INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
19.127
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES
INTESTINAIS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA)**

TAMARA REZENDE DE AZEVEDO

CLÉLIA FERREIRA TERRA
Orientadora

São Paulo
2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003035

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Azevedo, Tamara Rezende de
A994p   Purificação e caracterização das β -glicosidases intestinais
de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) / Tamara Rezende de
Azevedo. -- São Paulo, 2000.
89p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química. Departamento
de Bioquímica.

Orientador: Terra, Clélia Ferreira

1. Enzima : Inseto : Bioquímica animal   2. Digestão :
Lepidoptera : Fisiologia animal I. T. II. Terra, Clélia Ferreira,
orientador.

595.701925   CDD

**“Purificação e Caracterização das β -Glicosidases
Intestinais de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)”**

TAMARA REZENDE DE AZEVEDO

**Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em
Ciências - Área: Bioquímica.**

Aprovado por:

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA RASERA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. OSWALDO MARINOTTI
ICB - USP

SÃO PAULO
28 DE ABRIL DE 2000.

“Conhecemos muito, sentimos pouco.”

(Bertrand Russel)

Aos queridos
Tarik, Tasso, Talita e Tadeu,
porque juntos crescemos e aprendemos a viver.

Aos meus insubstituíveis pais
Rubens e Verônica,
pela prioridade que nós cinco sempre fomos em suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Dra. Clélia Ferreira pela orientação, compreensão e amizade durante o meu mestrado.

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra por despertar o interesse por Bioquímica, pelo exemplo, pela amizade e discussões.

Aos colegas de laboratório: Adriana Natalicio Capella, Adriana Rios Lopes, Alcides Batista Dias Jr., Alexandre Hamilton Pereira Ferreira, Ariel René, Beatriz Baker, Dra. Beatriz Pacheco Jordão, Daniella Steconni, Érica Hotz Almeida, Fernando Ariel Genta, Lucas Blanes, Luciana Madeira da Silva, Maria Cícera Pereira da Silva, Renata Bolognesi, Dra. Rita Heloísa Yoem, Rodolfo Aureliano Salm, Rosana Regel, Dr. Sandro Roberto Marana, Dr. Plinio Tadeu Cristofolletti Junior, Dra. Terezinha Schumaker e Uirá Felipe Lourenço pelas discussões, amizade e o agradável ambiente de trabalho.

Às queridas Beatriz Simonsen Stolf e Cleonice da Silva por tantas e tantas horas de conversas, conselhos e apoio, pela amizade realmente sincera.

Às técnicas Luiza Nakabayashi, Maria Ivanilde Marcelino e Suely de Oliveira pelo auxílio e amizade.

Ao Dr. José R. P. Parra (ESALQ – USP) pelos insetos cedidos.

À FAPESP pela bolsa concedida durante o primeiro ano de mestrado.

Durante a elaboração desta dissertação, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX e CNPq.

RESUMO

O Lepidoptera *Diatraea saccharalis* possui três β -glicosidases digestivas solúveis. As três enzimas foram resolvidas através de uma combinação de passos cromatográficos em colunas Econo Pac Q (sistema de baixa pressão), Mono Q, Phenyl Superose, Superose e Mono P (FPLC). Duas delas, denominadas de E1 e E2, foram purificadas até a homogeneidade, enquanto a terceira (E3) foi semi-purificada. Dentre todas as técnicas cromatográficas testadas, colunas hidrofóbicas são as únicas capazes de resolver as três atividades de β -glicosidase.

Os pesos moleculares relativos (determinados por SDS PAGE), pH ótimo e o pI foram respectivamente: E1, 58 K, 6,7, 7,5 ; E2, 61 K, 6,3, 7,4 ; E3, 61 K, 7,2, 7,4.

As três enzimas apresentam quatro subsítios de ligação de glicose e têm especificidade ampla, sendo capazes de clivar substratos sintéticos, dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos tóxicos produzidos por plantas.

O principal papel fisiológico de E1 deve ser a clivagem de oligocelodextrinas derivadas da digestão de hemicelulose. E2 deve estar envolvida na hidrólise de glicolipídios, sendo a E3 a principal responsável pela digestão de dissacarídeos.

ABSTRACT

The Lepidoptera *Diatraea saccharalis* has three soluble digestive β -glycosidases. They were resolved by a combination of chromatographic steps, using Econo Pac Q (low-pressure system), Mono Q, Phenyl Superose, Superose 12 and Mono P (FPLC system) columns. Two enzymes called E1 and E2 were purified to homogeneity. The third (E3) was semi-purified. Hydrophobic columns are the only ones able to resolve the three β -glycosidase activities.

The relative molecular weights (SDS PAGE), pH optimum and pI values were, respectively: E1, 58 K, 6.7, 7.5 ; E2, 61 K, 6.3, 7.4 ; E3, 61 K, 7.2, 7.4.

The enzymes have four sub-sites for glucon binding in their active sites. They have broad substrate specificity to hydrolyze synthetic substrates, disaccharides, oligosaccharides and plant toxic glucosides.

E1 may have the physiological role of hydrolyzing oligosaccharides derived from hemicellulose digestion. E2 may be responsible for glycolipid digestion and E3 seems to be the main enzyme that digests disaccharides.

ABREVIATURAS

cm	centímetro
CMC	concentração micelar crítica
Con A	Concanavalina A
E	enzima
E1	enzima 1 ou β -glicosidase 1
E2	enzima 2 ou β -glicosidase 2
E3	enzima 3 ou β -glicosidase 3
EV	epitélio ventricular
FPLC	Fast Protein Liquid Purification
h	horas
kcat	constante catalítica
Ki	constante de inibição
Km	constante de Michaelis-Menten
LPH	lactase-florizina hidrolase
LpNA	L-leucina-p-nitroanilida
M	molar
min	minutos
mM	milimolar
Mr	peso molecular relativo
MU	metil umbeliferona
MU β Glu	metil umbeliferil β -D-glucosídeo
MU β Gal	metil umbeliferil β -D-galactosídeo
μ M	micromolar
NP	p-nitrofenolato
NP β Glu	p-nitrofenil β -D-glucosídeo
NP β Gal	p-nitrofenil β -D-galactosídeo
octil β glu	octil β -D-glucosídeo
pHo	pH ótimo
pl	ponto isoelétrico
p/v	peso por volume
s	segundos
S	substrato
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS – PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEV	sobrenadante da centrifugação do epitélio ventricular
Tris	tris (hidroximetil) amino metano
UV	ultra-violeta
v	velocidade da reação
V	volts
V _{máx}	velocidade máxima
v/v	volume por volume

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA FISIOLOGIA DIGESTIVA EM INSETOS	1
1.2	GLICOSIDASES – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1.3	GLICOSIDASES EM MAMÍFEROS.....	4
1.4	GLICOSIDASES ENVOLVIDAS EM CIANOGÊNESE	5
1.5	GLICOSIDASES EM INSETOS	7
1.6	GLICOSIDASES EM <u>DIATRAEA SACCHARALIS</u>	10
1.7	OBJETIVOS DESTES TRABALHOS.....	14
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1	ANIMAIS	15
2.2	DISSECÇÃO DAS LARVAS E OBTENÇÃO DO EPITÉLIO VENTRICULAR DO TUBO DIGESTIVO.....	15
2.3	HOMOGENEIZAÇÃO DO EPITÉLIO VENTRICULAR DE <u>DIATRAEA SACCHARALIS</u>	15
2.4	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	16
2.5	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	17
2.6	ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES NATIVAS.....	17
2.7	ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE) E COLORAÇÃO DOS GÉIS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS	18
2.8	ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA E DETECÇÃO DE ATIV ENZIMÁTICA “IN SITU”	18
2.9	FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA	19
2.10	CROMATOGRAFIA DE HIDRÓXIAPATITA EM SISTEMA DE BAIXA PRESSÃO	20
2.11	CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM SEPHAROSE CON A EM SISTEMA DE BAIXA PRESSÃO	20
2.12	CROMATOGRAFIA HIDROFÓBICA EM SISTEMA DE BAIXA PRESSÃO	20
2.13	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM SISTEMA DE BAIXA PRESSÃO	21
2.14	CROMATOGRAFIA HIDROFÓBICA EM SISTEMA FPLC.....	21
2.15	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA MONO Q EM SISTEMA FPLC	22
2.16	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA MONO P EM SISTEMA FPLC	22
2.17	CROMATOFOCALIZAÇÃO EM COLUNA MONO P EM SISTEMA FPLC.....	23
2.18	FILTRAÇÃO EM GEL EM COLUNA SUPERDEX EM SISTEMA FPLC	23
2.19	FILTRAÇÃO EM GEL EM COLUNA SUPEROSE EM SISTEMA FPLC E DETERMINAÇÃO DE PESOMOLECULAR	23
2.20	TESTE PARA PRECIPITAÇÃO DE β -GLICOSIDASES EM PRESENÇA DE SULFATO DE AMÔNIO	24
2.21	ESTABILIDADE DAS β -GLICOSIDASES EM PH 9,5.....	24
2.22	EFEITO DE ETANOLAMINA SOBRE A ATIVIDADE DAS β -GLICOSIDASES.....	24
2.23	EFEITO DE TRIETANOLAMINA SOBRE A ATIVIDADE DAS β -GLICOSIDASES	25
2.24	ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE	25
2.25	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
2.26	REMOÇÃO DE MOLÉCULAS DE BAIXO PESO MOLECULAR POR FAST DESALTING.....	26
2.27	REMOÇÃO DE MOLÉCULAS DE BAIXO PESO MOLECULAR POR DIÁLISE	26
2.28	DETECÇÃO DE GLICOSILAÇÃO EM PROTEÍNAS	26
2.29	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS K_m E V_{max} DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u> PARA VÁRIOS SUBSTRATOS E INIBIÇÃO POR SUBSTRATO	27
2.30	EXPERIMENTOS DE COMPETIÇÃO ENTRE SUBSTRATOS E DETERMINAÇÃO DE K_i	28
2.31	ENERGIA DE LIGAÇÃO DO SUBSTRATO NO SÍTIO DO AGLICONE	28

3	RESULTADOS.....	29
3.1	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ESPECIFICIDADE DAS TRÊS β -GLICOSIDASES INTESTINAIS DE <u>D. SACCHARALIS</u>	29
3.2	PURIFICAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	29
3.2.1	<i>Estabelecimento dos passos iniciais da marcha de purificação.....</i>	31
3.2.2	<i>Purificação da β-glicosidase 1 de D. saccharalis.....</i>	37
3.2.3	<i>Purificação da β-glicosidase 2 de D. saccharalis.....</i>	42
3.2.4	<i>Purificação da β-glicosidase 3 de D. saccharalis.....</i>	45
3.2.5	<i>Resultados finais da purificação das β-glicosidases de D. saccharalis.....</i>	48
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	52
3.4	CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	56
3.4.1	<i>Caracterização inicial.....</i>	56
3.4.2	<i>Especificidades das β-glicosidases de D. saccharalis.....</i>	58
3.4.3	<i>Ensaios de competição entre substratos e determinações de K_i .....</i>	66
4	DISCUSSÃO.....	73
4.1	PURIFICAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	73
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	74
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO ATIVO DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	76
4.4	O PAPEL DAS β -GLICOSIDASES DE <u>D. SACCHARALIS</u>	80
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância do estudo da fisiologia digestiva em insetos

Os insetos são organismos bem sucedidos que ocupam nichos ecológicos bastante variados. Devido a este sucesso adaptativo, os insetos podem ser considerados o grupo dominante encontrado na biosfera. Das espécies de animais vivas conhecidas, cerca de 70% são insetos. O número de espécies é estimado em 1 milhão (BARNES & RUPPERT, 1996).

Muitos insetos são pragas de agricultura e vetores de doenças em animais e no homem. Os prejuízos agrícolas causados pelas pragas levaram à preocupação de buscar um controle ao mesmo tempo eficaz e não prejudicial ao meio ambiente e às populações humanas. Os insetos que atacam a agricultura, em todo o mundo, têm sido tradicionalmente combatidos pelo uso, em larga escala, de pesticidas variados, causando sérios prejuízos ao meio ambiente. Em função desse problema ecológico, outros processos de controle de pragas vêm sendo investigados.

Uma importante interface entre o inseto e o meio ambiente é seu tubo digestivo, contra o qual tem sido direcionado o controle de pragas. Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostraram que as plantas possuem um sistema natural de defesa contra insetos, que consiste principalmente na produção de proteínas e compostos químicos capazes de tirar seu apetite ou afetar seu sistema digestivo (HARBORNE, 1993). Valendo-se de estratégias semelhantes, tem-se produzido plantas transgênicas, mais resistentes à predação por insetos, que expressam proteínas capazes de desorganizar o processo digestivo destes. Os principais tipos de proteínas expressas com este propósito são: inibidores de enzimas digestivas (VAECK *et al.*, 1987; HILDER *et al.*, 1987); lectinas, que apresentam atividade inseticida por ligarem-se à quitina ou à membrana das células do epitélio digestivo, interferindo nas funções digestivas, secretórias e absorptivas deste (SALZMAN *et al.*, 1998); e proteínas de *Bacillus thuringiensis* (MC GAUGHEY & WHALON, 1992), que formam canais ao se ligarem a receptores nos enterócitos de

insetos susceptíveis, causando perda de material celular e morte do inseto (SCHNEPF *et al.*, 1998).

Embora já existam cerca de 30 espécies de plantas de interesse comercial transformadas que se tornaram resistentes a insetos (VAN RIE, 1991; BRUNKE & MEEUSEN, 1991), o fato recente de insetos deixarem de ser afetados por algumas dessas plantas (JONGSMA *et al.*, 1995; OPPERT *et al.*, 1997) tornou imperioso o desenvolvimento de novas estratégias para o controle dessas pragas. Este desenvolvimento é limitado, em grande parte, pela falta de dados suficientes sobre a fisiologia digestiva dos insetos, principalmente no que se refere aos compartimentos intestinais onde as diferentes fases da digestão ocorrem, às propriedades das enzimas participantes, à composição das membranas que revestem os enterócitos e aos processos envolvidos na secreção de enzimas (MICHAUD, 1997; BROADWAY, 1996; TERRA & FERREIRA, 1994).

A fim de contribuir para um maior entendimento das enzimas digestivas de insetos, realizamos o estudo das β -glicosidases de uma praga da cana de açúcar, a “broca da cana”, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera - Pyralidae). A importância das β -glicosidases de insetos como enzimas digestivas e, participantes de processos de defesa contra glicosídeos tóxicos de plantas ingeridas, será comentada adiante.

1.2 β -Glicosidases – considerações iniciais

As β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) são carboidrases que catalisam a hidrólise de resíduos de monossacarídeos, pela ponta não redutora, usualmente ligados por ligações β 1-4. Dependendo do monossacarídeo que é removido, a β -glicosidase é chamada de β -glucosidase (glicose), β -galactosidase (galactose), β -xilosidase (xilose), e assim por diante (TERRA & FERREIRA, 1994). O monossacarídeo removido (glicone) está ligado a um aglicone, que pode ser um glicosídeo como na celobiose, uma cadeia alquil como no octil β glu, ou aril como no NP β Glu.

O agrupamento das glicosidases pela sequência primária permitiu (HENRISSAT, 1991 e HENRISSAT & BAIROCH, 1993) a divisão destas

enzimas em 45 famílias, sendo que as β -glicosidases ocupam as famílias 1 e 3. Atualmente já existem cerca de 70 famílias, que podem ser obtidas na página URL: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt> da web (HENRISSAT & DAVIES, 1997). Algumas estruturas terciárias de β -glicosidases já foram elucidadas. Estes estudos mostraram que as β -glicosidases apresentam, em geral, estrutura $(\alpha/\beta)_8$ barril (JENKINS *et al.*, 1995), sendo agrupadas no clã A de glicosil hidrolases (HENRISSAT & DAVIES, 1997).

O mecanismo catalítico de β -glicosidases depende de dois resíduos de aminoácido, um doador de prótons e um nucleófilo (SINNOT, 1990). Para várias β -glicosidases, estes papéis foram descritos como sendo desempenhados por dois ácidos glutâmicos (WITHERS *et al.*, 1992 ; NEELE *et al.*, 1995), que possuem valores de pKa diferentes. JENKINS *et al.* (1995) localizaram o nucleófilo na porção C-terminal da fita $\beta 7$ do $(\alpha/\beta)_8$ barril, enquanto o doador de prótons estaria na porção terminal da fita $\beta 4$. Por isso, o clã A é eventualmente chamado de 4/7.

Em β -glicosidases a catálise geralmente ocorre pelo mecanismo de retenção, no qual a configuração do carbono anomérico do glicone é mantida. Este mecanismo pode ser dividido em duas etapas: glicosilação e deglicosilação. Na etapa de glicosilação, ocorre a clivagem da ligação glicone-aglicone, formando-se um intermediário covalente glicosil-enzima (glicone liga-se covalentemente ao nucleófilo, auxiliado pelo doador de prótons), sendo o aglicone liberado (grupo deixante). Em uma segunda etapa, a ligação enzima-glicone é atacada por uma molécula de água, sendo o glicone finalmente liberado como produto da catálise. Há a formação de dois estados de transição, idênticos. Neles forma-se um oxycarbonium e a glicose adquire a forma de meia-cadeira ou sofá. (WHITE & ROSE, 1997)

O mecanismo de retenção descrito acima difere daquele proposto para algumas glicosil-enzimas, cuja catálise ocorre envolvendo a inversão da configuração anomérica, como encontrado em β -amilase, glucoamilase e trealase (HENRISSAT & BAIROCH, 1993 ; DAVIES & HENRISSAT, 1995).

O sítio ativo de β -glicosidases possui o formato de bolso, ou seja, uma cavidade de fundo cego, apropriada para o reconhecimento e acomodação de extremidades não redutoras de sacarídeos, ou seja, o glicone do substrato. Deste modo, estas enzimas possuem baixa eficiência sobre substratos fibrosos como celulose. Este modelo difere das configurações “fenda” e “tunel”, que ocorrem tipicamente em endoglucanases (quitinase, α -amilase e lisozima) e exoglucanases (celobiohidrolase) respectivamente (DAVIES & HENRISSAT, 1995).

