BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20693

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Rec. 25/05/04

Declarar: 1377751

DBDIA: 26451

Terminal 01C

“ β -GLICOSIDASES E β -TIOGLICOSIDASES DE INSETOS”

LUCAS BLANES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DRA. CLÉLIA FERREIRA TERRA

ORIENTADORA

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005860

Ficha Catalográfica

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

Blanes, Lucas
B642b β -glicosidases e β -tioglicosidades de insetos / Lucas
Blanes. -- São Paulo, 2004.
71p.

Dissertação (mestrado) -- Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ferreira, Clélia

1. Bioquímica : Insetos 2. Enzimologia. I. T.
II. Ferreira, Clélia, orientador.

595.70192 CDD

“ β -glicosidases e β -tioglicosidases de insetos”

LUCAS BLANES

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. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ - USP

Profa. Dra. MARGARETH DE LARA CAPURRO GUIMARÃES
ICB - USP

SÃO PAULO
02 DE ABRIL DE 2004.

SUMÁRIO

I AGRADECIMENTOS	3
II ABREVIACÕES e FÓRMULAS	4
III RESUMO	5
IV SUMMARY	6
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Considerações iniciais	7
1.2 Estrutura do tubo digestivo dos insetos	8
1.3 β -Glicosidases	9
1.4 β -Glicosidases digestivas de insetos	10
1.5 β -Glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e as β -Glicosidases de insetos	14
1.6 Tioglicosídeos e β -tioglicosidases de insetos	16
1.7 Objetivos deste trabalho	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Criação dos animais, dissecação e obtenção das amostras do tubo digestivo	20
2.1.1 <i>Anastrepha fraterculus</i>	20
2.1.2 <i>Anastrepha pickeli</i>	20
2.1.3 <i>Rhynchosciara americana</i>	21
2.1.4 <i>Spodoptera frugiperda</i>	22
2.1.5 <i>Diatraea saccharalis</i>	22
2.2 Obtenção do material presente no fruto de goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	23
2.3 Desenvolvimento de dieta contendo polpa de goiaba para a criação de larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i>	23
2.4 Solubilização das hidrolases de membrana dos cecos de <i>R. americana</i> por papaína	24
2.5 Determinação de atividades enzimáticas	24
2.6 Determinação da concentração de proteínas	25
2.7 Cromatografias	25
2.7.1 Cromatografias de troca iônica em sistema de baixa pressão (EconoSystem)	25
2.7.2 Cromatografias de troca iônica em sistema FPLC (Pharmacia)	26
2.7.3 Cromatografias de interação hidrofóbica em sistema FPLC (Pharmacia)	26
2.8 Eletroforese em cilindro de poliacrilamida 9%	28
2.9 Determinação dos parâmetros cinéticos	28
2.10 Determinação do pH ótimo das enzimas	29
3 RESULTADOS	30
3.1 Desenvolvimento de dieta contendo polpa de goiaba para a criação de <i>A. fraterculus</i> .	30
3.2 Atividades enzimáticas presentes no tubo digestivo de <i>A. fraterculus</i> e <i>A. pickeli</i> .	30
3.3 β -glicosidases digestivas de <i>A. fraterculus</i> e <i>A. pickeli</i>	34
3.4 β -glicosidases digestivas de <i>Rhynchosciara americana</i>	37
3.5 β -tioglicosidases em insetos	56
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
6 CURRICULUM VITAE	70

7 ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	36
FIGURA 2	36
FIGURA 3	38
FIGURA 4	39
FIGURA 5	40
FIGURA 6	42
FIGURA 7	43
FIGURA 8	45
FIGURA 9	46
FIGURA 10	49
FIGURA 11	51
FIGURA 12	52
FIGURA 13	53
FIGURA 14	54
FIGURA 15	55
FIGURA 16	59
FIGURA 17	60
FIGURA 18	62

8 ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	31
TABELA 2	48
TABELA 3	57
TABELA 4	57

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Clélia Ferreira pela orientação, amizade, paciência e confiança durante o desenvolvimento do meu mestrado.

Ao professor Dr. Walter Ribeiro Terra pelas discussões, ensinamentos e amizade.

À professora Dra. Denise Selivon do Instituto de Biociências da USP pela colaboração e amizade e a todos os membros do seu laboratório.

À técnica Elzi pela contribuição na criação de alguns dos insetos usados neste estudo, sem contar seu eterno bom humor e responsabilidade.

