_m$  e  $V_{max}$ , foram 0,74 mM e 0,8  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente. As cisteíno-proteases se mostraram cálcio-dependentes. A utilização de EDTA, uma substância quelantes de íons metálicos, tais como o cálcio, reforçou a hipótese de que as cisteíno-proteases são cálcio dependentes. Os modificadores químicos Pespstatina A, aprotinina e TLCK não afetaram significativamente a atividade das cisteíno-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Conclui-se que no extrato analisado parcialmente purificado, caracterizamos enzimas provenientes da família das cisteíno-proteases, já que os modificadores químicos inibidores de metalo-proteases e serino-proteases não apontaram diferenças significativas na atividade enzimática.

## 5. REFERÊNCIAS

- BATISTA, A. C.; MELATTI, V. M.; DEMO, C.; MARTINI, E. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C. S.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 82, EMBRAPA, 2005.
- BLUM, H; BEIER, H; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BORGER, S.; LIEBERMEISTER, W.; KLIPP, E. Prediction of Enzyme Kinetic Parameters Based on Statistical Learning. **Genome Informatics**, 17: 80–87, 2006.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos 2015/2016. Setembro de 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 19 de outubro 2016.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 420: 1-8, 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2008**. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2008, 193p.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.
- FAHMY, A.S.; ALI, A.A.; MOHAMED, S.A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticuma estivum* (cv. Giza 164). **Bioresource Technology**, 91:297-304. 2004
- FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, n. 4, p. 631-640, 1994.
- MENDONÇA, E.G.; VISÔTTO, L.E.; COSTA, N.C.S.; RIBEIRO, F.R.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVEIRA, M.G.A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, 35: 446-454, 2011.
- MOHAMED, S.A.; FAHMY, A.S.; MOHAMED, T.M.; HAMDY, S.M. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 142:192-200, 2005.
- OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.140B, p.369-380, 2005.

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

PILON, F.M. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. 2008.

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

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

VALASAKI, K.; STAIKOU, A.; THEODOROU, L.G.; CHARAMAPOULOU, V.; ZACHARAKI, P.; PAPAMICHAEL, E.M. Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5804-5813, 2008.

KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1, p. 209-216, 2003.