O sítio ativo das β -glicosidases é formado por uma série variável de subsítios, nos quais posicionam-se os resíduos de monossacarídeos que compõem o substrato. Esses subsítios são numerados de acordo com sua posição em relação ao ponto de clivagem do substrato (DAVIES *et al.*, 1997). O subsítio que liga a porção não redutora do substrato, e que fica antes do ponto de clivagem, recebe a denominação -1 e é chamado de sítio do glicone. Os subsítios que ligam a porção redutora do substrato, localizada após o ponto de clivagem, recebem números positivos (+1, +2, etc) e correspondem ao sítio do aglicone.

1.3 β -Glicosidases em mamíferos

Em mamíferos, ocorrem três β -glicosidases majoritariamente importantes: lactase-florizina hidrolase, β -glicosidase citossólica e β -glicosidase lisossomal.

A lactase-florizina hidrolase (LPH) é uma proteína ligada à membrana dos enterócitos e é assim chamada por possuir dois sítios catalíticos, um com atividade de lactase e outro com atividade de aril-alquil β -glicosidase (florizina hidrolase) (WACKER *et al.*, 1992). A LPH pertence à família 1 de glicosil-hidrolases, atuando segundo o mecanismo de retenção (HENRISSAT & BAIROCH, 1993). Esta enzima está envolvida na digestão de lactose, presente no leite de mamíferos. Alguns dos casos de intolerância à lactose são ocasionados pela sua ausência ou mal funcionamento sendo que, em humanos, esta síndrome é conhecida como alactasia, e está relacionada com a diminuição da atividade de LPH.

A LPH é sintetizada como um precursor de 220 K que é posteriormente clivado por uma protease do Complexo Golgi, dando origem a uma proteína de 160 K, que é inserida na membrana plasmática. Tanto a enzima processada como o pro-LPH apresentam atividade enzimática, sugerindo que, diferentemente de proteases, a clivagem não é essencial para sua ativação. Entretanto, este segmento não enzimático da proteína pro-LPH possui papel importante para o correto dobramento da LPH, funcionando como uma chaperona intra-molecular (NAIM *et al.*, 1994).

Uma outra β -glicosidase de mamíferos é encontrada em vários tecidos (inclusive intestino), mas localiza-se principalmente em fígado e rim (GLEW *et al.*, 1993). Conhecida como β -glicosidase citossólica, esta enzima apresenta ampla especificidade, podendo hidrolisar os substratos β -glucosídeos, β -galactosídeos, β -xilósídeos e β -arabinosídeos (LAMARCO & GLEW, 1986), mas não hidrolisa glicosilceramidas (VAN WEELY *et al.*, 1993). Essa enzima é ativada por álcoois primários e pode participar de reações de transglicosilação envolvendo estes álcoois, entretanto o significado biológico desta atividade ainda não é claro (GLEW *et al.*, 1993). Vários trabalhos têm mostrado que esta β -glicosidase possui a capacidade de hidrolisar glicosídeos fenólicos e cianogênicos presentes em tecidos vegetais, o que sugere seu possível envolvimento em mecanismos de desintoxicação (GLEW *et al.*, 1993).

Uma outra importante β -glicosidase de mamíferos é a glucocerebrosidase ou β -glicosidase ácida, que ocorre ligada à membrana plasmática de lisossomos. Esta enzima possui importância crítica para o metabolismo intracelular de glicoesfingolípídios e glicosilceramidas. Em humanos, a deficiência desta enzima acarreta a doença de Gaucher, caracterizada pelo acúmulo de glicolípídios não metabolizados. Um aspecto interessante desta β -glicosidase é a necessidade de uma proteína ativadora, a saposina C (GRABOWSKI *et al.*, 1993).

1.4 β -Glicosidases envolvidas em cianogênese

A capacidade das plantas de produzirem substâncias tóxicas a predadores visando a proteção de tecidos vitais é um dado antigo na literatura.

Um importante grupo de substâncias com atividade defensiva são os glicosídeos cianogênicos, produzidos em alguns tecidos vegetais. A ocorrência de cianogênese já foi verificada em mais de 3000 espécies de plantas, pertencentes a 110 famílias diferentes (ESEN, 1993). Os glicosídeos cianogênicos são normalmente sintetizados em uma forma inócua e, quando hidrolisados, liberam cianeto ou ácido prússico, que possui efeito inibitório sobre citocromos da cadeia de transporte de elétrons (HARBORNE, 1993). Os tecidos cianogênicos podem conter β -glicosidases envolvidas na hidrólise dos glicosídeos cianogênicos, produzindo os compostos tóxicos que se acumulam nos tecidos.

A produção de glicosídeos cianogênicos em tecidos vegetais é estritamente controlada e o armazenamento destes é feito de modo a evitar o contato com β -glicosidases capazes de hidrolisá-los (SELMAR, 1993). Um caso bem conhecido é aquele encontrado em *Trifolium repens*. Esta planta possui uma β -glicosidase apoplástica (linamarase) capaz de hidrolisar o principal glicosídeo cianogênico, linamarina, que ocorre em vacúolos, livres de atividade β -glicosidásica (KAKES, 1993). A lesão do tecido vegetal pelo predador permite o contato da linamarase apoplástica com a linamarina vacuolar e a conseqüente produção de cianeto. Por outro lado, na planta em desenvolvimento, o transporte deste glicosídeo do endosperma até os tecidos do cotilédone envolve a conversão da linamarina, um mono-glicosídeo, em linustatina, um di-glicosídeo. Esta interconversão em um produto não metabolizável garante que, ao ser transportado através da parede celular, o glicosídeo tóxico não seja hidrolisado pela linamarase apoplástica (SELMAR, 1993).

Outro fenômeno envolvendo compostos cianogênicos de plantas e β -glicosidases ocorre em larvas da mariposa *Zygaena trifolii*. Este inseto possui uma β -glicosidase na hemolinfa. Também na hemolinfa, podem ser encontrados glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina), sintetizados pelo inseto ou sequestrados da dieta a partir de *Lotus corniculatus* (Fabaceae) que também acumula estes glicosídeos. Apesar de estarem localizados no mesmo tecido, não ocorre produção de cianeto na hemolinfa. Isto é garantido

pela inibição da β -glicosidase pela presença de íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (inibição competitiva) e pelo pH alcalino no meio. Entretanto, quando pássaros, lagartos ou roedores alimentam-se deste inseto, ocorre a ativação desta linamarase no estômago ácido deste animais e a conseqüente produção de cianeto pela hidrólise dos glicosídeos cianogênicos, levando ao efeito repelente (NAHRSTEDT & MUELLER, 1993).

1.5 β -Glicosidases em insetos

As β -glicosidases encontradas no tubo digestivo de insetos têm sido descritas como solúveis luminais (MARANA *et al.*, 1995 ; BAKER & WOO, 1992 ; TERRA *et al.*, 1985), ligadas à membrana microvilar do enterócito (FERREIRA & TERRA, 1983) ou ainda como enzimas solúveis associadas ao glicocálix (SANTOS & TERRA, 1985 ; FERREIRA *et al.*, 1990 ; FERREIRA *et al.*, 1994a).

Estas β -glicosidases devem participar da digestão final de celulose (se o inseto possuir uma atividade de celulase), hemicelulose, glicoproteínas e glicosilceramidas (TERRA & FERREIRA, 1994). Além do papel digestivo, parecem também participar de mecanismos de resistência contra glicosídeos tóxicos de plantas (LINDROTH, 1992 ; YU, 1989).

TERRA & FERREIRA (1994) dividiram as β -glicosidases de insetos em três classes, com base na especificidade das mesmas pelo substrato. A classe 1 inclui as enzimas com atividade de glicosil β -glicosidase (ativas sobre di e oligossacarídeos) e aril β -glicosidase (ativas sobre um monossacarídeo ligado a um aglicone hidrofóbico que não é um carboidrato). A classe 2 inclui enzimas somente com atividade de glicosil β -glicosidase. Já a classe 3 compreende as enzimas apenas com atividade de aril (ou alquil) β -glicosidase.

As enzimas da classe 1 são conhecidas em *Erinnyis ello* (SANTOS & TERRA, 1985), *Rhynchosciara americana* (FERREIRA & TERRA, 1983), *Abracris flavolineata* (MARANA *et al.*, 1995), *Tenebrio molitor*, *Pheropsophus aequinoctialis*, *Scaptotrigona bipunctata* (FERREIRA *et al.*, 1998), *Phorocantha semipunctata* (CHARARAS & CHIPOULET, 1982) e *Rhagium inquisitor* (CHIPOULET & CHARARAS, 1985).

As β -glicosidases da classe 2 foram parcialmente caracterizadas em *Locusta migratoria* (MORGAN, 1975), *Sitophilus oryzae* (BAKER & WOO, 1992) e *Tenebrio molitor* (FERREIRA *et al.*, 1998); ao passo que as β -glicosidases da classe 3 foram descritas em *Sitophilus oryzae* (BAKER & WOO, 1992), *Thaumetopoea pityocampa* (PRATVIEL-SOSA *et al.*, 1987), *Calliphora erythrocephala* (EVANS, 1956), *Abracris flavolineata* (MARANA *et al.*, 1995), *Pheropsophus aequinoctialis* e *Scaptotrigona bipunctata* (FERREIRA *et al.*, 1998).

A classificação das β -glicosidases de insetos proposta acima foi baseada em um número pequeno de trabalhos, devendo sofrer modificações à medida que novos trabalhos forem sendo desenvolvidos. Um exemplo de complicações a serem encontradas foi fornecido por MARANA *et al.* (1995), trabalhando com β -glicosidases de *Abracris flavolineata*. Neste inseto foram caracterizadas três β -glicosidases com Mr 82 K. A atividade majoritária era capaz de clivar celobiose, possuindo também um segundo sitio capaz de hidrolisar aril-glicosídeos (celobiase-aril β -glicosidase). Foi encontrada uma segunda β -glicosidase com atividade sobre octil β glu, que pode ser ativada por moléculas anfipáticas (alquil β -glicosidase). Além destas, foi encontrada uma terceira enzima minoritária, ativa sobre NP β Glu (aril β -glicosidase).

Tenebrio molitor, *Pheropsophus aequinoctialis*, *Scaptotrigona bipunctata* (FERREIRA *et al.*, 1998) e *Locusta migratoria* (MORGAN, 1975) apresentam β -galactosidases típicas, ou seja, enzimas com atividade exclusiva sobre β -galactosídeos (NP β Gal). Entretanto, em alguns organismos, é possível encontrar atividade de β -galactosidase associada minoritariamente à atividade de β -glucosidase, como ocorre em *Erinnyis ello* (SANTOS & TERRA, 1985) e *Rynchosciara americana* (FERREIRA & TERRA, 1983).

Possivelmente os substratos naturais de β -galactosidases de insetos são galactolipídios, como o monogalactosildiglicerídeo, principal componente da membrana dos tilacóides de cloroplastos de células vegetais (HARWOOD, 1980).

Os Lepidoptera representam uma ordem aparentemente bastante homogênea, no entanto são bastante diversificados no que se refere às β -

glicosidases. *Erinnyis ello* possui uma única β -glicosidase que cliva vários substratos no mesmo sítio ativo (SANTOS & TERRA, 1985). Em *Spodoptera frugiperda*, a β -glicosidase digestiva possui duas subunidades com atividade catalítica que se separam em alta força iônica (MARANA *et al.*, 2000a). Já as larvas de *Diatraea saccharalis* apresentam três β -glicosidases com aparente especificidade variada (FERREIRA *et al.*, 1997).

Nos insetos, a ocorrência de várias β -glicosidases intestinais, com diferentes especificidades, pode ser uma adaptação dos ancestrais de diferentes taxa a dietas contendo glicosídeos de plantas (TERRA & FERREIRA, 1994). A maioria dos glicosídeos de plantas possui um aglicone hidrofóbico e devem ser processados principalmente pelas β -glicosidases com sítio ativo hidrofóbico. Como os aglicones são em geral mais tóxicos aos insetos do que seus glicosídeos correspondentes (YU, 1989), a desintoxicação pode ser resultante de uma redução da atividade glicosilceramídica sobre estes. Este controle seria ainda mais eficiente se as atividades de β -glicosidase e glicosilceramidase fossem desempenhadas por diferentes enzimas, já que a redução da atividade glicosilceramídica não afetaria a digestão final de celulose e hemicelulose (FERREIRA *et al.*, 1997).

Os glicosídeos fenólicos estão dentre os glicosídeos tóxicos conhecidos. Uma vez ingeridos por insetos, estes compostos são normalmente hidrolisados por aril β -glicosidases e o aglicone produzido provoca lesões no tubo digestivo (LINDROTH, 1992).

Um estudo com larvas de duas subespécies de *Papilio glaucus* (Lepidoptera) revelou a capacidade de adaptação de uma das subespécies à presença de glicosídeos fenólicos. A subespécie *P. glaucus glaucus*, alimenta-se de plantas que contém glicosídeos cianogênicos (Magnoliaceae), enquanto a subespécie *P. glaucus canadensis*, de plantas com glicosídeos fenólicos (Salicaceae). Estas subespécies não sobrevivem se as plantas das quais naturalmente alimentam-se forem trocadas entre si (LINDROTH, 1988). Glicosídeos fenólicos diminuem o crescimento de larvas de *P. glaucus glaucus*, mas não afetam as larvas de *P. glaucus canadensis*. Este fenômeno se deve à presença de uma esterase, na subespécie resistente (*P. glaucus canadensis*),

que é mais ativa do que na subespécie sensível, sendo rapidamente induzida quando o inseto alimenta-se do glicosídeo. Se inibidor de esterase é adicionado à dieta, a sensibilidade de *P. glaucus glaucus* aumenta (LINDROTH, 1992). A atividade natural de β -glicosidase em *P. glaucus canadensis* corresponde a 1/3 daquela presente em *P. glaucus glaucus*. A ingestão de glicosídeos fenólicos diminui a atividade de β -glicosidase em *P. glaucus canadensis* enquanto em *P. glaucus glaucus* esta atividade sofre aumento. (LINDROTH, 1988)

O mecanismo descrito acima para as larvas de *P. glaucus* sugere uma adaptação da subespécie *P. glaucus canadensis* através da indução de uma esterase (que metaboliza o aglicone fenólico) e redução da atividade de β -glicosidase (que produz o aglicone fenólico). Entretanto, não é possível saber se este inseto possui mais de uma atividade β -glicosidásica. Portanto também não fica claro se o padrão observado é resultado de real diminuição de atividade de uma β -glicosidase, ou de mudança no padrão de expressão de um conjunto de β -glicosidases com diferentes especificidades.

1.6 β -Glicosidases em Diatraea saccharalis

FERREIRA *et al.* (1997) alimentaram larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* com salicina (glicosídeo fenólico) e amigdalina (glicosídeo cianogênico). Essas substâncias não tiveram nenhum efeito sobre o crescimento ou a atividade de β -glicosidase intestinal em *S. frugiperda*. Em *D. saccharalis*, o crescimento foi afetado por ambas as substâncias, embora a sobrevivência fosse inalterada. Os insetos permaneceram na presença de amigdalina por 48 h no fim da vida larval ou durante todo o estágio larval. Em ambos os tratamentos observou-se diminuição da atividade β -glicosidásica, entretanto, as enzimas afetadas em cada um dos tratamentos foram diferentes.

D. saccharalis possui três β -glicosidases que são resolvidas em eletroforese em géis de poliacrilamida em condições não desnaturantes. A enzima de menor migração eletroforética é capaz de hidrolisar celobiose, NP β Glu, e salicina. A enzima de mobilidade intermediária cliva NP β Glu e é a

principal responsável pela hidrólise de salicina. Já a β -glicosidase de maior migração é a enzima mais ativa sobre NP β Glu e celobiose.

Quando as larvas permanecem por 48 horas na presença de amigdalina, as enzimas de mobilidade maior e menor têm sua atividade diminuída. Este fato poderia levar a uma diminuição na cianogênese, uma vez que estas enzimas também clivam amigdalina, porém prejudicaria a digestão de derivados de hemiceluloses. Quando as larvas de *D. saccharalis* são criadas na presença de amigdalina, a enzima de migração intermediária é a que decresce, enquanto a principal enzima responsável pela hidrólise de celobiose atinge níveis próximos do normal.

Os autores supuseram que a inibição da enzima muito ativa sobre salicina (que ocorre apenas quando as larvas permanecem por longo tempo na presença de amigdalina) também levaria a uma diminuição na cianogênese pelo exposto a seguir. A amigdalina, glicose β 1-6 glicose β -mandelonitrila (figura 1), teria a ligação glicose-glicose clivada pelas mesmas enzimas que clivam celobiose. Já a ligação glicose-mandelonitrila, seria clivada pela enzima responsável pela hidrólise de salicina (reprimida após longa exposição ao glicosídeo). A atividade desta enzima sobre amigdalina não foi observada após eletroforese porque ela age somente após a clivagem da ligação glicose-glicose (que produz glicose + prunasina, ver esquema na figura 17A). A redução de atividade da enzima de migração intermediária teria como vantagem a diminuição da cianogênese sem afetar a digestão de derivados de hemiceluloses, permitindo ao inseto o aproveitamento de uma das glicoses existentes na amigdalina. (FERREIRA *et al.*, 1997).

Para averiguar esta hipótese, as β -glicosidases de migração eletroforética maior e menor deveriam ser capazes de clivar gentiobiose (glicose β 1-6 glicose, figura 1) e a enzima de migração intermediária deveria ser bem ativa sobre prunasina (glicose β -mandelonitrila, figura 1). Estas suposições foram testadas experimentalmente, como será apresentado ao longo desta dissertação.

Cellobiose

Gentiobiose

Amigdalina

Prunasina

Mandelonitrila

Figura 1 - Continua na próxima página.

Metilumbeliferil
β-D-glucosídeo

Metilumbeliferil
β-D-galactosídeo

Octil-β-D-glucosídeo

p-Nitrofenil-β-D-glucosídeo

p-Nitrofenil-β-D-galactosídeo

Figura 1 - Estrutura dos glicosídeos utilizados como substrato para as β-glicosidasas de *D. saccharalis*.

1.7 Objetivos deste trabalho

A escolha das larvas de *Diatraea saccharalis* para o desenvolvimento deste trabalho se deu principalmente pelo fato deste inseto possuir 3 β -glicosidases (o que não ocorre em outros Lepidoptera já estudados) e pelo fato de ter sido detectada alteração nos níveis dessas enzimas quando glicosídeos tóxicos são adicionados à sua dieta (FERREIRA *et al.*, 1997).