Às técnicas Luiza Nakabayashi e Maria Ivanilde Marcolino pelo auxílio prestado na realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório e amigos: Adriana Rios Lopes (Dri), Alexandre Hamilton Pereira Ferreira (Alê), Alexandra Frealdo Dumont (Xanda), Alcides Batista Dias Jr (Alc), Camila, Denise Taffarello, Érica Hotz Almeida (Cakes), Maria Cícera Pereira da Silva (Ciça), Marisa Moura Momoli (Maraisa), Plínio Tadeu Cristofolletti (Plinião), Renata Bolognesi (Rê), Sandro R. Marana, Tamara Rezende de Azevedo, Fábio Kendi Tamaki (Pererê), João Vasconcellos de Almeida (Guliver), Átila Iamarino, Paloma Mieko Sato, Ana Gomez, Lucas Guerra (Luquito), Uirá (UéB), Daniela Soltys (Simoni), Ana Maria Pereira Neto (Aninha), Paulo Zaini (Paulinho), Helder Takashi Imoto (Sinistro), Carlos Alexandre Sigolo (CAOS), Luciano Thomazelli (Hamster), Aline Adria Quinaia (Li), Rodrigo Louro (Louro),..... pelas discussões, amizade, carinho e colaboração na realização desse trabalho.

Agradecimento também a todos os amigos e amigas não citados aqui por falta de espaço, especialmente àqueles pertencentes a Camomila com Pipoca Corporation.

Agradecimento ao Dr. Fernando Ariel Genta (Mig) pela amizade, por todos ensinamentos durante a iniciação científica e mestrado e pelos religiosos cafés matinais.

Aos professores, funcionários e amigos do Instituto de Química e de Biociências.

Agradecimento especial aos meus pais José Blanes Coelho e Cícera Terto França e aos meus irmãos.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Durante a elaboração desse trabalho o laboratório contou com o auxílio concedido pela FAPESP, CNPq e PRONEX.

ABREVIACES E FRMULAS

CAPS	(3-[ciclohexilamino]-1-ácido propanosulfnico)
CMC	concentra micelar crtica
EPPS	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[3-cido propanosulfnico])
EV	epitlio do ventrculo
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
ISO	isopropil
K _a	constante de ativa
K _M	constante de Michaelis
MUDglu	metilumbeliferil--D-glicosdeo
MUDgal	metilmberiferil--D-galactosdeo
MUDglu	metilumbeliferil--D-glicosdeo
MES	cido (2[N-Morfolino] etanosulfnico)
MP	membrana peritrfica com seu contedo
NPDglu	para nitrofenil--D-glicosdeo
NPDgal	para nitrofenil--D-galactosdeo
NPDfuc	para nitrofenil -D-fucosdeo
NPSDglu	para nitrofenil-tio--D-glicosdeo
NPSDgal	para nitrofenil-tio--D-galactosdeo
NPSDfuc	para nitrofenil-tio--D-fucosdeo
Octil glu	n-octil -D-glicopiranosdeo
PHE	fenil
TAPS	cido (N-tris [Hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfnico)
TGO	mtodo ou reagente de Tris-Glicose-Oxidase
TLCK	N--tosil-L-lisina clorometil cetona
U	unidade de atividade enzimática (1mol/min)
V _{max}	velocidade máxima

No tubo digestivo das larvas de *Anastrepha fraterculus* e *Anastrepha pickeli* há β -glicosidases capazes de clivar dissacarídeos, β -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e substratos sintéticos. As β -glicosidases de *A. fraterculus* são pouco ativas e as de *A. pickeli* são bastante ativas sobre alguns compostos, entre eles linamarina, um glicosídeo cianogênico. Esse composto está presente, em altas concentrações, no fruto da mandioca do qual a larva se alimenta. *A. fraterculus* alimenta-se do fruto da goiaba e aparentemente consegue o carboidrato que necessita por ação de α -glicosidases, que são bem mais ativas do que as β . O fruto da mandioca não é tão nutritivo e *A. pickeli* deve aproveitar a glicose da linamarina para obter energia e consegue desintoxicar-se do aglicone tóxico.

Rhynchosciara americana apresenta quatro β -glicosidases nas membranas microvilares intestinais, sendo três delas β -galactosidases. Dessas, duas são ativadas por Triton X-100 sendo que a glicosidase, de maior mobilidade eletroforética é ativada por este composto, com uma K_a de 4 μ M, um α de 0,5 e um β de 2.

β -tioglicosidases foram demonstradas em afídeos. Nós verificamos que ocorre a clivagem do tioglicosídeo sinigrina após separação das β -glicosidases digestivas do Lepidoptera *Diatraea saccharalis* por cromatografia hidrofóbica. Nesse inseto, a mesma enzima é capaz de clivar O- e S-glicosídeos com atividades semelhantes. Enzimas com essas características nunca foram descritas anteriormente.

Esses experimentos ilustram a viabilidade das adaptações dos insetos na utilização de compostos formados por ligações β -glicosídicas, viabilizando a exploração de nutrientes normalmente inacessíveis a outros animais.