Este trabalho faz parte de um projeto maior do laboratório, que pretende estudar vários insetos que possuem uma ou várias β -glicosidases. Este estudo amplo tem como objetivo, tanto entender a causa da variação no número de β -glicosidases presentes nos insetos, como elucidar o que levaria às diferenças de especificidade destas enzimas. Neste contexto, este trabalho se propôs a isolar e caracterizar as β -glicosidases de *Diatraea saccharalis*.

O estudo das β -glicosidases de *D. saccharalis* tem o interesse adicional de esclarecer se as diferenças nas especificidades destas enzimas poderiam ser correlacionadas com variações em seus níveis, quando as larvas são submetidas a dietas contendo glicosídeos tóxicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

As larvas de *Diatraea saccharalis* (broca da cana; Lepidoptera: Pyralidae) são provenientes da cultura do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José R. P. Parra. As larvas foram criadas em dieta artificial à base de germe de trigo, farelo de soja, sacarose, sais de Wesson, Nipagin (fungicida), ácido ascórbico (vitamina), cloreto de colina (fator lipogênico), formol (bactericida), Vita Gold, tetraciclina (antibiótico), solução vitamínica, ágar e água destilada (PARRA & MIHSFELDT, 1992). As larvas utilizadas estavam no último ínstar larval e estavam alimentando-se ativamente.

2.2 Dissecção das larvas e obtenção do epitélio ventricular do tubo digestivo

As larvas de *Diatraea saccharalis* eram dispostas sobre gelo picado e, depois de imobilizadas, dissecadas com solução de NaCl 125 mM gelada. O tubo digestivo era retirado e liberado de porções de túbulos de Malpighi e de corpo gorduroso. Os intestinos anterior e posterior eram descartados. O epitélio do intestino médio (ventrículo) era separado da membrana peritrófica e conteúdo alimentar, sendo denominado EV.

2.3 Homogeneização do epitélio ventricular de Diatraea saccharalis

O epitélio ventricular obtido como descrito em 2.2 foi extensivamente lavado em salina gelada e utilizado como fonte de β -glicosidases. O tecido do epitélio ventricular foi homogeneizado em H₂O bidestilada em homogeneizadores do tipo Potter-Elvehjem. O homogenizado foi congelado e descongelado três vezes sendo que na última etapa de congelamento o

material permaneceu no congelador a -20°C durante a noite. Este material foi então centrifugado a $20.500 \times g$ por 30 minutos a 4°C . Desprezou-se o precipitado. O sobrenadante foi recolhido e seu volume foi acertado com H_2O bidestilada em proveta de modo a conter aproximadamente 30 animais/ml no final. Este material foi denominado SEV (sobrenadante de epitélio ventricular). Estas preparações foram armazenadas a -20°C até o uso.

2.4 Ensaios enzimáticos

Exceto quando especificado, os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6,5. A mistura de reação era incubada em banho-maria (30°C) por diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade foi expressa em unidades de absorbância (cromatogramas) ou nmoles de ligação clivada por minuto (mU). As atividades de β -glucosidase e β -galactosidase foram determinadas usando-se como substratos NP β Glu e NP β Gal (respectivamente). Para essas determinações mediu-se a quantidade de p-nitrofenolato (NP) liberada (ver TERRA *et al.*, 1979). As atividades de β -glicosidases também foram determinadas usando-se os seguintes substratos: octil β glu, lactose, laminaribiose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose, amigdalina, gentiobiose e prunasina. Nestes casos a detecção da atividade foi feita quantificando-se a glicose liberada segundo DAHLQVIST (1968). Para octil β glu, que é um detergente, todos os ensaios foram realizados em concentrações abaixo de sua CMC (25 mM). Utilizamos ainda os substratos MU β Glu e MU β Gal, cujo método de detecção é mais sensível, comparado aos métodos colorimétricos supra citados. A hidrólise destes substratos pela ação enzimática produz metilumbeliferona (MU), um composto fluorescente que pode ser quantificado segundo BAKER e WOO (1992). Quando não especificado, a concentração de cada substrato utilizado nos ensaios foi de: NP β Glu 10mM, NP β Gal 10mM, celobiose 7mM, amigdalina 2,5mM, gentiobiose 2,5mM, prunasina 2,5mM, MU β Glu 10mM e MU β Gal 1mM. As estruturas dos

glicosídeos citados neste item estão representadas na figura 1. A detecção de atividade de aminopeptidase foi feita usando LpNA 1mM em tampão fosfato pH 7,8 como substrato. A hidrólise de LpNA foi quantificada através da dosagem da p-nitroanilida liberada, segundo ERLANGER *et al.* (1961).

2.5 Determinação de proteína

As determinações de proteína foram feitas segundo BRADFORD (1976), usando Comassie Blue G como corante e ovoalbumina como padrão. Albumina sérica bovina não é bom padrão neste caso, pois é capaz de ligar mais corante por unidade de massa proteica do que a maioria das proteínas (READ & NORTHCOTE, 1981).

2.6 Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições nativas

Amostras de SEV foram aplicadas em cilindros de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, preparados segundo HEDRICK & SMITH (1968) usando o sistema de DAVIS (1964) em tubos de vidro de 5mm de diâmetro e 10 cm de comprimento. A eletroforese foi desenvolvida a 4°C com uma corrente de 2,5 mA por cilindro. Após a corrida, os géis foram lavados com tampão citrato-fosfato 10 mM pH 6,5 por 1h a 4°C, com agitação e com trocas de tampão a cada 20 minutos. Esta lavagem teve a função de eliminar o Tris presente, pois este composto costuma inibir β -glicosidases (FERREIRA & TERRA, 1983; SANTOS & TERRA, 1985). Em seguida os géis foram fracionados em um fracionador de géis de poliacrilamida, com o mesmo tampão usado na lavagem. Foram coletadas frações de 7 gotas (aproximadamente 200 μ l) que, após permanecerem 3 horas em geladeira a 4°C para eluir as proteínas do gel, eram usadas como fonte de enzimas para ensaios.

2.7 Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e coloração dos géis para detecção de proteínas

As amostras a serem separadas eletroforéticamente, foram previamente dialisadas contra água bidestilada (item 2.27), secas em Speed Vac e ressuspenso em 20 µl de tampão de amostra (composto de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, contendo SDS 2,0% (p/v), 2-β-mercaptoetanol 0,36 M, glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,0025% (p/v)). Antes de iniciar a eletroforese, o material em tampão de amostra foi mantido por 4 min em banho em ebulição para que os polipeptídeos fossem solubilizados.

Utilizando o equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA), a eletroforese foi desenvolvida em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS com o sistema descontínuo de tampões descrito por LAEMMLI (1970). O gel de corrida era 12% em poliacrilamida e o de empilhamento 4%, ambos contendo SDS 0,1%. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 200 V, à temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente, estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa.

Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel em solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,02% (v/v) e submetidas ao método de coloração por prata desenvolvido por BLUM *et al.* (1987). Após a revelação das bandas, o gel era mantido em H₂O bidestilada até ser seco entre duas folhas de papel celofane no secador de gel da Bio-Rad, a 80°C por 2 horas.

O peso molecular das proteínas observadas nesta eletroforese pode ser determinado utilizando como padrões as seguintes proteínas: fosforilase b (97,4 K), albumina sérica bovina (66,2 K), ovoalbumina (45 K), anidrase carbônica (31 K) e inibidor de tripsina de soja (21,5 K).

2.8 Eletroforese em géis de poliacrilamida e detecção de atividade enzimática “in situ”

As amostras a serem separadas eletroforéticamente, foram previamente concentradas por centrifugação em membranas Centriplus Amicon (item 2.25)

e a seguir ressuspensas em 20 µl de tampão de amostra (composto de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, contendo SDS 2,0% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,0025% (p/v)).

A eletroforese foi feita como descrito no item 2.7, exceto a voltagem, que aqui foi de 100 V a 4°C. Ao fim da corrida o gel foi lavado com três trocas (20 min cada) de tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,5. Esta lavagem elimina o SDS e o Tris que é um inibidor de β -glicosidases (FERREIRA & TERRA, 1983 ; SANTOS & TERRA, 1985). Além disso este tampão está no pH ótimo para a atividade das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

O gel foi então incubado na presença de MU β Glu 20mM em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,5 por 30 min a 30°C. A atividade enzimática pode ser evidenciada em transluminador de UV (Manchenko, G. P. 1994).

Após a detecção de atividade enzimática, as proteínas foram fixadas no gel e coradas como descrito no item 2.7.

2.9 Focalização isoeétrica em géis de poliacrilamida

Empregou-se cilindros de gel de poliacrilamida 7% contendo anfolitos pH 3-10 (2%), segundo HAGLUND (1971). A amostra de SEV aplicada possuía glicerol na concentração final de 10% (v/v). Sobre o cilindro de poliacrilamida era colocada uma solução formada por glicerol e anfolito em água. Esta solução evita o contato da amostra diretamente com NaOH presente no banho. A amostra foi aplicada após uma pré- focalização de 30 minutos.

A eletrofocalização foi feita por 2h a 4°C a uma voltagem de 31 V/cm. Ao final desta, os géis experimentais foram fracionados em tampão citrato-fosfato 10mM pH 6,5 e o gel controle em H₂O bidestilada. Foram coletadas frações de 8 gotas (aproximadamente (225 µl). Às frações controle foi adicionado 0,5 ml de H₂O bidestilada por tubo, sendo então mantidas por 3h em temperatura ambiente para eluição. Após este período o pH das frações controle foi medido. As frações experimentais permaneceram 3h em geladeira (4°C) para eluição, e posteriormente foram usadas para os ensaios enzimáticos.

2.10 Cromatografia de hidroxiapatita em sistema de baixa pressão

O volume de 0,65 ml de amostra (SEV) foi aplicado em uma coluna Econo Pac CHT-II (Bio-Rad) equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2. A amostra aplicada também encontrava-se neste tampão.

A corrida foi desenvolvida usando o Econo System - Bio Rad.

A amostra foi eluída através de um gradiente linear simultâneo de molaridade do tampão (10 mM a 400 mM) e de pH (7,2 a 6,8). O volume deste gradiente era de 34 ml. O fluxo utilizado foi de 0,6 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,6 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.11 Cromatografia de afinidade em Sepharose Con A em sistema de baixa pressão

Foi montada uma coluna com 3ml de resina Sepharose Con A 4B (Pharmacia Biotech). A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,5.

A corrida foi desenvolvida usando o Econo System - Bio Rad.

A eluição foi feita através de um gradiente linear de 0 a 150 mM de α -metil-manosídeo. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 1 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.12 Cromatografia hidrofóbica em sistema de baixa pressão

O volume de 0,2 ml de SEV foi aplicado em colunas Econo-Pac Methyl HIC (Bio Rad) , Econo Pac t-Butyl HIC (Bio-Rad) ou Octyl-Sepharose CL 4B (Sigma) equilibradas com 1,7M de sulfato de amônio em tampão citrato-fosfato 100mM pH6,5. Este tampão foi escolhido por ter proporcionado resultados bastante satisfatórios em testes anteriores feitos em nosso laboratório. As

amostras aplicadas eram preparadas de modo a conterem 1,7M de sulfato de amônio antes de serem submetidas à cromatografia.

A corrida foi desenvolvida usando o Econo System - Bio Rad.

As amostras foram eluídas através de um gradiente linear de sulfato de amônio de 1,7 a 0M. O volume do gradiente de eluição era de 20 ml. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 1 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.13 Cromatografia de troca iônica em sistema de baixa pressão

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em uma coluna Econo Pac Q (Bio-Rad) ou Econo Pac High Q (Bio Rad) equilibrada com tampão etanolamina 20 mM pH 9,5. O tampão foi selecionado com base nos pIs das β -glicosidases, estimados por focalização isoelétrica, estando o pH do tampão a mais de duas unidades acima dos pIs determinados. As amostras aplicadas também estavam neste tampão.

A corrida foi desenvolvida usando o Econo System - Bio Rad.

As amostras foram eluídas através de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. O volume deste gradiente era de 22ml. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,5 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.14 Cromatografia hidrofóbica em sistema FPLC

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em colunas Alkyl Superose H/R 5/5 (Pharmacia Biotech) ou Phenyl Superose H/R 5/5 (Pharmacia Biotech) equilibradas com 1,7M de sulfato de amônio em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6,5. As amostras aplicadas eram provenientes de eluições de cromatografias de troca iônica estando em tampão etanolamina 20 mM pH 9,5 contendo NaCl. Antes da aplicação, sulfato de amônio sólido era

adicionado às amostras de modo que a concentração final da preparação fosse de 1,7M de sulfato de amônio.

As amostras foram eluídas através de um gradiente linear de sulfato de amônio de 1,7 a 0M. No caso da coluna Phenyl Superose, uma variação no gradiente de eluição foi incluída. Neste caso o gradiente de eluição foi de 0,75 a 0M de sulfato de amônio. O volume do gradiente de eluição foi de 20 ml. O fluxo da coluna foi de 0,5 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.15 Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q em sistema FPLC

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em colunas Mono Q H/R 5/5 (Pharmacia Biotech) equilibradas com tampão etanolamina 20 mM pH 9,5. O tampão foi selecionado com base nos pls das β -glicosidases, como explicado no item 2.13. As amostras aplicadas também estavam neste tampão.

As amostras foram eluídas através de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. O volume deste gradiente era de 20 ml. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.16 Cromatografia de troca iônica em coluna Mono P em sistema FPLC

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em uma coluna Mono P H/R 5/5 (Pharmacia Biotech) equilibrada com trietanolamina 20 mM pH8,0. As amostras aplicadas também estavam neste tampão.

As amostras foram eluídas através de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M ou 0,2 a 0,6M. O volume deste gradiente era de 20 ml. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.17 Cromatofocalização em coluna Mono P em sistema FPLC

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em uma coluna Mono P H/R 5/5 (Pharmacia Biotech) equilibrada com tampão trietanolamina 20mM pH8,0. As amostras aplicadas também estavam neste tampão.

As amostras foram eluídas através de um gradiente de pH de 8,0 a 5,0 com o uso de Polly Buffer 96 e 74 (Pharmacia Biotech). O volume deste gradiente era de 16 ml. O fluxo da coluna foi de 1 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.18 Filtração em gel em coluna Superdex em sistema FPLC

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech). O tampão de corrida usado foi citrato-fosfato 100mM pH6,5. O fluxo na coluna foi de 0,5 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas pôde ser monitorado espectrofotometricamente a 280nm.

2.19 Filtração em gel em coluna Superose em sistema FPLC e determinação de peso molecular

Os volumes especificados de amostra foram aplicados em uma coluna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia Biotech). Quando não especificado, o tampão de corrida usado foi citrato-fosfato 100mM pH6,5. O fluxo na coluna foi de 0,5 ml/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 ml/tubo. O perfil de eluição das proteínas pôde ser monitorado espectrofotometricamente a 280nm.

Pelo volume de eluição das frações com atividade, pôde-se obter um valor de Mr através do plote desse valor numa curva de calibração, obtida através de cromatografias de amostras contendo proteínas de peso molecular conhecido, que foram aplicadas nas colunas Superose 12. O volume de

eluição dessas proteínas é proporcional ao logaritmo do Mr. Utilizou-se como marcadores: aprotinina (6,5 K), citocromo c (17,3 K), ovalbumina (45 K), albumina sérica bovina (66,2 K), e blue dextran (2.000 K), para o Vo.

2.20 Teste para precipitação de β -glicosidases em presença de sulfato de amônio

Amostras de SEV ou provenientes de eluição da coluna Mono Q foram centrifugadas a 9.100 xg por 10 min em presença de tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,5 e sulfato de amônio 1,7 M. Recolheu-se o sobrenadante e, embora nenhum precipitado fosse visível, o tubo de centrífuga foi lavado com 0,3 ml de H₂O bidestilada, na tentativa de coletar alguma enzima que tivesse precipitado. As atividades enzimáticas do sobrenadante e do possível precipitado sobre NP β Glu foram determinadas.

2.21 Estabilidade das β -glicosidases em pH 9,5

Amostras de SEV foram incubadas por 1h no gelo (controle) e a 30°C (experimentais) em tampão etanolamina 10 mM pH 9,5. Após este período foi determinada a atividade enzimática das amostras sobre NP β Glu, incluindo também um ensaio de uma amostra de SEV não submetida à incubação alguma. As quantidades de SEV empregadas nos ensaios eram sempre as mesmas independentemente da condição a ser analisada.

2.22 Efeito de etanolamina sobre a atividade das β -glicosidases

Amostras de SEV foram incubadas por 1h no gelo ou a 30°C em tampão citrato-fosfato 71 mM pH 6,5 (controle) ou tampão citrato-fosfato 71 mM - etanolamina 28 mM pH 6,5 (experimentais). Após este período foi determinada a atividade enzimática das amostras sobre NP β Glu em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,5 (controle) ou tampão citrato-fosfato 50 mM - etanolamina 20 mM pH 6,5 (experimentais). Realizou-se também um ensaio de amostras de SEV

nas mesmas condições descritas acima, porém não submetidas à incubação prévia. As quantidades de SEV empregadas nos ensaios eram sempre as mesmas independentemente da condição a ser analisada.

2.23 Efeito de trietanolamina sobre a atividade das β -glicosidases

Amostras de SEV foram incubadas por 1h no gelo, à temperatura ambiente (bancada), ou a 30°C em tampão citrato-fosfato 50mM pH 6,5 (controle) ou tampão trietanolamina 25mM pH 8,0. Após este período foi determinada a atividade enzimática das amostras sobre NP β Glu em tampão citrato-fosfato 50mM pH 6,5. As quantidades de SEV empregadas nos ensaios eram sempre as mesmas independentemente da condição a ser analisada. As atividades obtidas foram expressas como percentuais da atividade obtida para a amostra incubada no gelo em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,5.

2.24 Ultracentrifugação em gradiente de densidade

Amostras das β -glicosidases isoladas foram aplicadas no topo de gradientes contínuos de glicerol de 10 ml. Os gradientes, formados com glicerol de 10 a 30% em tampão citrato-fosfato 100mM, pH 6,5, foram centrifugados e fracionados como descrito por TERRA & FERREIRA (1983). Os pesos moleculares foram estimados através do método de MARTIN & AMES (1961) usando hemoglobina (Mr 64.500) e catalase (Mr 232.000) como marcadores.

A fração contendo hemoglobina foi detectada adicionando-se 1ml de água bidestilada a cada um dos tubos que apresentavam coloração, sendo a absorbância medida a 545nm. A catalase foi ensaiada segundo MARTIN & AMES (1961), incubando-se 10 μ l de fração com 145 μ l de H₂O₂ 0,4% em tampão fosfato 50mM, pH 7,5, durante 40 segundos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 2ml de uma solução de KI 10% (p/v). As frações contendo catalase foram detectadas pelo decréscimo de absorbância a 425 nm.

2.25 Concentração das amostras

As amostras foram concentradas através de ultrafiltração em concentradores Centriplus da Amicon. As amostras foram colocadas na parte superior da membrana e o conjunto foi centrifugado a 1500g a 4°C até o volume ser reduzido o quanto fosse necessário. As membranas do Centriplus são permeáveis a moléculas de peso molecular menores que 10 K, assim sendo, sais inorgânicos e tampões não são concentrados.

2.26 Remoção de moléculas de baixo peso molecular por fast desalting

Trocas de tampão e separação de moléculas de alto peso molecular de moléculas de menor peso foram efetuadas submetendo as amostras à coluna HiTrap Desalting (Pharmacia Biotech). Este é um procedimento eficiente e rápido por ser realizado manualmente, com auxílio de seringas. O volume de 1,5 ml de amostra foi aplicado na coluna previamente equilibrada com 10 ml de tampão trietanolamina 20 mM pH 8,0. A eluição foi realizada com 2,0 ml deste mesmo tampão. Este procedimento garantiu a eliminação do sal e presente na amostra inicial, ou a simples troca de tampão da preparação.

2.27 Remoção de moléculas de baixo peso molecular por diálise

A diálise foi feita para eliminar o sal presente nas amostras antes de aplicá-las em eletroforese em SDS-Page. A membrana utilizada é permeável a moléculas de pesos moleculares menores que 12 K. A diálise foi feita contra 100 volumes de H₂O bidestilada, incluindo 2 trocas do solvente.

2.28 Detecção de glicosilação em proteínas

Proteínas glicosiladas foram detectadas com o kit de detecção fornecido pela Boehringer-Mannheim. Proteínas separadas por SDS PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi corada para

detecção de proteínas com Pounceau S. Foi então descorada e ensaiada para detecção das proteínas glicosiladas. As glicoproteínas foram oxidadas com periodato e ligadas a digoxigenina. Este glicoconjugado modificado é detectado através de anticorpo anti-digoxigenina ligado a uma fosfatase, que produz uma banda correspondente à glicoproteína detectada. A detecção foi realizada segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

2.29 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ das β -glicosidases de D. saccharalis para vários substratos e inibição por substrato

O efeito da variação na concentração de substrato sobre a atividade das β -glicosidases foi determinado sempre em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,5 a 30°C.

Foram determinados os parâmetros cinéticos para os substratos NP β Glu NP β Gal, MU β Glu, MU β Gal, lactose, celobiose, gentiobiose, amigdalina, prunasina e octil β glu. Em todos os experimentos, a velocidade de hidrólise foi determinada utilizando-se pelo menos 15 concentrações diferentes para cada substrato. O Programa Sigma-Plot (Jandel Scientific, USA, 1993) foi utilizado para determinar K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima), através do plote de Lineweaver-Burk (SEGEL, 1975).

Quando havia inibição por alta concentração de substrato, os parâmetros foram estimados supondo o modelo cinético a seguir:

2.30 Experimentos de competição entre substratos e determinação de K_i

Em todos os experimentos, incubou-se a enzima na presença de pelo menos 8 concentrações de substrato (no intervalo de 0,1 a 2 Km) e 5 concentrações de inibidor ou substrato-inibidor (no intervalo de 0 a 4 Ki). Em cada uma destas situações foram determinadas as velocidades de hidrólise do substrato, que foram tratadas pelo plote de Lineweaver-Burk. Plotando-se as inclinações das retas obtidas neste plote em função das respectivas concentrações de inibidor é possível determinar K_i , que corresponde à constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (SEGEL, 1975).

2.31 Energia de ligação do substrato no sítio do aglicone

As energias livres de ligação ($-\Delta\Delta G^\circ$) da glicose foram calculadas a partir dos valores de Km para a hidrólise de oligocelodextrinas, usando a equação abaixo:

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -RT \ln (1/K_m) \quad \text{onde,} \\ R &= 8,3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \\ T &= 303 \text{ }^\circ\text{K}\end{aligned}$$

A energia livre de ligação correspondente a cada subsítio ($-\Delta\Delta G^\circ/\text{subsítio}$) foi calculada usando a equação:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G^\circ_n &= \Delta G^\circ_n - \Delta G^\circ_{n-1} \quad \text{onde,} \\ n &= \text{número do subsítio}\end{aligned}$$

Com os substratos de que dispomos, podemos obter a energia de ligação nos subsítios +2, +3 e +4.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação qualitativa da especificidade das três β -glicosidases intestinais de D. saccharalis

Antes de estabelecer uma marcha de purificação para as três β -glicosidases de *D. saccharalis*, para posteriores estudos cinéticos, verificamos, de maneira qualitativa, as especificidades de cada uma das enzimas por diferentes substratos.

Uma amostra de SEV, preparada como descrito no item 2.3, foi submetida à eletroforese em condições nativas (item 2.6) e o material eluído foi ensaiado com vários substratos (item 2.4). Os resultados estão apresentados na figura 2.

Podemos verificar que a enzima responsável pela clivagem de amigdalina (maior migração eletroforética) é a mesma que cliva gentiobiose e também NP β Glu. Essa enzima também é uma das responsáveis pela quebra de celobiose e provavelmente de vários dissacarídeos naturais resultantes da quebra de hemiceluloses. Por outro lado, a enzima de migração intermediária, que cliva prunasina (e que portanto gera o composto cianogênico) e NP β Gal, é também responsável pela clivagem de salicina, outro glicosídeo de plantas (FERREIRA *et al.*, 1997) e não cliva celobiose. A enzima de menor migração eletroforética não apresenta atividade detectável sobre prunasina e gentiobiose, tendo baixa atividade sobre amigdalina, NP β Glu e NP β Gal. Assim como a enzima de maior migração eletroforética, esta enzima parece ser responsável pela hidrólise de celobiose.

3.2 Purificação das β -glicosidases de D. saccharalis

Como material inicial, utilizamos sempre o SEV porque praticamente nenhuma atividade é encontrada no lúmen intestinal. Quando o homogeneizado do epitélio (EV) é congelado-descongelado e centrifugado, a

Figura 2 - Atividade de β -glicosidasas de *D. saccharalis* sobre vários substratos, após separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% sob condições nativas.

maioria absoluta da atividade é encontrada no sobrenadante (dados não mostrados). Provavelmente essas enzimas encontram-se adsorvidas ao glicocálix celular, como foi mostrado nos Lepidoptera *Erinnyis ello* (SANTOS *et al.*, 1986) e *Spodoptera frugiperda* (FERREIRA *et al.*, 1994a).

3.2.1 Estabelecimento dos passos iniciais da marcha de purificação

Iniciamos a purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis* utilizando cromatografias em sistema de baixa pressão (Econo System, Bio Rad). A primeira coluna testada foi a de hidroxapatita (item 2.10), que tem como princípio a adsorção de proteínas a grupos fosfato em sua matriz (HARRIS & ANGAL, 1989). Passos cromatográficos em colunas de hidroxapatita têm sido utilizados para a purificação de β -glicosidases (GLEW *et al.*, 1993 ; DANIELS *et al.*, 1981). No caso de *D. saccharalis*, esta coluna foi ineficaz como passo de purificação, já que tanto as β -glicosidases como a maioria das outras proteínas do extrato foram recuperadas no lavado, antes da passagem do gradiente de eluição, não interagindo com a matriz da coluna.

Dados da literatura mostram que β -glicosidases de diversos organismos foram purificadas com o uso de cromatografias hidrofóbicas ou outros métodos também baseados em hidrofobicidade. BAKER & WOO (1992) purificaram parcialmente uma β -glicosidase de *Sitophilus oryzae*, através de precipitação com sulfato de amônio. LAMARCO & GLEW (1986) isolaram uma β -glicosidase de porco através de cromatografia hidrofóbica em octyl-sepharose. Resolvemos então testar cromatografias hidrofóbicas no sistema de baixa pressão como primeiro passo para a purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

Como as amostras devem ser aplicadas nestas colunas com uma concentração muito elevada de sulfato de amônio, corre-se o risco das proteínas precipitarem e saírem de solução. Por isso, antes da cromatografia, testamos a solubilidade das β glicosidases em presença desta concentração de sal (item 2.20). Após a centrifugação, o sobrenadante continha 83% da atividade enzimática inicial sobre NP β Glu, enquanto o precipitado não

apresentou atividade enzimática. Isso mostra que não houve precipitação das β -glicosidases nesta concentração de sulfato de amônio.

Uma amostra de SEV (item 2.3) foi aplicada na coluna Octyl Sepharose, sendo a corrida desenvolvida como descrito no item 2.12. Nesta coluna, as três β -glicosidases foram eluídas em baixas concentrações de sulfato de amônio e parcialmente separadas entre si. Esta separação parcial das três enzimas apresenta duas desvantagens principais. A primeira delas é que não seria possível obter as três enzimas separadamente, já neste passo, pois certamente cada enzima ainda estaria contaminada pelas demais. A segunda desvantagem é que, comparada à Econo Pac Q (também testada como primeiro passo de purificação, ver a seguir), em que as três enzimas são eluídas juntas, o volume no qual as enzimas são eluídas é muito grande e, ao mesmo tempo, uma maior quantidade de proteínas estaria contaminando a preparação. Além disso a recuperação obtida foi menor. Testes com as colunas Econo-Pac Methyl HIC e Econo Pac t-Butyl HIC desenvolvidas do mesmo modo que a Octyl Sepharose (item 2.12), resultaram em preparações com características muito parecidas com as citadas acima. Por estes motivos resolvemos abandonar a idéia de incluir uma cromatografia hidrofóbica do sistema de baixa pressão na marcha de purificação das β -glicosidases.

Uma terceira tentativa, ainda no sistema de baixa pressão (Econo System, Bio Rad), foram cromatografias de troca aniônica Econo Pac Q e Econo Pac High Q (item 2.13). Para serem aplicadas nas colunas de troca aniônica, as proteínas devem estar em um tampão com pH pelo menos uma unidade acima do pI da proteína de interesse, para aumentar a interação com as cargas positivas da matriz da coluna. Os pIs das β -glicosidases em uma amostra de SEV foram determinados (item 2.9), estando todos no intervalo de pH 7,0 a 7,5 (resultado não mostrado). Assim sendo, utilizamos o tampão etanolamina 20 mM pH 9,5, pois havia sido previamente utilizado em colunas de troca iônica com bastante eficiência em nosso laboratório. A estabilidade em pH 9,5 e o efeito de etanolamina sobre as β -glicosidases foram testados (itens 2.21 e 2.22 respectivamente) e verificamos que a atividade destas enzimas não é afetada por nenhuma das duas condições.

SEV de *D. saccharalis* foi aplicado na coluna Econo Pac Q, sendo a corrida desenvolvida como descrito no item 2.13. Esta cromatografia não permitiu a resolução das atividades das três β -glicosidases, como pode ser observado na figura 3A. No entanto, obtivemos um enriquecimento de 3,2 vezes (tabela 1) e a recuperação de 95% da atividade sobre NP β Glu, 90% sobre NP β Gal e 83% sobre celobiose, resultando em um bom passo de purificação. A recuperação de 65% apresentada na tabela 1 foi aquela obtida após a concentração da amostra (item 2.25) antes do próximo passo cromatográfico, por isso temos um valor mais baixo.

A coluna Econo Pac High Q possui o mesmo princípio da Econo Pac Q, no entanto sua capacidade é aproximadamente 3 vezes maior. Desenvolvemos esta cromatografia nas mesmas condições descritas para a Econo Pac Q (item 2.13). Neste caso, as β -glicosidases são parcialmente resolvidas com recuperações muito mais baixas.

Sendo assim, estabelecemos a Econo Pac Q como primeiro passo de purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

Como etapa subsequente de purificação, incluímos uma cromatografia de troca aniônica Mono Q em FPLC (item 2.15). Apesar de estarmos aplicando os mesmos princípios de separação usados no primeiro passo da marcha de purificação, o FPLC é um sistema cuja resolução é muito melhor do que a do sistema de baixa pressão.

O conjunto de frações com atividade enzimática, eluído da Econo Pac Q, (frações 33 a 41) foi reunido e aplicado na coluna Mono Q. A corrida foi desenvolvida como descrito no item 2.15. Esta cromatografia também não permitiu a resolução das atividades das três β -glicosidases (figura 3B). No entanto, através de análise do perfil de eluição das proteínas, observa-se que este passo também exclui uma quantidade razoável de proteínas, com enriquecimento de 4,1 vezes em relação ao passo anterior (tabela 1). A recuperação da atividade enzimática foi de 94% com NP β Glu como substrato, 71% com NP β Gal e 94% com celobiose. A coluna Mono Q foi então

Figura 3 – Cromatografias em coluna de troca iônica das β -glicosidases de *D. saccharalis*. (A) SEV foi aplicado em coluna Econo Pac Q e eluído com gradiente crescente de NaCl. (B) Frações ativas de (A) foram reunidas e aplicadas em coluna Mono Q, sendo eluídas com gradiente crescente de NaCl. Tampão utilizado: etanolamina 20 mM, pH 9,5. Frações ensaiadas (○), quando apresentaram atividade foram reunidas (●) e aplicadas no passo subsequente. (---) Absorbância a 280 nm. (—) Gradiente de NaCl. Substrato utilizado: NPβGlu.

Tabela 1 – Rendimentos da marcha de purificação das β -glicosidasases de *D. saccharalis*¹.

Amostra	Atividade total (mU)	Proteína total (mg)	Atividade específica (mU/mg)	Enriquecimento	Recuperação (%)
SEV	4180	200	21	1	100
Econo Pac Q	2700	40	68	3,2	65
Mono Q	2540	9,1	280	13	61

ENZIMA 1

Phenyl Superose I ²	1570	0,74	2100	100	37
Superose 12 I	1060	0,29	3640	172	25
Mono P I	690	0,20	3470	165	17

ENZIMA 2

Phenyl Superose II ²	400	0,31	1290	61	9,6
Superose 12 II	150	0,11	1350	64	3,5

ENZIMA 3

Phenyl Superose III ²	54	0,18	300	14	1,3
Mono P III	36	0,10	361	17	0,87

¹ A Recuperação e o enriquecimento foram calculados em relação à atividade inicial em SEV.

² A Recuperação total da coluna Phenyl Superose foi de 48% (em relação ao SEV).

estabelecida como segundo passo na marcha de purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

Como terceiro passo de purificação, pretendíamos incluir cromatografias hidrofóbicas em sistema FPLC, pois assim estaríamos separando as proteínas por um princípio bastante diferente. Para tanto, testamos a eficiência da Alkyl Superose e da Phenyl Superose quanto à capacidade de separação das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

O conjunto de frações com atividade β -glicosidásica, eluído da Mono Q, foi aplicado em coluna de Alkyl Superose do FPLC. A eluição foi feita com um gradiente de sulfato de amônio de 1,7 M a 0 M, sendo a corrida executada segundo o item 2.14. As recuperações totais de atividade enzimática foram de 64% com NP β Glu como substrato, 53% com NP β Gal e 57% com celobiose.

A mesma amostra eluída da Mono Q também foi aplicada em coluna de Phenyl Superose do FPLC. A eluição foi realizada com gradiente igual ao usado na Alkyl Superose, seguindo as descrições apresentadas no item 2.14. As recuperações totais de atividade enzimática foram de 80% com NP β Glu como substrato, 77% com NP β Gal e 65% com celobiose.

As duas colunas hidrofóbicas foram capazes de resolver as atividades de β -glicosidase presentes no tubo digestivo de *D. saccharalis*. No entanto, a Phenyl Superose apresentou melhor separação das três atividades e maior recuperação para os três substratos ensaiados. As diferenças de comportamento das β -glicosidases nestas duas colunas são provavelmente devidas às diferenças de hidrofobicidade das matrizes.

A coluna Phenyl Superose foi estabelecida como terceiro passo na marcha de purificação das β -glicosidases deste Lepidoptera. Uma vez que as β -glicosidases eluíram no final do gradiente de sulfato de amônio, repetimos esta cromatografia eluindo as proteínas com um gradiente mais estreito de sulfato de amônio (0,75 a 0M), com o objetivo de eliminar uma maior quantidade de contaminantes e melhorar ainda mais a separação das três enzimas. O resultado foi satisfatório e não houve alteração nas recuperações

de atividade enzimática. Os perfis de atividades enzimáticas e de proteína estão apresentados na figura 4.

As frações ativas correspondentes a cada uma das três β -glicosidases foram reunidas separadamente e denominadas de enzima 1 (E1), enzima 2 (E2) e enzima 3 (E3), segundo a ordem de eluição na cromatografia (figura 4). As enzimas de menor e maior hidrofobicidade correspondem a E1 e E3 respectivamente.

Através dos ensaios das frações eluídas da Phenyl com vários substratos (figura 4), foi possível associar as atividades resolvidas por esta técnica com aquelas identificadas por eletroforese em condições nativas (figura 2). O ensaio com NP β Gal mostrou que a enzima de hidrofobicidade intermediária (E2) corresponde à enzima de migração eletroforética intermediária, pois apresentou atividade majoritária sobre este substrato nos dois casos. A enzima 1 (E1) é a enzima de maior migração eletroforética, uma vez que corresponde à atividade majoritária sobre NP β Glu e celobiose. Já a enzima 3 (E3) corresponde à enzima de menor mobilidade eletroforética, com atividade minoritária sobre NP β Glu, quando comparada às outras duas.

Uma vez separadas as três β -glicosidases, seguimos com procedimentos distintos para purificar cada uma das enzimas em questão

3.2.2 Purificação da β -glicosidase 1 de *D. saccharalis*

O material eluído da coluna Phenyl Superose correspondente à E1 teve recuperação de 62% e enriquecimento de 7,7 vezes em relação ao passo anterior (Mono Q).