Summary

Anastrepha fraterculus and *Anastrepha pickeli* have in their midguts β -glycosidases able to hydrolase dissaccharides, synthetic substrate and plant toxic β -glucosides. β -glycosidases from *A. fraterculus* have low activity and the enzymes from *A. pickeli* may be highly active depending on the substrate used. Linamarin, a cyanogenic β -glucoside present in *A. pickeli* food (*Manihot* fruit) is easily hydrolysed by *A. pickeli* β -glycosidases (*A. fraterculus* eats on guava fruits and may obtain carbohydrate through the action of α -glycosidases, that are much more active than the β -glycosidases). *A. pickeli* probably uses glucose derived from linamarinan avoiding the effects of the toxic aglycon.

Rhynchosciara americana has 4 β -glycosidases (3 galactosidases and 1 glucosidase) in their intestinal microvillar membranes. Two of these enzymes are activated by Triton X-100. In β -glucosidase the activation has $K_a = 4\mu\text{M}$, $\alpha = 0,5$ e $\beta = 2$.

β -thioglycosidases occur in Aphids. One digestive β -glucosidase from *Diatraea saccharalis* resolved by hydrofobic chromatography hydrolyses sinigrin. The same enzyme may hydrolyse O- and S-glucosides with the same efficiency. Enzymes with this specificity have never been described before.

In this study we shown some adaptations of insects to use substrates with β -glycosidic bonds, allowing these organisms to explore nutrients usually avoided by other animals.

1 Introdução

1.1 Considerações iniciais

Existem mais de 750.000 espécies de insetos descritas, sendo o maior grupo de animais conhecidos. Cerca de 70 % das espécies de animais é representada por este grupo, evidenciado seu tremendo sucesso, tanto pelo número de espécies e de indivíduos como pela sua grande irradiação adaptativa. O sucesso dos insetos pode ser atribuído a vários fatores, mas certamente a evolução do vôo concedeu a esses animais uma vantagem distinta sobre os outros invertebrados terrestres. Esse grandioso grupo possui variadas características no que diz respeito tanto a aspectos morfológicos como fisiológicos (Barnes & Rupert, 1996). As diferenças fisiológicas existentes entre os organismos das várias ordens de insetos são normalmente maiores do que a encontrada em outros grupos como os mamíferos, por exemplo. Por isso, generalizações não podem ser feitas como normalmente é feito para os mamíferos. Dessa forma, para a compreensão de uma determinada característica em insetos é necessário que se estude várias ordens e, muitas vezes, diferentes espécies de uma mesma ordem.

Outra das características que levaram os insetos a tamanho sucesso evolutivo foi a sua capacidade de minimizar a competição intraespecífica, adotando hábitos alimentares distintos quando larva e quando adulto. A capacidade de alimentar-se de variadas dietas e também de driblar as estratégias desenvolvidas pelas plantas contra a herbivoria foram fatores preponderantes para seu sucesso. Um maior conhecimento sobre a presença e as propriedades das enzimas digestivas nos insetos pode levar a um melhor planejamento de estratégias de controle, como por exemplo, a utilização de inibidores específicos de enzimas digestivas de insetos, levando a diminuições de perdas agrícolas e do uso de agrotóxicos.

1.2 Estrutura do tubo digestivo dos insetos

Um esquema geral do intestino dos insetos está apresentado na figura abaixo. O intestino anterior começa na boca e inclui a cavidade bucal (no qual as glândulas salivares liberam sua secreção), a faringe, o esôfago e o papo. O intestino anterior é coberto por cutícula e em alguns casos ele pode ser reduzido a um pequeno tubo. O intestino médio representa a porção mais importante do intestino na digestão do alimento pelos insetos. Ele consiste de um tubo simples chamado ventrículo, que pode apresentar extensões em forma de sacos com fundo cego, presentes normalmente no início do intestino médio, denominados cecos gástricos. Na maioria dos insetos, no interior do intestino ocorre uma estrutura membranosa, em forma de tubo, de constituição quitino-proteica. Essa membrana é denominada membrana peritrófica e divide o lúmen do intestino médio em dois espaços; um dentro da membrana, denominado espaço endoperitrófico, e outro entre a membrana e o epitélio do intestino médio, denominado espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter que separa o intestino médio e o posterior encontram-se os tubos de Malpighi, estruturas responsáveis pela excreção nesses animais. O intestino posterior, como o anterior, também é coberto por uma cutícula. Ele inclui o íleo e o reto, que são estruturas envolvidas na absorção de água, terminando no ânus.

- Esquema geral do tubo digestivo dos insetos. Copiado de Terra & Ferreira (1994).

1.3 β -glicosidases

Sempre que nos referirmos a β -glicosidases (EC 3.2.1) estaremos falando de enzimas que clivam ligações glicosídicas na configuração β . Essas enzimas removem monossacarídeos a partir da porção não redutora do substrato, podendo clivar dissacarídeos, oligossacarídeos, β -glicosídeos produzidos por plantas, alquil glicosídeos e as vezes até polissacarídeos (ver Ferreira *et al*, 2001). São enzimas que realizam a digestão intermediária e final de celulose e hemiceluloses, componentes abundantes nas paredes celulares das células vegetais. Elas possuem duas regiões no sítio ativo, uma região chamada de sítio do glicone, onde se liga um monossacarídeo e a região do aglicone, onde se liga o restante do substrato. As glicosidases apresentam apenas 1 subsítio (-1) de ligação do monossacarídeo na ponta não redutora do carboidrato, daí a sua capacidade de liberar apenas monossacarídeos pela clivagem enzimática do substrato. Os subsítios que interagem com os demais resíduos (+1,+2,+3, etc.) podem variar em número e são chamados de subsítios de ligação do aglicone, pois podem interagir com resíduos de monossacarídeos ou com grupos como aril e alquil, por exemplo. Essa numeração dos subsítios de acordo com o ponto de clivagem do substrato foi proposta por Davies e colaboradores (1997).

As β -glicosidases podem hidrolisar substratos contendo diferentes monossacarídeos na posição do glicone, tais como glicose, galactose, fucose e xilose (Marana *et al*, 2001). Dependendo de qual tipo de substrato é melhor clivado, a enzima pode ser chamada de β -glicosidase, β -galactosidase, β -fucosidase, etc.

Em nosso idioma, não existe, como na língua inglesa, a distinção entre enzimas que clivam ligações glicosídicas quaisquer (β -glycosidases) e as que hidrolisam substratos onde a glicose ocupa o sub-sítio do glicone (β -glucosidases).

1.4 β -glicosidases digestivas de insetos

As β -glicosidases de insetos podem ser encontradas na forma solúvel dentro do lúmen do intestino do inseto, aderidas fraca ou fortemente ao glicocálix, ou ligadas à membrana microvilar dos enterócitos, como observado em *Rhynchosciara americana* (ver Terra & Ferreira, 1994).

O número de β -glicosidases no tubo digestivo de insetos pode variar. Existem insetos que possuem apenas uma β -glicosidase capaz de clivar vários substratos. Outros insetos, no entanto, possuem de duas a quatro dessas enzimas com especificidades mais restritas, mas que em conjunto atuam na clivagem de diversos substratos (Ferreira *et al*, 1998).

De modo geral, as β -glicosidases digestivas melhor caracterizadas em insetos apresentam massas moleculares que variam de 30 a 150 KDa e os valores determinados para seus pontos isoelétricos (pIs) variam de 3,7 a 6,8. Os valores de pH ótimo normalmente encontrados variam de 4,5 a 6,5 na maioria dos insetos, com exceção das β -glicosidases de Lepidoptera que apresentam um pH ótimo mais elevado (Terra & Ferreira, 1994). As determinações dos valores de Km para NP β Dglu (substrato sintético mais utilizado para detecção de β -glicosidases) ou celobiose (glicose β -1,4-glicose) variam de 0,2 a 2mM.

Embora hidrolisando substratos similares, as β -glicosidases possuem especificidades diferentes, preferindo β -glicosídeos ou galactosídeos como substrato; com porções hidrofílicas ou hidrofóbicas no aglicone. A maioria das β -glicosidases estudadas até o momento preferem β -glicosídeos a galactosídeos.

Baseando-se na eficiência catalítica relativa sobre vários substratos, Terra e Ferreira (2004) propuseram a divisão das β -glicosidases intestinais de insetos em duas classes. A classe A inclui as enzimas que clivam com eficiência substratos com aglicones hidrofílicos, tais como dissacarídeos ou oligossacarídeos. A classe B é formada por enzimas com alta atividade sobre substratos com aglicones hidrofóbicos tais como alquil-, p-nitrofenil- e metil umbeliferil-glicosídeos. Enzimas da classe A são mais abundantes que as da classe B.

Na classe A as β -glicosidases possuem um subsítio para ligação de glicose na região do glicone (-1) e 3 na região do aglicone (+1, +2, +3). Algumas dessas enzimas parecem estar adaptadas para usar dissacarídeos além de oligossacarídeos. A alta atividade sobre dissacarídeos se deve a alta afinidade por glicose dos sub sítios -1 e +1 (Ferreira *et al*, 2003), enquanto as enzimas muito ativas sobre oligossacarídeos têm afinidades similares por glicose nos subsítios -1, +1 e +2 (Ferreira *et al*, 2001; 2003).