Esta preparação foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel em Superose 12 HR 10/30, sendo a corrida desenvolvida como descrito no item 2.19. Os perfis de atividade sobre NP β Glu e de proteína estão apresentados na figura 5A. Este passo teve recuperação de 68% da atividade enzimática e enriquecimento de 1,7 vezes em relação ao passo anterior (tabela 1).

Figura 4 – Cromatografia em coluna Phenyl Superose das frações reunidas da coluna Mono Q (figura 3B). As frações eluídas foram ensaiadas com diferentes substratos, o que permitiu associá-las aos picos separados por eletroforese. (○, ●) Atividade sobre diferentes substratos; (●) Frações reunidas; (—) gradiente de sal; (---) Perfil de proteína.

Figura 5 – Etapas da marcha de purificação da enzima 1. (A) Cromatografia em coluna Superose 12 equilibrada com tampão citrato fosfato 100 mM, pH 6,5. (B) SDS PAGE das frações ativas eluídas do passo (A) aplicadas independentemente em cada raia. A intensidade das bandas de proteína acompanha a atividade em (A); P – padrões de peso molecular. (C) Cromatografia de troca iônica em coluna Mono P (tampão trietanolamina 20 mM, pH 8,0, com eluição em gradiente de 200 a 600 mM de NaCl) das frações ativas eluídas da Superose 12 (A). Substrato ensaiado: NPβGlu. (○, ●) Frações ensaiadas; (●) Frações reunidas (frações 30 a 34 para Superose 12, e frações 28 a 32 para Mono P); (—) gradiente de NaCl; (---) Perfil de proteína.

A fim de verificar o grau de purificação da preparação, cada uma das frações ativas sobre NP β Glu provenientes da filtração em gel em Superose foi submetida individualmente a SDS-PAGE corado por prata (item 2.7). A figura 5B mostra que foi possível associar uma banda de proteína à atividade de β -glicosidase e que a preparação estava praticamente pura, restando ainda alguns contaminantes bastante minoritários.

Como último passo na marcha de purificação de E1, introduzimos uma cromatografia em Mono P (Pharmacia-Biotech). Esta matriz é normalmente utilizada como cromatofocalização, podendo também ser utilizada como troca aniônica. Na tentativa de introduzir um novo princípio na marcha de purificação, reunimos as frações ativas sobre NP β Glu eluídas da Superose e submetemos à cromatofocalização (item 2.17). Antes desta cromatografia foi feita a troca de tampão da amostra (fast desalting, item 2.26). Verificamos que trietanolamina (tampão utilizado nesta cromatografia) não afeta as β -glicosidases de *D. saccharalis* (ensaio feito como descrito no item 2.23). O intervalo de pH de 8,0 a 5,0 foi escolhido em função dos pIs das β -glicosidases intestinais deste inseto (7,0 a 7,5 ; resultados não mostrados). Nestas condições, a enzima deveria ser eluída mais ou menos no meio do gradiente de pH, como recomendado nos catálogos da Pharmacia. Após a cromatofocalização não foi possível detectar atividade de β -glicosidase. Esta atividade foi recuperada após eluição com NaCl 1M em tampão trietanolamina 20mM pH 8,0, com recuperação em torno de 65%.

Uma vez que a cromatofocalização não foi bem sucedida, optamos por utilizar a coluna Mono P como troca aniônica (item 2.16). A atividade de E1 proveniente da Superose foi então submetida a este procedimento. O perfil de atividade sobre NP β Glu está apresentado na figura 5C. Obtivemos recuperação de 68% em relação ao passo anterior, sem enriquecimento significativo.

Amostras correspondentes a cada um dos passos desta marcha de purificação foram submetidas a SDS-PAGE (figura 6). O resultado mostra que em cada um dos passos introduzidos foi possível eliminar quantidade significativa de contaminantes e que a troca iônica em Mono P resultou em

Figura 6 – SDS PAGE dos passos de purificação da β -glicosidase 1 de *D. saccharalis*. A – SEV; B – Frações reunidas após cromatografia em coluna Econo Pac Q; C – Frações reunidas após cromatografia em coluna Mono Q; D – Frações de E1 ativas após cromatografia em coluna Phenyl Superose; E – Frações ativas eluídas da cromatografia em coluna Superose 12; F – Frações ativas eluídas da cromatografia em coluna Mono P. Padrões de peso molecular: inibidor de tripsina de soja (21 K); anidrase carbônica (31 K); ovoalbumina (45 K); albumina sérica bovina (66 K); fosforilase b (97 K).

uma preparação purificada até a homogeneidade. O peso molecular relativo (Mr) de E1 determinado por SDS-PAGE foi de 58 K.

3.2.3 Purificação da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis*

O material eluído da coluna Phenyl Superose correspondente à E2 teve recuperação de 16% e enriquecimento de 4,7 vezes em relação ao passo anterior (Mono Q).

Quando submetido a SDS-PAGE (figura 8, raia D), o material proveniente da Phenyl Superose apresentou duas bandas majoritárias de proteína: uma de 61,5 K e outra de 107 K. Tentamos a separação destas por filtração em gel em Superdex 75 HR 10/30 (item 2.18). Esta coluna não é capaz de resolver proteínas com Mr maior que 75 K, sendo estas eluídas no volume de exclusão da coluna. Desta forma separaríamos facilmente as duas bandas. Após esta cromatografia não foi detectada atividade de β -glicosidase em nenhuma das frações, mesmo após eluição com NaCl 1M. Provavelmente a enzima foi inativada durante o processo.

Optamos então pela filtração em gel em Superose, uma vez que esta coluna havia funcionado bem para E1. O volume de 0,5 ml da preparação proveniente da Phenyl Superose foi submetido a uma cromatografia de filtração em gel em Superose 12 HR 10/30, sendo a corrida desenvolvida como descrito no item 2.19. Os perfis de atividade sobre NP β Glu e de proteína estão apresentados na figura 7A. Este passo teve recuperação de 37% da atividade enzimática e enriquecimento de 1,05 vezes em relação ao passo anterior (tabela 1).

Cada uma das frações ativas sobre NP β Glu provenientes da filtração em gel em Superose foi submetida individualmente a SDS-PAGE (item 2.7). A figura 7B mostra que foi possível associar a banda de proteína de 61,5 K à atividade de β -glicosidase. Ensaio enzimáticos com substratos colorimétricos específicos (item 2.4) revelaram que a banda de 107 K apresenta atividade de aminopeptidase. Esta proteína também é purificada após a Superose, eluindo

Figura 7 – Purificação da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis*. As frações ativas da enzima 2 eluídas da coluna Phenyl Superose foram reunidas e aplicadas em coluna Superose 12 equilibrada com tampão citrato fosfato 100 mM, pH 6,5 (A). As frações ativas sobre NP β Glu eluídas da coluna Superose 12 foram aplicadas individualmente em SDS PAGE (B). É possível correlacionar uma banda de proteína com a atividade de β -glicosidase. (○,●) Frações ensaiadas; (●) Frações ativas reunidas (frações 29 a 31); (---) Perfil de proteína. P – Padrões de peso molecular.

Figura 8 – SDS PAGE das etapas de purificação da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis*. A – SEV; B – Frações reunidas após cromatografia em coluna Econo Pac Q; C – Frações reunidas após cromatografia em coluna Mono Q; D – Frações ativas de E2 após cromatografia em coluna Phenyl Superose; E – Frações reunidas após cromatografia em coluna Superose 12. Padrões de peso molecular: ver figura 6.

algumas frações antes da β -glicosidase 2. As frações da Superose mais ativas sobre NP β Glu foram reunidas.

Amostras correspondentes a cada um dos passos da marcha de purificação de E2 foram submetidas a SDS-PAGE (figura 8). O resultado mostra que em cada um dos passos introduzidos foi possível eliminar quantidade significativa de contaminantes e que a filtração em gel em Superose resultou em uma preparação purificada até a homogeneidade. Como comentado anteriormente, o peso molecular relativo de E2 determinado por SDS-PAGE foi de 61,5 K.

Observamos que a recuperação de atividade enzimática sobre NP β Gal após a cromatografia em Mono Q (figura 3B) é significativamente menor do que para outros substratos ensaiados. Sabemos que a clivagem de NP β Gal neste material é majoritariamente devida à ação de E2 (ver figura 4). Assim sendo, E2 deve ser menos estável do que as outras duas β -glicosidases, quando submetidas a esta cromatografia. Além disso, a preparação de E2 purificada apresentou grande instabilidade ao ser armazenada a -20°C . Alguns compostos como glicerol e 2- β -mercaptoetanol são capazes de aumentar a estabilidade de enzimas (VOLKIN & KLIBANOV, 1990). Amostras de E2 foram armazenadas por 24h a -20°C e 4°C na presença de várias concentrações de glicerol ou 2- β -mercaptoetanol. Após este período foi determinada a atividade enzimática remanescente em cada uma das situações (resultados não mostrados). Verificamos que a melhor condição para armazenamento de E2 é a -20°C na presença de glicerol 20% v/v. Nesta situação praticamente não ocorre perda de atividade enzimática. As preparações de E2 purificadas passaram a ser armazenadas sempre desta forma.

3.2.4 Purificação da β -glicosidase 3 de *D. saccharalis*

O material eluído da coluna Phenyl Superose correspondente à E3 teve recuperação de 2% e enriquecimento de 1,1 vezes em relação ao passo

Figura 9 – Purificação da β -glicosidase 3 de *D. saccharalis*. As frações ativas da enzima 3, eluídas da coluna Phenyl Superose, foram reunidas e aplicadas em coluna Mono P, equilibrada com tampão trietanolamina 20 mM, pH 8,0. A eluição foi feita com um gradiente de NaCl de 0,2 a 0,4 M (A). As frações ativas da enzima 3, eluídas da coluna Mono P, foram aplicadas individualmente em SDS PAGE (B). É possível correlacionar uma banda de proteína com a atividade de β -glicosidase. (○, ●) Frações ensaiadas; (●) Frações ativas reunidas (frações 26 a 30); (---) Perfil de proteína. P – padrões de peso molecular.

Figura 10 – SDS PAGE das etapas de purificação da β -glicosidase 3 de *D. saccharalis*. A – SEV; B – Frações reunidas após cromatografia em coluna Econo Pac Q; C – Frações reunidas após cromatografia em coluna Mono Q; D – Frações ativas de E3 após cromatografia em coluna Phenyl Superose; E – Frações reunidas após cromatografia em coluna Mono P. P - Padrões de peso molecular: ver figura 6.

anterior (Mono Q). Em SDS-PAGE observamos que esta preparação ainda continha vários contaminantes (figura 10, raia D).

O material proveniente da Phenyl Superose foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em Mono P, uma vez que esta cromatografia funcionou bem na marcha de purificação da enzima 1 (item 3.2.2). A corrida foi desenvolvida como descrito no item 2.16. Os perfis de atividade e de proteína estão apresentados na figura 9A. Este passo teve recuperação de 67% da atividade enzimática e enriquecimento de 1,2 vezes em relação ao passo anterior (tabela 1).

Cada uma das frações com atividade de β -glicosidase provenientes da troca aniônica em Mono P foi submetida individualmente a SDS-PAGE (item 2.7). A figura 9B mostra que foi possível associar uma banda de proteína de 61,5 K à atividade de β -glicosidase e que a enzima não foi purificada até a homogeneidade.

Amostras correspondentes a cada um dos passos da marcha de purificação de E3 foram submetidas a SDS-PAGE (figura 10). O resultado mostra que em cada um dos passos introduzidos foi possível eliminar quantidade significativa de contaminantes e que a troca aniônica em Mono P resultou em uma preparação semi-purificada contendo ainda um contaminante de peso molecular relativo muito próximo ao da enzima de interesse. Todas as tentativas de eliminar o contaminante presente na preparação foram infrutíferas.

3.2.5 Resultados finais da purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*

Em todas as marchas de purificação observamos que a cromatografia hidrofóbica foi um dos passos mais eficientes, pois eliminou uma grande quantidade de proteínas contaminantes das preparações, apesar da Mono Q também ter levado a uma boa redução das mesmas (ver figuras 6, 8 e 10). Esta observação está de acordo com o fato de existirem na literatura β -glicosidases de diversos organismos purificadas utilizando técnicas com princípios baseados em hidrofobicidade (comentado anteriormente).

A figura 11 apresenta um fluxograma que resume os passos envolvidos na purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

A tabela 1 apresenta o rendimento da marcha de purificação destas enzimas. A marcha foi realizada partindo-se de epitélios ventriculares (EV) de 600 animais (dissecados como descrito no item 2.2), homogeneizados e centrifugados (item 2.3). Verificamos que E1 purificada apresentou recuperação de 17% e enriquecimento de 165 vezes em relação a SEV. E2 teve recuperação de 3,5% e enriquecimento de 64 vezes. E3, por sua vez, teve recuperação de 0,87% e enriquecimento de 17 vezes. As atividades específicas para as enzimas purificadas até a homogeneidade são diferentes entre si (E1: 3,5 U/mg ; E2: 1,4 U/mg). Deve-se ressaltar que as recuperações foram calculadas em relação ao material inicial (SEV), onde as 3 atividades estão presentes. Desse modo, a recuperação real de cada enzima é maior do que a indicada.

Amostras correspondentes aos passos finais das marchas de purificação das três β -glicosidases foram submetidas a SDS-PAGE corado por prata (figura 12A). Foi possível confirmar que E1 e E2 foram purificadas até a homogeneidade e que E2 e E3 apresentam o mesmo Mr (61,5 K), enquanto E1 tem Mr de 58 K. E1 foi ensaiada em gel "in situ" (ver item 2.8) e pudemos confirmar que a proteína purificada (revelada pela coloração por prata) deve ser mesmo a β -glicosidase 1, pois a atividade sobre MU β Glu foi observada em banda de mesmo Mr (figura 12B). Nesta figura, verificamos também que há diferenças na migração em SDS-PAGE e detecção de atividade de E1, se uma mesma preparação é ou não fervida. A amostra fervida migra com Mr de 58 K e não apresenta atividade detectável sobre MU β Glu. A amostra não fervida tem atividade enzimática detectável e migração com Mr bem menor. Nesta última condição, deve ocorrer um menor número de interações entre as moléculas de SDS e a proteína. Como esta enzima tem grande migração eletroforética em condições nativas (figura 2), podemos sugerir que, quando não fervida, sua migração em SDS-PAGE é condicionada não só por seu peso molecular, mas também por sua carga, decorrendo daí a diferença observada. Uma outra possibilidade, poderia ser uma mudança conformacional desta enzima quando fervida.

Figura 11 – Fluxograma representando os passos da marcha de purificação das três β -glicosidases de *D. saccharalis*. As enzimas 1 e 2 foram purificadas até a homogeneidade (ver figuras 6 e 8), enquanto a enzima 3 é altamente enriquecida, porém ainda apresenta proteínas contaminantes (ver figura 10).

Figura 12 – SDS PAGE das β -glicosidasas purificadas de *D. saccharalis* (A): 1 – Enzima 1 (Mr 58 K); 2 – Enzima 2 (Mr 61,5 K); 3 – Enzima 3 (Mr 61,5 K). Asterisco indica banda, em 3, que corresponde à E3. (B) Correlação entre a banda de proteína e a atividade de β -glicosidase sobre MU β Glu para a E1. Proteínas separadas em SDS PAGE foram incubadas com o substrato após a eletroforese. A atividade foi detectada pela fluorescência de metil-umbeliferona (3 e 4). Em seguida, os géis foram corados com prata para detecção de proteína (1 e 2). Enzima nativa (1 e 3), enzima inativa, fervida em tampão de amostra (2 e 4). A enzima nativa apresenta migração eletroforética anômala. Padrões de peso molecular: ver figura 6.

3.3 Caracterização física das β -glicosidases de D. saccharalis

Para a caracterização física das β -glicosidases de *D. saccharalis*, foram utilizadas as preparações purificadas de E1 e E2. Para E3 utilizamos a preparação semi-purificada proveniente da cromatografia de troca iônica em Mono P.

Quando submetidas isoladamente à cromatografia de filtração em gel em Superose (item 2.19), equilibrada com tampão citrato-fosfato 100mM pH 6,5, as três enzimas são eluídas na mesma fração, com Mr estimado em 65 ± 5 K.

Submetendo separadamente cada uma das β -glicosidases à ultracentrifugação em gradiente de densidade (item 2.24), foi possível determinar os seguintes pesos moleculares relativos: 105 ± 5 K para E1; 100 ± 5 K para E2 e 95 ± 5 K para E3 (figura 13). Levando em conta os desvios destas medidas, podemos dizer que também não é possível determinar diferença significativa de pesos moleculares entre as três enzimas, estando todos em torno de 100 K. Este valor é semelhante àquele obtido em *Spodoptera frugiperda* (124 K) com a mesma técnica (FERREIRA *et al.*, 1994b). A β -glicosidase de *S. frugiperda* possui duas subunidades que se associam em baixa força iônica e dissociam-se em alta força iônica (MARANA *et al.*, 2000a). Assim sendo, submetendo-se esta enzima à centrifugação em gradiente de densidade em alta força iônica, o Mr determinado é de 74 K, devido à dissociação das subunidades que a compõem (MARANA *et al.*, 2000a).

Como os pesos moleculares relativos determinados por SDS-PAGE foram muito menores do que aqueles determinados por gradiente de densidade, poderíamos supor que em *D. saccharalis* estivesse ocorrendo o mesmo fenômeno. No entanto os valores de Mr das β -glicosidases, determinados por filtração em gel em coluna Superose (item 2.19) sob força iônica igual à da ultracentrifugação, foram da ordem de 65 K, mostrando que, caso estivesse ocorrendo dimerização, esta certamente não estaria condicionada pela força iônica do meio, mas sim por alguma particularidade da técnica de

Figura 13 – Ultracentrifugação das β -glicosidases intestinais purificadas de *D. saccharalis* em gradiente de glicerol. Padrões de peso molecular: Hb – hemoglobina (Mr 66.000) e Cat – catalase (Mr 232.000). Após ultracentrifugação, o gradiente foi fracionado coletando-se as frações a partir do fundo do tubo, sendo estas ensaiadas com MU β Glu.

ultracentrifugação, por exemplo uma mudança conformacional da enzima nesta condição.