Enzimas da classe A clivam ligações glicosídicas β -1,3, β -1,4 e β -1,6 de di- e oligossacarídeos, e devem ter como papel a digestão intermediária e final de celulose e hemiceluloses. Enzimas da classe B muitas vezes são galactosidases ou são as principais responsáveis pela clivagem de galactosídeos no animal. Uma vez que essas enzimas são muito ativas sobre substratos com aglicones hidrofóbicos, seu papel fisiológico pode ser o de clivar galactolípídeos muito abundantes nas membranas dos tilacóides (ver Terra e Ferreira, 2004).

Esses galactolípídeos são 2,3 diacil β -D-galactosil D-glicerol (mono galactosil diglicerídeo) e o 2,3 diacil 1- α -galactosil 1,6 β -galactosil D-glicerol (digalactosil diglicerídeo). Esses são os principais glicolípídeos do reino vegetal e estão presentes nos tecidos fotossintéticos (Harwood, 1980). Digalactosil diglicerídeos podem ser convertidos em monogalactosil diglicerídeo pela ação de α -galactosidases capazes de clivar substratos com aglicones hidrofóbicos. Enzimas desse tipo já foram detectadas em insetos (Grossmann & Terra, 2001).

Em *Tenebrio molitor* (Ferreira *et al*, 2003) e em *Abracris flavolineata* (Marana *et al*, 1995) foi mostrado que há uma β -glicosidase que é ativada por Triton X-100. Essas enzimas são também bastante ativas sobre glicosídeos com aglicones hidrofóbicos. A ativação dessas enzimas por substâncias anfipáticas tais como o Triton X-100 pode ser uma adaptação para que elas só sejam muito ativas na vizinhança das membranas, aonde estariam presentes os seus substratos (os glicolípídeos). Essa adaptação diminuiria a possível clivagem de glicosídeos tóxicos, que são solúveis (ver Terra e Ferreira, 2004 e item 1.5).

A região de ligação do aglicone pode ser comparada verificando-se a ligação de alguns compostos. Conforme comentado anteriormente, há diferenças na afinidade por resíduos de glicose entre os vários sub-sítios que ligam esse composto. A energia livre de ligação de resíduos CH_2 pode ser determinada usando uma série de alquil glicosídeos com número diferente de carbonos como substrato (determinando-se o K_m) ou como inibidor (determinando-se o K_i). A análise desses resultados mostra que a região do aglicone é homogeneamente hidrofóbica em grande extensão, pois a energia de ligação de cada resíduo CH_2 é a mesma (ver Marana *et al*, 2001; Ferreira *et al*, 2001). Os valores obtidos para a energia de ligação de cada resíduo CH_2 no sítio do aglicone foi de -1,3KJ/mol para a βgly 50 de *S. frugiperda* e de -0,97KJ/mol para a βgly 1 de *Tenebrio molitor*, ambas enzimas pertencentes a classe A descrita acima (Marana *et al*, 1995; Ferreira *et al*, 2001). Surpreendentemente, o mesmo valor obtido para a alquil β -glicosidase de *Abracris flavolineata* (Marana *et al*, 1995), que é uma enzima da classe B, foi de -0,47KJ/mol (Marana, Terra e Ferreira, dados não publicados). Uma vez que as enzimas de *S. frugiperda* e *T. molitor* mencionadas acima clivam eficientemente substratos com aglicones mais hidrofóbicos que a β -glicosidase de *A. flavolineata*; não é a hidrofobicidade da região do aglicone o determinante para que substratos hidrofóbicos sejam utilizados. Resultados semelhantes a esse são encontrados quando se estuda β -glicosidases de mamíferos (ver Gopalan *et al*, 1989). Nesses animais a hidrofobicidade da região do aglicone da cerebrosidase lisossômica (cujos substratos são glicolipídeos) é menor que a apresentada pela mesma região presente na β -glicosidase citossólica, que não cliva glicolipídeos. Talvez uma região do aglicone com uma maior extensão homogeneamente hidrofóbica seja mais importante do que a hidrofobicidade em si. Entretanto, mais estudos necessitariam ser realizados para esclarecer esse ponto.

A região do glicone foi menos estudada do que a do aglicone na βGly 50 de *S. frugiperda*. Marana *et al*, (2002) mostraram que a preferência da enzima por fucosídeos, glicosídeos ou galactolipídeos é dada por interações do carboidrato que ocupa o sítio do glicone

com resíduos específicos de aminoácidos presentes nessa região. No caso da β Gly 50 de *S. frugiperda*, a especificidade depende principalmente de interações não covalentes de um resíduo de E (E₄₅₁) com algumas hidroxilas presentes no substrato.