Submetendo-se o material de E3 proveniente da troca iônica em Mono P à filtração em gel em Superose (item 2.19) equilibrada com tampão citrato-fosfato 10mM pH 6,5, ao invés de 100mM, verificamos que esta enzima é eluída em um número muito grande de frações e não mais como um pico estreito no cromatograma. Além disso a recuperação de atividade é menor do que 10%. Isto sugere que, nesta situação, a enzima deve interagir fracamente com a matriz da coluna, retardando parcialmente sua migração. Por isso não é possível observar um pico estreito de eluição. Assim sendo, não foi possível testar se ocorreria dimerização abaixando a força iônica em filtração em gel.

Submetendo separadamente cada uma das β -glicosidases à focalização isoeletrica em cilindros de poliacrilamida (item 2.9), foi possível determinar os seguintes pontos isoeletricos (pI): 7,5 para E1; 7,4 para E2 e 7,4 para E3 (figura 14). Este resultado foi coerente com aquele obtido submetendo-se SEV à mesma técnica (ver item 3.2).

A existência de glicosilação nas β -glicosidases de *D. saccharalis* foi verificada através do kit para detecção de glicoproteínas (Boehringer – Mannheim, item 2.28). Nenhuma das três enzimas deve ser glicosilada, uma vez que não detectamos a presença de glicoproteínas nas posições correspondentes aos M_r 's das β -glicosidases. Antes da evidenciação de glicosilação, a membrana de nitrocelulose foi corada por Ponceau, que evidencia proteínas. Através desta técnica foi possível observar a existência de proteína em quantidade satisfatória, confirmando a inexistência de glicosilação nestas enzimas (resultados não mostrados).

Submetendo as β -glicosidases à cromatografia de afinidade para glicoproteínas – ConA (item 2.11), observamos que estas enzimas não interagem com a matriz da coluna Con A (resultado não mostrado), o que está de acordo com o resultado negativo obtido quando utilizamos o kit de detecção de glicosilação.

Figura 14 - Focalização isoeétrica em cilindros de poliacrilamida das β -glicosidases intestinais purificadas de *D. saccharalis*. O substrato utilizado foi MU β Glu. Enzima 1 $pI=7,5$; Enzima 2 $pI=7,4$; Enzima 3 $pI=7,4$.

3.4 Caracterização cinética das β -glicosidases de D. saccharalis

3.4.1 Caracterização inicial

Assim como na caracterização física, a caracterização cinética das β -glicosidases de *D. saccharalis* foi realizada utilizando as preparações purificadas de E1 e E2. Para E3 utilizamos a preparação semi-purificada proveniente da cromatografia de troca iônica em Mono P.

A atividade enzimática de cada uma das β -glicosidases isoladas sobre MU β Glu (item 2.4) foi medida em valores de pH variando de 3,0 a 10,0. Os valores de pH_o (pH ótimo) encontrados foram: E1: 6,7; E2: 6,3 e E3: 7,2 (figura 15). Esses valores estão muito próximos àqueles obtidos para os Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* - pH_o 7,0 (FERREIRA *et al.*, 1994b) e *Erinnyis ello* - pH_o 6,5 (SANTOS & TERRA, 1985).

MARANA *et al.* (1995) observaram que a alquil β -glucosidase de *Abracris flavolineata* é ativada significativamente por Triton X-100 em concentrações abaixo de sua CMC (0,24 mM) e portanto esta enzima deve ser capaz de se ligar a monômeros de Triton X-100. Dada a especificidade cinética por alquil glicosídeos, seu sítio ativo deve possuir uma porção hidrofóbica que acomoda a porção hidrofóbica do monômero de Triton X-100, conferindo à enzima uma conformação que favorece a hidrólise de NP β Glu.

A atividade enzimática de cada uma das β -glicosidases de *D. saccharalis* isoladas sobre MU β Glu foi medida na presença de concentrações crescentes de Triton X-100, variando de 5 μ M a 1mM. Para este intervalo de concentrações não houve alteração na atividade de nenhuma das três enzimas, nem mesmo para E2, que classificamos como aryl β -glicosidase (ver adiante). Este resultado assemelha-se àquele obtido para uma das β -glicosidases intestinais de *Tenebrio molitor* (FERREIRA, TERRA & FERREIRA, resultados não publicados), porém é contraditório àquele obtido para a alquil β -glicosidase de *Abracris flavolineata* (MARANA *et al.*, 1995).

Para evitar o gasto excessivo de amostra durante os ensaios enzimáticos, principalmente para os substratos colorimétricos (cuja sensibilidade de detecção é menor), testamos a possibilidade de realizar

Figura 15 – pH ótimo das β -glicosidases digestivas de *D. saccharalis*. Enzimas purificadas foram submetidas a ensaio com MU β Glu em diferentes pHs. A – enzima 1; B – enzima 2; C – enzima 3. Tampões utilizados: citrato fosfato 50 mM, pHs 4,0 - 6,5; fosfato 50 mM, pHs 6,5 – 8,0; glicina-NaOH 50 mM, 8,5 – 10.

ensaios de tempos longos. Ensaíamos as três enzimas separadamente em tempos de até 8 horas, usando NP β Glu como substrato. As enzimas se mostraram estáveis para ensaios de até 5 horas. Em tempos mais longos, observa-se gradativa perda de atividade. Assim sendo, 5h foi estabelecido como tempo máximo de ensaio para estas enzimas.

3.4.2 Especificidades das β -glicosidases de *D. saccharalis*

As preparações purificadas das três β -glicosidases foram utilizadas para as determinações dos parâmetros cinéticos K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m para a hidrólise de vários substratos (item 2.29). O valor de k_{cat}/K_m é uma medida da eficiência da enzima sobre o substrato. Os resultados estão sumariados nas tabelas 2 (E1), 3 (E2) e 4 (E3). No caso de E3, que não foi purificada até a homogeneidade, os valores absolutos de k_{cat} e k_{cat}/K_m são estimativas. Estas estimativas foram feitas através da inferência da porcentagem em massa de proteína representada por E3 no material eluído da Mono P, avaliada após SDS-PAGE e levando-se em conta seu M_r .

As três enzimas têm especificidade bastante ampla, sendo capazes de clivar substratos sintéticos, alquil glicosídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos tóxicos produzidos por plantas.

Comparando-se os valores de k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m das três enzimas entre si, observamos que estas são bastante diferentes no que diz respeito às suas especificidades pelos vários substratos ensaiados. Exemplificando, E2 e E3 apresentam valores de K_m para MU β Glu muito semelhantes entre si (0,035 mM e 0,057 mM respectivamente) e bastante diferentes de E1 (7,6 mM). Por outro lado, E1 e E3 apresentam valores de K_m para lactose semelhantes entre si (16,8 mM e 8,3 mM respectivamente) e bastante diferentes de E2 (146 mM). Quando o substrato é celobiose, E1 e E2 apresentam valores de K_m da mesma ordem de grandeza (4,0 mM e 5,2 mM respectivamente), sendo diferentes de E3 (0,42 mM).

As três enzimas são capazes de clivar tanto β -galactosídeos como β -glucosídeos, apresentando maior eficiência (maiores valores de k_{cat}/K_m) por

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes substratos pela E1 de *D. saccharalis*.

substrato	K _m (mM)	K _i (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{cat} / K _m relativo (%)
celobiose	4,0 ± 0,3		1,7 ± 0,1	0,43	4,3
celotriose	0,48 ± 0,07		1,3 ± 0,1	2,73	27,3
celotetraose	0,30 ± 0,05	7,7 ± 1,3	1,3 ± 0,1	4,33	43,3
celopentaose	0,66 ± 0,05		1,8 ± 0,1	2,76	27,6
laminaribiose	0,29 ± 0,07	10,5 ± 2,7	2,9 ± 0,3	10,0	100
gentiobiase	0,90 ± 0,07		2,7 ± 0,1	3,01	30,1
lactose	16,8 ± 1,6		2,0 ± 0,1	0,12	1,2
amigdalina	0,21 ± 0,02		2,0 ± 0,1	9,50	95,0
prunasina	1,5 ± 0,1		0,12 ± 0,01	0,083	0,83
octilβglu	0,56 ± 0,05		0,43 ± 0,01	0,76	7,6
MUβGlu	7,6 ± 0,6		31 ± 1	4,05	40,5
NPβGlu	0,64 ± 0,04		3,4 ± 0,1	5,25	52,5
MUβGal *	1,0 ± 0,5		0,49 ± 0,05	0,49	4,9
NPβGal	4,6 ± 0,4		0,82 ± 0,02	0,18	1,8

*determinação afetada pela baixa solubilidade do substrato, que tornou impossível o uso de soluções em concentrações acima de 2 mM.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes substratos pela E2 de *D. saccharalis*

substrato	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{cat} / K _m relativo (%)
celobiose	5,2 ± 0,6	0,25 ± 0,01	0,049	0,011
celotriose	2,7 ± 0,7	0,08 ± 0,01	0,030	0,0070
celotetraose	1,1 ± 0,2	0,043 ± 0,007	0,038	0,0088
celopentaose	3,8 ± 1,8	0,077 ± 0,007	0,020	0,0046
laminaribiose	0,96 ± 0,13	0,98 ± 0,03	1,0	0,23
gentiobiose	1,0 ± 0,1	0,13 ± 0,01	0,13	0,029
lactose	140 ± 21	0,86 ± 0,06	0,0060	0,0013
amigdalina	0,33 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,47	0,11
prunasina	1,1 ± 0,1	1,02 ± 0,04	0,93	0,21
octilβglu	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,01	1,1	0,25
MUβGlu	0,035 ± 0,006	15 ± 1	430	100
NPβGlu	0,074 ± 0,007	1,39 ± 0,04	19	4,3
MUβGal	0,29 ± 0,03	25 ± 2	85	19
NPβGal	0,55 ± 0,05	4,2 ± 0,1	7,6	1,7

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes substratos pela E3 de *D. saccharalis*.

substrato	K _m (mM)	K _i (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{cat} / K _m relativo (%)
celobiose	0,42 ± 0,02		0,75 ± 0,01	1,8	3,2
celotriose	0,41 ± 0,12	5,6 ± 1,6	1,32 ± 0,25	3,2	5,7
celotetraose	0,14 ± 0,06	3,23 ± 1,5	1,64 ± 0,32	12,6	22
celopentaose	0,16 ± 0,01	11,8 ± 0,1	1,10 ± 0,05	6,9	12
laminaribiose	0,19 ± 0,05	16,4 ± 4,4	1,41 ± 0,12	7,4	13
gentiobiase	11,6 ± 1,4		0,32 ± 0,02	0,028	0,05
lactose	8,3 ± 0,7		0,85 ± 0,03	0,10	0,18
amigdalina	0,13 ± 0,01		0,22 ± 0,01	1,7	3,0
prunasina	1,8 ± 0,1		0,63 ± 0,02	0,35	0,64
octilβglu	0,19 ± 0,04		0,034 ± 0,002	0,18	0,32
MUβGlu	0,057 ± 0,006		3,2 ± 0,1	56,4	100
NPβGlu	0,099 ± 0,003		0,92 ± 0,01	9,3	17
MUβGal	0,32 ± 0,01		1,66 ± 0,03	5,2	9,2
NPβGal	1,4 ± 0,2		1,7 ± 0,1	1,2	2,2

glicose em relação à galactose na posição do glicone (figura 16), o que nos leva a descartar a possibilidade de existir uma β -galactosidase estrita no tubo digestivo desta lagarta. Assim sendo, estas enzimas devem ser denominadas β -glicosidases e não β -glucosidases ou β -galactosidases.

β -Galactosidases estritas também podem hidrolisar β -glucosídeos, porém com eficiência muito baixa (TERRA & FERREIRA, 1994). Deste modo poderíamos supor a perda de uma β -galactosidase durante a marcha de purificação, uma vez que seus passos foram monitorados com NP β Glu. Esta hipótese foi descartada, uma vez que ensaiamos os passos iniciais de purificação com NP β Gal e não encontramos nenhum pico de atividade distinto daqueles observados utilizando NP β Glu como substrato. Assim sendo, podemos dizer que no tubo digestivo de *D. saccharalis* não existe uma β -galactosidase estrita.

A diminuição na eficiência de hidrólise (kcat/Km) pela substituição do glicone glicose por galactose está sempre relacionada a um sensível aumento de Km (diminuição na afinidade de ligação do substrato à enzima). No caso de E2 e E3, os valores de kcat não se alteram tanto em substratos sintéticos (MU β Glu X MU β Gal e NP β Glu X NP β Gal), quanto em substratos naturais (celobiose X lactose). E1 por sua vez, apresenta redução no kcat, quando comparamos os substratos sintéticos entre si, e kcat não alterado comparando substratos naturais entre si (tabelas 2, 3 e 4). Provavelmente a mudança da hidroxila do carbono 4 da posição equatorial (glicose) para a posição axial (galactose) deve dificultar o posicionamento do substrato no sítio ativo destas enzimas.

De uma forma geral, os substratos sintéticos utilizados neste trabalho devem possuir bons grupos deixantes (MU ou NP), o que poderia explicar a alta eficiência de hidrólise para as três enzimas estudadas. Estes substratos devem ser desenhados para serem hidrolisáveis por uma ampla variedade de β -glicosidases. E2 e E3 apresentam maior eficiência de hidrólise quando o aglicone é MU comparado a NP. Para E1 a tendência não é muito clara, não sendo possível determinar a preferência de E1 por NP ou MU no aglicone.

Figura 16 – Eficiência catalítica sobre diferentes substratos em função do glicone, para as β -glicosidases de *D. saccharalis*. Comparando-se substratos com o mesmo aglicone, pode-se notar que as três enzimas apresentam maior eficiência catalítica quando este é glicose.

Figura 17 – Eficiência catalítica sobre diferentes substratos naturais para as β -glicosidases digestivas de *D. saccharalis*. A – Esquema representando as porções do glicosídeo amigdalina que correspondem à gentiobiose e prunasina. Eficiência catalítica sobre glicosídeos para (B) enzima 1; (C) enzima 2; (D) enzima 3.

Amigdalina é um β -glicosídeo tóxico produzido por plantas. Após a remoção de uma glicose de sua molécula, é produzida prunasina, que, após ter a glicose removida, libera mandelonitrila, que é cianogênica (ver esquema figura 17A).

Um dado bastante importante a ser explicitado aqui é a grande eficiência (kcat/Km) de hidrólise de E1 sobre amigdalina. Trata-se de um dos melhores substratos, sendo a eficiência de hidrólise praticamente duas vezes maior do que a de NP β Glu, o melhor dos substratos sintéticos para esta enzima. Comparando-se os valores de Km para os vários substratos, observamos que amigdalina é justamente o substrato sobre o qual E1 apresenta o menor valor de Km (0,21 mM). Comparando com os substratos naturais, a clivagem de gentiobiose por E1 é das mais eficientes, sendo sua eficiência 31% daquela encontrada quando o substrato é amigdalina.

Um outro aspecto interessante de ser notado é que os valores de Km sobre prunasina são muito semelhantes para as três enzimas (1,5 mM E1 ; 1,1 mM E2 ; 1,8 mM E3), porém E2 apresenta eficiência de hidrólise significativamente maior por ter o maior valor de kcat (aproximadamente dez vezes maior do que o de E1).

Considerando os substratos amigdalina, prunasina e gentiobiose (ver figura 17A) e observando a figura 17B,C,D verificamos que E1 apresenta maior eficiência sobre amigdalina, seguida de gentiobiose, e por último prunasina. Já E2 tem prunasina como melhor substrato, seguida de amigdalina e gentiobiose nesta ordem. E3, por sua vez, cliva melhor amigdalina seguida por prunasina, sendo muito pouco eficiente sobre gentiobiose. Para cada um destes três substratos, os Km's das 3 enzimas são semelhantes entre si, excetuando-se E3 sobre gentiobiose, cujo valor é 10 vezes maior do que aquele encontrado para as outras duas enzimas. Isso corrobora com a idéia de que E3 apresenta maior especificidade por ligações β 1-4 em detrimento das β 1-6 (ver comentário adiante).

Pelo exposto acima, dentre as β -glicosidases de *D. saccharalis*, E2 apresenta a maior eficiência catalítica sobre mandelonitrila (na posição do aglicone). Vale ressaltar que é exatamente esta enzima que tem sua atividade

diminuída quando *D. saccharalis* é criada durante toda a vida larval na presença de amigdalina (FERREIRA *et al.*, 1997).

No que se refere a dissacarídeos, as três β -glicosidases de *D. saccharalis* clivam preferencialmente laminaribiose (glicose β 1-3 glicose). Quanto ao segundo dissacarídeo melhor hidrolisado, E1 e E2 clivam com maior eficiência o dissacarídeo unido por ligação β 1-6 (gentiobiose), ao passo que E3 hidrolisa melhor o dissacarídeo unido por ligação β 1-4 (celobiose) (figura 17). Esta mesma tendência é observada ao compararmos os valores de K_m (afinidade de ligação enzima-substrato). E1 e E2 apresentam valores de K_m para gentiobiose (0,9 mM e 1,0 mM respectivamente) menores do que para celobiose (4,0 mM e 5,2 mM respectivamente). O contrário é verificado para E3 (11,6 mM e 0,42 mM para gentiobiose e celobiose respectivamente).

Considerando as oligocelodextrinas, todas as enzimas apresentam maior eficiência na clivagem (k_{cat}/K_m) de celotetraose. As energias de ligação de glicose nos teóricos sub-sítios +2, +3 e +4 foram calculadas (item 2.31) para todas as enzimas e os resultados estão apresentados na figura 18. Podemos ver que a ligação no suposto sub-sítio +4 é sempre bastante desfavorável, ao contrário do favorecimento verificado para os outros dois (+2 e +3).

Durante as determinações de parâmetros cinéticos, verificamos que E1 e E3 apresentavam inibição por altas concentrações de alguns substratos. Assim sendo, nestes casos não foi possível a determinação de k_{cat} e K_m simplesmente através do plote de Lineweaver-Burk. Os dados obtidos foram então ajustados a um modelo no qual a inibição se dá pela ligação de uma segunda molécula de substrato ao complexo ES, formando o complexo ES_2 , que é improdutivo (CLELAND, 1979). Os K_i s calculados para esta inibição estão apresentados nas tabelas 2 e 4.

3.4.3 Ensaios de competição entre substratos e determinações de K_i

As tabelas 5, 6 e 7 mostram os resultados obtidos realizando-se ensaios de competição entre substratos para E1, E2 e E3 respectivamente. Nestes ensaios, um substrato é utilizado como inibidor (substrato-inibidor) da hidrólise

Figura 18 – Energia de ligação ($-\Delta\Delta G^\circ$, KJ/mol) de um resíduo de glicose nos subsítios do posicionamento do aglicone das β -glicosidases de *D. saccharalis*.

Tabela 5 – Competição entre substratos e inibição por glucono δ -lactona para a E1 de *D. saccharalis*.

Substrato	Inibidor	Ki
MU β Glu	NP β Glu	1,7 $\pm$ 0,2
MU β Glu	NP β Gal	13 $\pm$ 1
MU β Glu	octil β glu	1,5 $\pm$ 0,3
MU β Glu	celobiose	1,8 $\pm$ 0,2
MU β Glu	Glucono δ -lactona *	0,8 $\pm$ 0,1
Amigdalina	Glucono δ -lactona *	0,9 $\pm$ 0,1
NP β Glu	Glucono δ -lactona *	1,0 $\pm$ 0,1

Todos os substratos testados são inibidores competitivos lineares simples e os valores apresentados correspondem aos seus Ki's (mM). Km dos inibidores quando usados como substratos: NP β Glu 0,64 $\pm$ 0,04; NP β Gal 4,6 $\pm$ 0,4; octil β glu 0,56 $\pm$ 0,05; celobiose 4,0 $\pm$ 0,3.

* Valores em μ M.

Tabela 6 – Competição entre substratos e inibição por glucono δ -lactona para a E2 de *D. saccharalis*.

Substrato	Inibidor	Ki
MUβGlu	NPβGlu	0,021 $\pm$ 0,004
MUβGlu	NPβGal	0,53 $\pm$ 0,03
MUβGlu	octilβglu	2,0 $\pm$ 0,2
MUβGlu	celobiose	109 $\pm$ 10
MUβGlu	Glucono δ-lactona	0,005 $\pm$ 0,001
MUβGal	NPβGlu	0,024 $\pm$ 0,003
MUβGal	NPβGal	0,63 $\pm$ 0,05
MUβGal	octilβglu	1,9 $\pm$ 0,2
MUβGal	celobiose	115 $\pm$ 10
NPβGlu	Glucono δ-lactona	0,007 $\pm$ 0,001

Todos os substratos testados são inibidores competitivos lineares simples e os valores apresentados correspondem aos seus Ki's (mM). Km dos inibidores quando usados como substratos: NP β Glu 0,074 $\pm$ 0,007; NP β Gal 0,55 $\pm$ 0,05; octil β glu 0,14 $\pm$ 0,03; celobiose 5,2 $\pm$ 0,6.

Tabela 7 – Competição entre substratos e inibição por glucono δ -lactona para a E3 de *D. saccharalis*.

Substrato	Inibidor	Ki
MUβGlu	NPβGlu	0,13 $\pm$ 0,03
MUβGlu	NPβGal	1,1 $\pm$ 0,2
MUβGlu	octilβglu	1,5 $\pm$ 0,2
MUβGlu	celobiose	0,70 $\pm$ 0,15
MUβGlu	glucono δ-lactona	0,00075 $\pm$ 0,00015

Todos os substratos testados são inibidores competitivos lineares simples e os valores apresentados correspondem aos seus Ki's (mM). Km dos inibidores quando usados como substratos: NP β Glu 0,099 $\pm$ 0,003; NP β Gal 1,4 $\pm$ 0,2; octil β glu 0,19 $\pm$ 0,04; celobiose 0,42 $\pm$ 0,02.

de outro (substrato) (ver item 2.30). Para cada uma das enzimas, apresentamos também valores de K_i para o inibidor glucono δ -lactona. Este composto mimetiza o estado de transição e costuma ser um poderoso inibidor competitivo de β -glicosidases.

Para todas as determinações dos valores K_i realizadas (substratos-inibidores e glucono δ -lactona), o padrão obtido foi de inibição competitiva linear simples, como apresentado na figura 19.

As tabelas 5, 6 e 7 mostram que os valores de K_i para glucono δ -lactona obtidos para as três enzimas são diferentes entre si, reforçando a hipótese de que estas são mesmo cineticamente diferentes. E3 é a que apresenta maior afinidade por glucono δ -lactona K_i 0,75 μ M, enquanto E1 apresenta a menor afinidade ($K_i \approx 1,0$ mM).

Analisando a tabela 5 (E1), observamos que os valores de K_i determinados para glucono δ -lactona utilizando MU β Glu, amigdalina e NP β Glu como substratos são iguais.

Para E1, todos os K_i s obtidos, quando um determinado substrato é usado como inibidor, diferem no máximo de três vezes em relação ao K_m obtido quando essa mesma substância é utilizada como substrato. A mesma observação é válida para E2, com exceção de octil β glu e celobiose. Considerando E3, observa-se uma grande diferença entre os valores de K_m e K_i somente quando se utiliza octil β glu.

Os ensaios de inibição e competição entre substratos ajudam-nos a inferir sobre o número de sítios ativos das enzimas, como discutido adiante.

Figura 19 – Inibição da β -glicosidase 3 purificada de *D. saccharalis* por octil β glu. O ensaio foi realizado usando como substrato MU β Glu. O gráfico apresentado corresponde ao plote de Lineweaver-Burk para concentrações crescentes de inibidor. O inserto corresponde ao replote da inclinação contra a concentração de inibidor. (Concentrações de octil β glu: $\circ$ - 0 mM, $\blacksquare$ - 1 mM, $\triangle$ - 2 mM, $\bullet$ - 4 mM, $\diamond$ - 8 mM). Padrão de inibição obtido: competitivo linear simples.

4 DISCUSSÃO

4.1 Purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*

Neste trabalho purificamos as β -glicosidases existentes no tubo digestivo de *D. saccharalis*. Uma vez que o alimento fornecido a esses insetos é cozido, as enzimas obtidas devem ser produzidas pelo próprio inseto.

Apesar da eficácia de passos hidrofóbicos em marchas de purificação de β -glicosidases de diversos organismos (BAKER & WOO, 1992 ; LAMARCO & GLEW, 1986 ; GLEW *et al.*, 1993 ; MARANA *et al.*, 2000a), não foi possível incluir uma cromatografia hidrofóbica como primeiro passo de purificação das β -glicosidases de *D. saccharalis*. As cromatografias hidrofóbicas do sistema de baixa pressão resolvem parcialmente as β -glicosidases intestinais desta lagarta. Porém, o enriquecimento e recuperações obtidos são menores do que para a coluna de troca iônica Econo Pac Q, que não é capaz de resolver as atividades. Nosso objetivo era isolar e purificar cada uma das β -glicosidases. Neste contexto, tanto as cromatografias hidrofóbicas quanto a troca iônica apresentavam vantagens. Optamos pela troca iônica porque a não resolução das atividades era vantajosa, uma vez que estaríamos purificando as três formas juntas nesta etapa inicial, com alta recuperação de atividade enzimática.

A única propriedade física em que as β -glicosidases de *D. saccharalis* diferem significativamente parece ser a hidrofobicidade. Isto explica porque apenas colunas hidrofóbicas são capazes de resolvê-las. Além disso, podemos dizer que estas enzimas são muito hidrofóbicas, uma vez que são sempre eluídas em baixas concentrações de $(\text{NH}_4)_3 (\text{SO}_4)_2$, menores que 0,5 M.

A correlação dos picos de atividade eluídos na Phenyl Superose com aqueles observados na eletroforese de cilindro foi feita tomando como base os ensaios dos perfis com vários substratos. Apesar da técnica de eletroforese em cilindro (item 2.6 e FERREIRA *et al.*, 1997) apresentar recuperação muito baixa de atividade, no caso de *D. saccharalis*, a correlação entre as duas técnicas não é prejudicada, pois as diferenças de especificidades entre as três

enzimas é muito evidente, tornando fácil a comparação. Além disso, a perda de atividade de cada uma das enzimas na eletroforese parece ser igual, de maneira que a proporcionalidade entre as atividades se mantém.

A tabela 1 mostra enriquecimento menor que 1 para E1 após Mono P. Este número pode ser explicado quando a quantidade de proteínas eliminadas da preparação é pequena (passo final de purificação) e a recuperação não é muito alta 65%.

Durante a marcha de purificação, notamos que E2 é levemente mais instável que as outras enzimas (ver item 3.2.3). Esta instabilidade é mais pronunciada à medida que o grau de purificação aumenta. Isto pode explicar a baixa recuperação desta enzima na Superose (37% em relação ao passo anterior). A instabilidade desta enzima em preparações puras é tão grande que a cada congelamento e descongelamento perde-se pelo menos 50% de sua atividade. A manutenção da atividade de E2 purificada foi conseguida pela adição de glicerol 20% às preparações. O glicerol forma pontes de hidrogênio com proteínas em solução aquosa e aumenta a tensão superficial da água, produzindo um fenômeno chamado de "hidratação preferencial" que estabiliza proteínas (VOLKIN & KLIBANOV, 1990)

4.2 Caracterização física das β -glicosidases de D. saccharalis

As β -glicosidases são encontradas nos mais diversos organismos do mundo vivo. Assim, seria esperado que estas enzimas compartilhassem algum nível de propriedades catalíticas e estruturais semelhantes. De fato é notável que os pesos moleculares estão quase sempre no intervalo de 55 a 65 K. O pHótimo é ácido, em torno de 5 a 6,5 e apresentam estrita especificidade por substratos β -glicosídicos. (ESEN, 1993)

Excetuando-se pela hidrofobicidade, as três β -glicosidases de *D. saccharalis* têm propriedades físicas bastante semelhantes entre si.

Os valores de pI, determinados para as β -glicosidases de *D. saccharalis*, estão em torno de 7,5. Os valores de pI encontrados são próximos àqueles determinados para os insetos *Pheropsophus aequinoctialis*, pI 6,8 (FERREIRA

& TERRA, 1989); *Abracris flavolineata*, pl 6,8 – celobiose-aril β -glicosidase , pl 7,2 – aril β -glicosidase (MARANA *et al.*, 1995) e *Erinnyis ello*, pl 6,8 (SANTOS & TERRA, 1985).

Os valores de Mr determinados por SDS-PAGE (em torno de 60 K) são semelhantes àqueles obtidos por filtração em gel (65 ± 5 K) e muito diferentes das determinações por gradiente de densidade (100 K). Como explicado anteriormente, este valor maior para a medida em gradiente de densidade deve ser ocasionado por dimerização nestas condições, que são mais brandas, como verificado por MARANA *et al.* (2000a) em *S. frugiperda*. Uma curiosidade, no caso de *D. saccharalis*, é que o tampão usado no gradiente de densidade é exatamente o mesmo da filtração em gel, e portanto estamos utilizando a mesma força iônica. Como comentado anteriormente, pode tratar-se também de uma mudança conformacional da enzima quando submetida à ultracentrifugação.

Esta variação nos Mr de β -glicosidases tem sido encontrada na literatura (TERRA & FERREIRA, 1994 ; FERREIRA *et al.*, 1994b). Algumas técnicas parecem favorecer a agregação ou mudanças conformacionais em β -glicosidases, revelando maiores pesos moleculares, seja através de gradiente de densidade, como encontrado em *Erinnyis ello* (SANTOS & TERRA, 1985), ou filtração em gel em baixa força iônica, como em *Sitophilus oryzae* (BAKER & WOO, 1992).

As β -glicosidases de *D. saccharalis* não são glicosiladas, como apresentado anteriormente. As β -glicosidases intestinais de *T. molitor* não interagem com Concanavalina A – Sepharose (FERREIRA, TERRA & FERREIRA, resultados não publicados). Provavelmente estas enzimas também não são glicosiladas. Entretanto, a β -glicosidase citossólica de mamíferos (ESEN, 1993) e LPH, também de mamíferos (NAIM *et al.*, 1987) são glicosiladas.

4.3 Caracterização do sítio ativo das β -glicosidases de D. saccharalis

A tabela 5 apresenta dados de inibição de E1 por glucono δ -lactona e por diversos substratos. O K_i para a inibição por glucono δ -lactona quando se utiliza MU β Glu, amigdalina ou NP β Glu é o mesmo. Como glucono δ -lactona é um inibidor competitivo linear simples, seu K_i é certamente uma constante de equilíbrio. Os três valores de K_i para este composto são idênticos, indicando que a lactona está ligando sempre em um mesmo sítio e, portanto, MU β Glu, amigdalina e NP β Glu são hidrolisados pelo mesmo sítio ativo da enzima.

Quando duas substâncias são clivadas pelo mesmo sítio ativo, o valor de K_m para uma delas deve coincidir com seu valor de K_i quando é utilizada como inibidor, uma vez que estamos observando constantes de dissociação referentes ao mesmo sítio de ligação na enzima.

Comparando o valor de K_i para NP β Glu (usando MU β Glu como substrato, 1,7 mM) com seu K_m (0,64 mM), verificamos que há uma diferença de três vezes entre estes dois valores. Uma vez que o experimento com glucono δ -lactona indica fortemente a presença de apenas um sítio ativo para a hidrólise de MU β Glu e NP β Glu, admitimos que diferenças de até 3 vezes entre os valores de K_m e K_i não são significativas. Seguindo esta premissa, analisando os dados apresentados na tabela 5, verificamos que todos os substratos parecem ser hidrolisados no mesmo sítio ativo. Como estes substratos compreendem dissacarídeos, substratos com aglicone hidrofóbico (octil β glu) e substratos com glicose e galactose na posição do glicone, os resultados obtidos indicam que o sítio ativo desta enzima deve possuir especificidade ampla.

Pode parecer estranho afirmarmos que uma diferença de cerca de 3 vezes nos valores de K_i e K_m não deve ser significativa, uma vez que desvios muito pequenos são apresentados nas tabelas referentes aos valores de K_i e K_m . Como comentado anteriormente, os valores de K_i para glucono δ -lactona refletem uma constante de equilíbrio. Além disso, estamos supondo aqui que as β -glicosidases de *D. saccharalis* processam os substratos segundo uma cinética de equilíbrio rápido. Neste caso, os valores de K_i determinados para os substratos-inibidores também refletiriam uma constante de equilíbrio. Como

trata-se de uma suposição, caso o processamento não ocorra efetivamente por equilíbrio rápido, os valores de K_m e K_i não podem ser tão facilmente comparáveis. Neste sentido, pode ser que haja complicações maiores, não detectadas pelo conjunto de dados obtidos neste trabalho. Assim sendo, o tratamento efetuado se traduz na melhor análise dos dados existentes até o momento, na qual os valores de K_i para glucono δ -lactona parecem mais consistentes para a nossa afirmação a respeito do número de sítios ativos destas enzimas.

Os resultados apresentados na tabela 7 para E3 indicam que todos os substratos aqui utilizados são clivados pelo mesmo sítio ativo, uma vez que os valores de K_m e K_i são coincidentes para todas as substâncias utilizadas.

A tabela 6 mostra os resultados de experimentos de inibição realizados com E2. Utilizando MU β Glu e NP β Glu como substratos, os K_i s obtidos para o inibidor glucono δ -lactona são iguais. Seguindo o mesmo raciocínio aplicado na análise dos resultados obtidos para E1, vemos que MU β Glu, MU β Gal, NP β Glu e NP β Gal são clivados no mesmo sítio ativo. Celobiose e octil β glu, por sua vez, devem ser processados em outro sítio.

A presença de dois sítios ativos em E2 deveria ser confirmada por outros experimentos, como por exemplo a modificação química de grupos envolvidos em catálise. A reatividade destes grupos é em geral diferente. Assim sendo, as atividades sobre substratos clivados em sítios distintos devem decrescer desigualmente ao longo do experimento de modificação química.

β -Glicosidases com mais de um sítio ativo já foram descritas anteriormente. A β -glicosidase digestiva de mamíferos (LPH) possui dois sítios ativos, localizados em dois domínios similares presentes na enzima madura. Um sítio ativo é responsável pela clivagem de dissacarídeos (entre eles lactose, celobiose, laminaribiose e gentiobiose) e o outro pela hidrólise do glicosídeo de plantas florizina e glicosilceramidas (WACKER *et al.*, 1992 ; FREUND *et al.*, 1991 ; NEELE *et al.*, 1995).

Em uma das β -glicosidases do Orthoptera *Abracris flavolineata* são descritos dois sítios ativos. Um deles cliva celobiose e laminaribiose, enquanto

para o outro foi verificada atividade apenas sobre aril-glicosídeos (MARANA *et al.*, 1995).

No Lepidoptera *Spodoptera frugiperda*, MARANA *et al.* (2000a) obtiveram evidências cinéticas e de modificação química para afirmarem a existência de dois sítios ativos na β -glicosidase de Mr 47 K, encontrada no tubo digestivo deste inseto. O sítio chamado de sitio celobiase é capaz de clivar oligocelodextrinas, celobiose, gentiobiose e amigdalina. O outro sítio ativo (chamado sítio galactosidase) cliva NP β Gal e lactose. Os dois sítios clivam NP β Glu e a enzima não apresenta atividade sobre laminaribiose. Os autores verificaram que a enzima é capaz de hidrolisar glicosilceramidas e postularam que esta hidrólise deve ocorrer no sítio galactosidase.

No caso da E2 de *D. saccharalis* não sabemos quais são os outros substratos que são clivados por cada sítio ativo. Observando os dados de kcat apresentados na tabela 3, vemos que o kcat para a hidrólise de celobiose é de 0,25 mM. Os kcats para octil β glu, amigdalina e gentiobiose são muito semelhantes a este valor. Este dado, aliado à estrutura destes substratos, permitem-nos supor que todos sejam clivados no mesmo sítio ativo. Valores de kcat iguais são esperados quando o grupo que ocupa o sub-sítio do glicone é o mesmo (glicose, neste caso) e o passo limitante na catálise é a desglicosilação da enzima. Uma vez que este sítio é capaz de clivar celobiose, as outras celodextrinas devem também ser processadas por ele. A partir destes dados não é possível hipotetizar a respeito de onde seriam clivados os demais substratos.