Azevedo *et al* (2003) compararam a especificidade das β -glicosidases presentes em *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *T. molitor* utilizando relações lineares de energia livre. Isso é feito comparando-se o coeficiente de correlação linear e a inclinação da reta do plote de $\log(k_{cat}/K_m)$ para vários substratos clivados por uma enzima, contra os mesmos parâmetros determinados para a outra enzima. k_{cat}/K_m reflete as interações da enzima com o substrato no estado de transição. Se dois sítios ativos são idênticos, o plote terá uma inclinação e um coeficiente de correlação linear igual a 1. Nesse caso, os tipos e as forças das interações são as mesmas nas duas enzimas. O plote de k_{cat}/K_m para pares de enzimas é chamado de relação linear de energia livre porque k_{cat}/K_m está diretamente relacionado ao ΔG de ativação (ver Withers & Rupitz, 1990; Sierks *et al*, 1992).

Quando essas comparações foram feitas com as β -glicosidases encontradas em *T. molitor* (Coleoptera), que possui três dessas enzimas; em *D. saccharalis* (Lepidoptera), possui 3 β -glicosidases e *S. frugiperda* (Lepidoptera) possui 2 β -glicosidases; verificou-se o seguinte resultado: As enzimas mais semelhantes foram as encontradas em *D. saccharalis* e em *T. molitor*, embora eles pertençam a ordens filogeneticamente distantes. Uma vez que esses dois insetos possuem o mesmo número de β -glicosidases (enquanto o outro Lepidoptera utilizado apresenta um número menor dessas enzimas), Azevedo *et al* especularam a possibilidade de que insetos com o mesmo número de β -glicosidases apresentariam enzimas com especificidades semelhantes (uma a uma). Certamente a caracterização de um número maior dessas enzimas, derivadas de insetos de várias ordens é necessária para que essa hipótese possa ser ou não reforçada.

1.5 β -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e as β -glicosidases de insetos

Muitas espécies de plantas produzem glicosídeos que possuem um grupo aglicone hidrofóbico, muitas vezes aromático, e muito tóxico quando separado da porção glicosídica. Esses glicosídeos tóxicos estão presentes em concentrações que podem variar de 0.5 a 1% do peso seco do órgão (Spencer, 1998). A produção destes glicosídeos pelas plantas pode ser entendida como uma forma de defesa contra a herbivoria. Alguns desses β -glicosídeos são cianogênicos, liberando um ácido cianídrico espontaneamente após a ação de uma β -glicosidase (Spencer, 1998; Vetter, 2000). Os insetos que possuem essas enzimas podem clivar glicosídeos ligados a compostos hidrofóbicos em maior ou menor grau. Desse modo, além de ter um papel importante na digestão, as β -glicosidases são importantes na interação inseto-planta.

Entretanto, não é só a cianogênese que é importante para repelir o inseto predador. Uma das indicações disso é o fato do esqueleto químico que carrega o cianeto ser bastante variado e muitas vezes bastante complexo, o que demanda mais energia para sua síntese. Entre os aglicones desses β -glicosídeos temos aldeídos e cetonas que podem reagir com resíduos de aminoácidos e ácidos nucleicos. Cetonas apresentam maior toxidez para insetos que para mamíferos, uma vez que em insetos, elas podem desnaturar a cutícula flexível do integumento (Spencer, 1998) e, pode-se especular, afetar a estrutura quitino-proteica que forma a membrana peritrófica. Os aglicones produzidos pela clivagem dos glicosídeos tóxicos também levam a formação de compostos capazes de inibir a glicose 6-fosfato desidrogenase (Desroches *et al.*, 1997) e a trealase (Silva *et al.*, 2004), enzima fundamental para o metabolismo dos insetos, uma vez que esses apresentam uma trealosemia e não uma glicemia.

As estratégias utilizadas pelos insetos para alimentarem-se de vegetais que produzem glicosídeos tóxicos ainda são pouco conhecidas, mesmo porque há um número muito grande de β -glicosídeos tóxicos e não se sabe se há estratégias diferentes de desintoxicação dependendo do β -glicosídeo em questão.

A larva do Lepidoptera *Papilio glaucus glaucus* possui uma β -glicosidase bastante ativa em seu intestino médio, responsável pela hidrólise de glicosídeos fenólicos e liberação de aglicones tóxicos. Essa subespécie tem sua sobrevivência comprometida quando ingere plantas produtoras de glicosídeos fenólicos, como as salicáceas. Por outro lado, a subespécie *Papilio glaucus canadensis* é capaz de consumir plantas produtoras de glicosídeos fenólicos graças à inibição da atividade de uma β -glicosidase em seu intestino médio, que evita que o aglicone tóxico seja produzido (Lindroth *et al*, 1988).