Aparentemente nenhum substrato é processado de forma significativa pelos dois sítios ativos. Se isso ocorresse, as determinações de K_m e K_i não deveriam apresentar retas no plote dos duplos recíprocos ($1/v \times 1/S$). Entretanto, esse resultado poderia ser obtido se a constante de ligação da substância em cada um dos sítios fosse muito semelhante ou muito diferente. Entendemos por “muito diferente” a situação em que o valor de K_m para um dos sítios encontra-se fora da faixa de concentração de substrato utilizada para a determinação do K_m para o outro sítio.

Os sítios ativos das três β -glicosidases de *D. saccharalis* devem possuir quatro subsítios para a ligação de glicose. Observando os valores de Km para as oligocelodextrinas, verificamos que estes decrescem sucessivamente de celobiose até celotetraose, subindo novamente para celopentaose.

A hipótese de que estas enzimas não apresentam um quinto sub-sítio de ligação de glicose foi também reforçada pelo cálculo da energia de ligação em cada sub-sítio (figura 18). Verificamos que o suposto quinto sub-sítio (+4) sempre apresenta uma energia negativa para a ligação de glicose.

Resultados semelhantes foram observados para as β -glicosidases do Coleoptera *Tenebrio molitor* (FERREIRA, TERRA & FERREIRA, resultados não publicados) e para uma das β -glicosidases digestivas do Lepidoptera *S. frugiperda* (MARANA *et al.*, 2000b).

E3 é inibida por altas concentrações de celotriose, celotetraose e celopentaose, enquanto E1 é inibida por altas concentrações de celotetraose e laminaribiose. A inibição por altas concentrações de substrato é bastante comum em despolimerases, que possuem vários sub-sítios para a ligação do substrato. Este tipo de inibição só é visto quando a inibição não é do tipo competitivo linear simples. Esta inibição pode ocorrer quando o substrato liga-se a outros sub-sítios do sítio ativo, ou em outro sítio de ligação, de modo a permitir que ainda ocorra a hidrólise, embora menos eficiente. Essa inibição também aparece quando o substrato liga-se ao intermediário covalente formado durante a catálise (LAIDLER & BUNTING, 1973 ; CLELAND, 1979). No caso das glicosil hidrolases, muitas vezes forma-se uma glicosil-enzima, por isso levamos em conta a última hipótese (substrato ligando-se ao intermediário covalente) para a análise feita neste trabalho. Entretanto, os dados por nós obtidos não nos permitem afirmar como se dá efetivamente a inibição pelo substrato no caso das β -glicosidases de *D. saccharalis*. O tratamento utilizado para abordar os dados é um modelo de inibição, escolhido pelo motivo citado acima, não havendo comprovação de efetiva ocorrência deste mecanismo.

4.4 O papel das β -glicosidases de *D. saccharalis*

Embora todas as β -glicosidases de *D. saccharalis* sejam capazes de hidrolisar todos os substratos testados, há diferenças significativas entre elas.

Utilizando a classificação proposta por TERRA & FERREIRA (1994), podemos assumir que E2 pertence ao grupo das aril- β -glicosidases (classe 3) visto que, excluindo-se os compostos sintéticos, prunasina (um aril-glucosídeo) está entre os melhores substratos para esta enzima. Além disso, observamos que os oligossacarídeos (celotriose, celotetraose e celopentaose) e os dissacarídeos (celobiose, gentiobiose e lactose) são os piores substratos dentre os testados. Os valores de K_m para os oligo e dissacarídeos são em geral mais altos do que para os outros substratos, sendo o valor para lactose (146 mM) o maior dentre todos os determinados neste trabalho. Os altos valores de K_m demonstram a baixa afinidade de ligação de E2 a glicosil-glicosídeos.

E1 e E3 devem pertencer à classe 1 (segundo TERRA & FERREIRA, 1994), uma vez que, para os substratos ensaiados, não apresentam preferência muito pronunciada por glicosil ou aril-glicosídeos. E3, por sua vez, parece ser mais específica para dissacarídeos, quando comparada com E1.

E2 consegue clivar bem melhor substratos com a porção aglicone mais hidrofóbica, tendo menor eficiência sobre dissacarídeos. Esta enzima deve ter um sítio ativo bastante hidrofóbico, uma vez que um dos menores K_m s obtidos para ela foi com octil β glu. Devido a este sítio ativo bastante hidrofóbico, sua principal função fisiológica deve ser a clivagem de glicolipídios, substâncias encontradas em todos os tecidos.

O principal papel de E1 deve ser a digestão terminal de oligossacarídeos. Esta enzima apresenta uma eficiência de clivagem de mais de 10 vezes para celotetraose quando comparada com celobiose. Também é capaz de clivar, com extrema eficiência, laminaribiose, que possui ligação β 1-3. Devido a esses fatos, essa enzima deve hidrolisar os oligossacarídeos resultantes principalmente da digestão de hemiceluloses, que são polissacarídeos de glicose formados por ligações β 1-3 e β 1-4. Em *Lepidoptera*, já foi demonstrada alta digestibilidade de hemiceluloses (TERRA *et al.*, 1987).

E3, por sua vez, deve ser a principal responsável pela hidrólise de dissacarídeos, uma vez que tem alta eficiência relativa sobre laminaribiose, celobiose e oligocelodextrinas. Além disso, a relação de eficiência catalítica (kcat/Km) de celotetraose em relação a celobiose é de cerca de 7 vezes e o Km para celotetraose é um dos menores dentre todos os determinados neste trabalho.

As energias de ligação de glicose em seus sub-sítios também corroboram a idéia desta enzima não clivar preferencialmente oligossacarídeos, uma vez que a energia de ligação do suposto subsítio +3 não favorece a ligação enzima-substrato.

Neste trabalho, pudemos verificar que a hipótese apresentada por FERREIRA *et al.* (1997) a respeito das especificidades das três β -glicosidases de *D. saccharalis* foi, em parte, demonstrada. E1, que mantém a atividade quando este inseto é alimentado por toda a vida larval com dieta contendo amigdalina, é mesmo a responsável pela remoção de uma das glicoses deste glicosídeo, produzindo prunasina. E2, que, nas mesmas condições, tem sua atividade reduzida, deve ser a responsável pela clivagem de prunasina (que gera mandelonitrila, aglicone tóxico), uma vez que apresenta grande especificidade por este glicosídeo. Como já discutido anteriormente, este mecanismo é bastante interessante, por revelar uma estratégia eficiente de contornar a toxicidade de mandelonitrila.

Por outro lado, diferente do proposto por FERREIRA *et al.* (1997), as especificidades cinéticas de E1 e E3 são bastante diferentes. E3 também fora apresentada como tendo redução de atividade, quando amigdalina era adicionada à dieta durante toda a vida larval. Entretanto, analisando os desvios das medidas, no caso de E3 vemos que, considerados os respectivos desvios, as diferenças observadas não são muito significativas. Assim sendo, analisando novamente aqueles dados, não podemos ter certeza de que a atividade de E3 realmente sofrera redução. No caso de E1, esta dúvida inexiste.

Estudos como o que foi apresentado aqui não explicam porque algumas β -glicosidases (como a E1 de *D. saccharalis*) são capazes de clivar

laminaribiose, enquanto outras não o são (como uma das presentes em *S. frugiperda* ; MARANA *et al.*, 2000a).

Entretanto, este trabalho representa um passo indispensável para o conhecimento da especificidade destas enzimas e permitir escolhas mais adequadas para estudos futuros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER J.E. & WOO S.M. (1992). β -glucosidases in the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: purification, properties and activity levels in wheat- and legume-feeding strains. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22-5: 495-504.
- BARNES R.D. & RUPPERT E.E. (1996). *Zoologia dos invertebrados* 6^aed. Roca, São Paulo, pp1029.
- BLUM H., BEIER H. & GROSS H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93-99.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- BROADWAY R.M. (1996). Resistance of plant to herbivorous insects: Can this resistance fail? *Can. J. Plant Pathol.*, 18: 476-481.
- BRUNKE K.J. & MEEUSEUM R.L. (1991). Insect Control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.* 9: 197-200.
- CHARARAS C. & CHIPOULET J.M. (1982). Purification by chromatography and properties of a β -glucosidase from the larvae of *Phorocantha semipunctata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B: 559-564.
- CHIPOULET J.M. & CHARARAS C. (1985). Purification and partial characterization of a cellobiase from the larvae of *Rhagium inquisitor*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B: 327-332.
- CLELAND W.W. (1979). Substrate inhibition. *Methods in Enzymology* 63: 500-513.
- DAHLQVIST A. (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Analyt. Biochem.* 22: 99-107.
- DANIELS L.B., COYLE P.J., CHIAO Y., GLEW R.H. & LABOW R.S. (1981). Purification and characterization of a cytosolic broad specificity β -glucosidase from human liver. *J. Biol. Chem.* 256: 13004-13013.
- DAVIES G. & HENRISSAT B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3: 853-859.

- DAVIES G., WILSON K.S. & HENRISSAT B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321: 557-559
- DAVIS B.J. (1964). Disc. eletrophoresis - II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- ERLANGER B.F., KOKOWSKY N. & COHEN W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- ESEN A. (1993). β -glucosidases overview. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, pp 1-14, ASC Symposium Series.
- EVANS W.A.L. (1956). Studies on the digestive enzymes of the blow fly *Calliphora erythrocephala* - I. Carbohydrases. *Exp. Parasitol.* 5: 191-206.
- FERREIRA C. & TERRA W.R. (1983). Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound β -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana*) larvae. *Biochem. J.* 213: 43-51.
- FERREIRA C. & TERRA W.R. (1989). Spatial organization of digestion, secretory mechanism and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochem.* 19: 383-391.
- FERREIRA C., BELLINELLO G.L. RIBEIRO A.F & TERRA W.R. (1990). Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 20: 839-847.
- FERREIRA C., CAPELLA A.N., SITNIK R. & TERRA W.R. (1994a). Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 299-313.
- FERREIRA C., CAPELLA A.N., SITNIK R. & TERRA W.R. (1994b). Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A4: 631-640.

- FERREIRA C., PARRA J.R.P. & TERRA W.R. (1997). The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glucosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27: 55-59.
- FERREIRA C., TORRES B.B. & TERRA W.R. (1998). Substrate specificities of midgut β -glucosidases from insects of different orders. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B: 219-225.
- FREUND J.N., GOSSÉ F. & RAUL F. (1991). Derivatives of plant β -glucans are hydrolysed by intestinal lactase-phlorizin hydrolase of mammals. *Enzyme* 45: 71-74.
- GLEW R.H., GOPALAN V., FORSYTH G.W. & VANDERJAGT D.J. (1993). The mammalian cytosolic broad-specificity β -glucosidase. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, (Editado por Asim Esen) pp 83-112, ASC Symposium Series.
- GRABOWSKI G.A., BERG-FUSSMAN A. & GRACE M. (1993). Molecular biology and enzymology of human acid β -glucosidase. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, (Editado por Asim Esen) pp 83-112, ASC Symposium Series.
- HAGLUND H. (1971). Gel electrofocusing. *Meth. Biochem. Anal.* 19: 1-104.
- HARBORNE J.B. (1993). *Ecological biochemistry* 3^ªed. Academic Press, Cambridge, England, pp 318.
- HARRIS E.L.V. & ANGAL S (1989). *Protein purification methods – a practical approach*. Oxford University Press, England, pp 317.
- HARWOOD J.L. (1980). Plant acyl lipids. Structure, distribution and analysis. In *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise v.4. Lipids: structure and function*. (Ed. Stumpf, P.K.) pp 1-56, Academic Press, New York.
- HEDRICK J. & SMITH A.J. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 155-164.
- HENRISSAT B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.

- HENRISSAT B. & BAIROCH A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- HENRISSAT B. & DAVIES G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 637-644.
- HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F. & BOULTER D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330: 160-163.
- JENKINS J., LEGGIO L.L., HARRIS G. & PICKERSGILL R. (1995). β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulase, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold α/β architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters* 362: 281-285.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 8041-8045.
- KAKES P. (1993). Function and variation of the β -glucosidase linamarase in natural populations of *Trifolium repens*. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, (Editado por Asim Esen) pp 145-152, ASC Symposium Series.
- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₇. *Nature*. 227: 680-685.
- LAIDLER K. & BUNTING P. S. (1973). The chemical kinetics of enzyme action. Clarendon Press. Oxford.
- LAMARCO K.L. & GLEW R.H. (1986). Hydrolysis of a naturally occurring β -glucoside by broad specificity β -glucosidase from liver. *Biochem. J.* 237: 469-476.
- LINDROTH R.L. (1988). Hydrolysis of phenolic glycosides by midgut β -glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. *Insect Biochem.*, 18: 789-792.

- LINDROTH R.L. (1992). Biochemical ecology of aspen Lepidoptera interaction. J. Kansas Entomol. Society. 64: 372-380.
- MARANA S.R., TERRA W.R. & FERREIRA C. (1995). Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities, and function. Insect. Biochem. Molec. Biol. 25: 835-843.
- MARANA S.R., TERRA W.R. & FERREIRA C. (2000a). Purification and properties of a β -glucosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. Submetido à publicação.
- MARANA S.R., JACOBS-LORENA M., TERRA W.R. & FERREIRA C. (2000b). Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. Submetido à publicação.
- MARTIN R.G. & AMES B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: applications to protein mixtures. J. Biol. Chem., 236: 1372-1379.
- MC GAUGHEY W.H. & WHALON M.E. (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science. 258: 1451-1455.
- MICHAUD D. (1997). Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pest. TIBTECH, 15: 4-6.
- MORGAN M.R.J. (1975). Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl β -glucosidase and aryl β -galactosidase activities of *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 5: 609-617.
- NAHRSTEDT A. & MUELLER E. (1993). β -Glucosidase (linamarase) of the larvae of the moth *Zygaena trifolii* and its inhibition by some alkaline earth metal ions. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, (Editado por Asim Esen) pp 132-144, ASC Symposium Series.
- NAIM H.Y., STERCHI E.E. & LENTZE M.J. (1987). Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. Biochem. J. 241: 427-434.
- NAIM H.Y., JACOB R., NAIM H., SAMBROOK J.F. & GETTING M.H. (1994). The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. J. Biol. Chem., 269: 26933-26943.

- NEELE A. M., EINERHAND A. W. C., DEKKER J., BULLER H. A., FREUND J., VERHAVE M., GRAND R. J. & MONTGOMERY R. K. (1995). Verification of the lactase site of rat lactase-phlorizin hydrolase by site-directed mutagenesis. *Gastroenterology*, 109:1234-1240.
- OPPERT B., KRAMER K. J., BEERMAN R. W., JOHNSON D. & MC GAUGHEY W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- PARRA J.R.P. & MIHSFELDT L.H. (1992). Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer, pp. 195-209, *in* Anderson, T.E., and Leppla, N.C. (eds.). *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*. Westview Press, Boulder.
- PRATVIEL-SOSA F., CLERMONT S., PERCHERON F. & CHARARAS C. (1987). Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopea pityocampa* larvae. II. Purification and some properties of a broad specificity β -D-glucosidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B: 173-178.
- READ S.M. & NORTHCOTE D.H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the comassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116: 53-64.
- SALZMAN K. Z., SHADE R. E., KOIWA H., SALZMAN RA., NARASIMHAN M., BRESSAN R. A., HASEGAWA P. M. & MURDOCK L. L. (1998). Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 15123-15128.
- SANTOS C.D. & TERRA W.R. (1985). Physical properties, substrate specificities and a probable mechanism for a β -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). *Biochim. Biophys. Acta.* 831: 179-185.
- SANTOS C.D., RIBEIRO A.F. & TERRA W.R. (1986). Differential centrifugation, calcium precipitation, and ultra sonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool.* 64: 490-500.

- SCHNEPF E., CRICKMORE J., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J., ZEIGLER D. R., & DEAN D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Biol. Reviews, 62: 775-806.
- SEGEL I.M., (1975). Enzyme kinetics - Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley Classics Library, John Wiley & Sons inc., USA.
- SELMAR D. (1993). Apoplastic occurrence of cyanogenic β -glucosidases and consequences for the metabolism of cyanogenic glucosides. In β -Glucosidases – biochemistry and molecular biology, (Editado por Asim Esen) pp 191-204, ASC Symposium Series.
- SINNOTT M. L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. Chem. Rev., 90: 1171-1202.
- TERRA W.R., FERREIRA C. & DE BIANCHI, A.G. (1979). Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. J. Insect Physiol. 25: 487-494.
- TERRA W.R. & FERREIRA C. (1983). Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara* do not enter the endoperitrophic space. Insect Biochem. 13: 143-150.
- TERRA W.R., FERREIRA C. & BASTOS F. (1985). Phylogenetic considerations of insect digestion. Disaccharidases and spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. Insect Biochem. 15: 443-449.
- TERRA W.R., VALENTIN A. & SANTOS C.B. (1987). Utilization of sugars, hemicelluloses, starch, protein, fat and minerals by *Erinnyis ello* larvae and the digestive role of their midgut hydrolases. Insect Biochem. 17: 1143-1147.
- TERRA W.R. & FERREIRA C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109B: 1-62.

- VAECK M., REYNAERTS A., HOFTE H., JANSENS S., DE BEUCKLEER M., DEAN C., ZABEAU M., VAN MONTAGU M. & LEEMANS J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328: 33-37.
- VAN RIE J. (1991). Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends Biotechnol*, 9: 177-179.
- VAN WEELY S., BRANDSMA M., STRIJLAND A., TAJER J.M. & AERTS M.F.G. (1993). Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1181: 55-62.
- VOLKIN D. B. & KLIBANOV A. M. (1990). Minimizing protein inactivation. In Protein function: a practical approach (Edited by T. E. Creighton) pp 1-24, IRL Press, Oxford.
- WACKER H., KELLER P., FALCHETTO R., LEGLER G. & SEMENZA G. (1992). Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J. Biol. Chem*, 267: 18744-18752.
- WHITE A. & ROSE D. R. (1997). Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 645-651.
- WITHERS S. G., RUPTIZ K., TRIMBUR D. & WARREN R. A. (1992). Mechanistic consequence of mutation of the active site nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β -glucosidase. *Biochemistry*, 31: 9979-9985.
- YU S.J. (1989). β -glucosidase in four phytophagous Lepidoptera. *Insect Biochem.* 19: 103-108.