As larvas do bruquídeo *Calosobruchus maculatus*, que emergem sobre sementes da leguminosa *Vicia faba*, não conseguem completar seu desenvolvimento. Isso se deve ao alto conteúdo do glicosídeo vicina nas sementes das plantas, que é convertido ao aglicone divicina, que inibe a glicose 6-fosfato desidrogenase. Algumas linhagens de *C. maculatus* foram selecionadas graças à capacidade de suas larvas de se desenvolverem em sementes de *V. faba*. Uma investigação mais detalhada demonstrou a diminuição da hidrólise de vicina pelas larvas selecionadas, e o armazenamento do glicosídeo na hemolinfa até a idade adulta. Esse tipo de mecanismo de defesa do inseto não envolve um custo metabólico muito alto, já que não há metabolização do composto tóxico (Desroches *et al*, 1997).

Nosso laboratório investigou a relação entre a atividade de β -glicosidases e a presença de amigdalina (um β -glicosídeo cianogênico) na dieta das larvas de dois Lepidoptera, *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* (Ferreira *et al*, 1997). Em *S. frugiperda* praticamente nenhum efeito foi verificado. Por outro lado, nas larvas de *Diatraea saccharalis* o desenvolvimento é afetado, embora a emergência dos adultos não tenha sido comprometida (Ferreira *et al*, 1997).

A molécula de amigdalina (glicose β -1,6 glicose β -1 mandelonitrila) tem duas ligações glicosídicas. A hidrólise da primeira ligação produz glicose e prunasina (glicose β -mandelonitrila). A hidrólise dessa substância produz glicose e mandelonitrila, que

espontaneamente gera HCN. As larvas de *S. frugiperda* possuem duas β -glicosidases em seu intestino médio, ambas com atividade sobre amigdalina e gentiobiose (glicose β -1,6 glicose), mas com praticamente nenhuma atividade sobre prunasina (Marana *et al*, 2000 e 2001). Desse modo o inseto pode aproveitar uma das glicoses presentes na amigdalina, mas não libera o composto tóxico.

As larvas de *D. saccharalis* possuem três β -glicosidases com diferentes especificidades (Azevedo *et al*, 2003). Verificou-se que quando criada em dieta contendo amigdalina, as larvas de *D. saccharalis* diminuem a atividade da β -glicosidase que é muito ativa sobre prunasina, e desse modo não é liberado o composto cianogênico (Ferreira *et al*, 1997; Azevedo *et al*, 2003). Nos insetos, a ocorrência de várias β -glicosidases intestinais, com diferentes especificidades, pode ser uma adaptação dos ancestrais de diferentes grupos a dietas contendo variados glicosídeos tóxicos produzidos por plantas (Terra & Ferreira, 1994).

1.6 Tioglicosídeos e β -tioglicosidases de insetos

Tioglicosídeos são compostos que constituem uma classe de metabólitos secundários comumente conhecidos como glicosinolatos. Estes são bastante distribuídos em vegetais (Van Etten & Tookey, 1983) e aparentemente também desempenham um papel na proteção da planta contra herbivoria (Pontoppidan *et al*, 2001). A hidrólise de glicosinolatos gera um aglicone lábil, que rapidamente sofre rearranjo espontâneo, eliminando HSO_4^- e originando vários compostos tóxicos como isotiocianato, tiocianatos, nitrilas e outros. Os produtos da reação dependem de vários fatores tais como o pH do meio, presença de íons de ferro e da natureza do aglicone (ver Jones *et al*, 2001).

β -tioglicosidases são S-glicosidases classificadas no EC 3.2.3.2, porém apresentam a sequência de aminoácidos, estrutura terciária e mecanismo de catálise muito semelhante ao das O-glicosidases, enzimas essas classificadas no EC 3.2.1.21 (Henrissat & Davies, 1997). As

tioglicosidases são encontradas em alguns grupos de plantas e parecem estar envolvidas no mecanismo de defesa contra a predação por animais herbívoros (McDanell *et al*, 1988).

Antes dos estudos realizados com a tioglicosidase do afídeo *Brevicoryne brassicae*, as únicas β -tioglicosidases caracterizadas eram de plantas. As propriedades encontradas para as enzimas de vegetais e para essa enzima derivada do inseto variam em alguns pontos importantes. Tanto as β -tioglicosidases de plantas como de *B. brassicae* pertencem à família 1 das glicosídeo hidrolases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy>). Nessa família os grupos catalíticos normalmente são duas carbonilas, uma que funciona como nucleófilo e outra como doador de prótons (ver Withers, 2001). Entretanto, as β -tioglicosidases de plantas possuem um resíduo de glutamato que atua como nucleófilo, mas não apresentam o doador de prótons, tendo um resíduo de glutamina nessa posição (Jones *et al*, 2002). Essa substituição seria pelo menos em parte a responsável pela especificidade diferencial de O- e S-glicosídeos (ver Pontopiddan *et al*, 2001). Por outro lado, a β -tioglicosidase de *B. brassicae* apresenta os dois grupos catalíticos como as demais O-glicosidases (Jones *et al*, 2002). Um anticorpo gerado contra a enzima do inseto não reconhece a enzima presente na planta, e vice-versa, indicando que possuem epitopos diversos (Jones *et al*, 2001). Além disso, a β -tioglicosidase do afídeo apresenta sequência de aminoácidos mais semelhantes às β -glicosidases digestivas de insetos do que às tioglicosidases de plantas (Jones *et al*, 2002). Pelo descrito acima, é possível que as propriedades das β -tioglicosidases de insetos sejam razoavelmente diferentes daquelas encontradas nas enzimas presentes em plantas.

Há duas hipóteses para a função das β -tioglicosidases. Uma é que ela seria nutricional e permitiria ao inseto aproveitar energeticamente o glicosídeo ou ainda poder utilizar o nitrogênio e ou o enxofre presente no aglicone. Outra hipótese é que ela serviria como proteção para minimizar efeitos deletérios dos produtos de degradação da mirosinase de plantas, podendo formar produtos de hidrólise menos tóxicos que os formados pela enzima da planta (ver Pontopiddan *et al*, 2001). Essa hipótese parece estranha, porque uma vez o glicosinolato

hidrolisado pela enzima da planta, nada poderia ser feito pela enzima do inseto. O único outro grupo, além de afídeos, em que se detectou essa enzima foi em *Schistocerca gregaria*, onde foi demonstrada sua indução após alimentação do animal com dieta contendo glicosinolato (Mainguet et al, 2000). Certamente o papel dessa enzima nos insetos ainda é obscuro, assim como a sua distribuição nas diferentes ordens.

1.7 Objetivos deste trabalho

Nosso grupo tem estudado vários aspectos das β -glicosidases há alguns anos. Várias hipóteses foram aventadas a respeito de certas propriedades das β -glicosidases, que só o estudo de um número maior de enzimas pode vir a corroborar ou rejeitar. Entre as principais ordens de insetos, a única que não teve as β -glicosidases estudadas em detalhe foi Diptera. Devido a isso, e as características apresentadas pelo gênero *Anastrepha*, descritas abaixo, decidimos inicialmente estudar duas espécies desse gênero.

O gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) compreende quase 200 espécies, sendo que muitas delas causam grandes danos à agricultura, pois suas larvas se alimentam da polpa de frutas (Morgante *et al*, 1996). Algumas destas espécies são muito restritas quanto ao tipo de plantas que ingerem, como *Anastrepha pickeli*, cujas larvas se alimentam do fruto da mandioca, ricas no glicosídeo cianogênico linamarina (Morgante *et al*, 1996; Mc Mahon *et al*, 1995). Devido a isso escolhemos *A. pickeli* e *A. fraterculus*, que se alimenta de goiaba, para estudarmos as β -glicosidases.

Além das duas espécies de *Anastrepha*, utilizamos também a larva do Diptera *Rhynchosciara americana*, que já sabíamos ter suas β -glicosidases como enzimas integrantes de membrana. Seria interessante verificar suas propriedades, uma vez que todas as outras β -glicosidases que estudamos eram solúveis.

Além disso, decidimos verificar a possibilidade de haver β -tioglicosidases em outras ordens de insetos além das mencionadas anteriormente, uma vez que essas enzimas, como as β -glicosidases são importantes na interação inseto planta.

2 Materiais e Métodos

2.1 Criação dos animais, dissecação e obtenção das amostras do tubo digestivo

2.1.1 *Anastrepha fraterculus*.

As moscas adultas de *Anastrepha fraterculus* foram criadas a 26° C sob fotoperíodo natural. Elas foram alimentadas com uma dieta contendo açúcar mascavo (21%), açúcar branco (39%), levedo de cerveja (5%), sustagem (0.4%), Nipagim (antifúngico) (0.1%), mel de abelha (8.5%) e hidrolisado de proteínas (26%). Foi fornecida água em abundância. Essas moscas foram criadas em gaiolas de 30cm X 30cm X 30cm (Selivon *et al*, 1999). As larvas foram criadas em goiabas comuns (*Psidium guayava*), e dissecadas cinco dias antes do início do período de pupa, em pleno período de alimentação. As dissecações foram feitas em NaCl 150 mM a 4° C. Para a separação do tubo digestivo completo das larvas, foram retirados a glândula salivar, túbulos de Malpighi, corpos gordurosos e grandes traquéias. Este material foi então homogeneizado em água bidestilada a 4°C em um homogeneizador do tipo Potter-Ehveljem, acoplado a um motor (Tecnal, modelo TE-039). Este material foi recolhido, filtrado em uma malha de nylon de 45 µm, sendo utilizado para realização de ensaios enzimáticos. As cromatografias foram realizadas com a fração solúvel deste homogeneizado, obtidas após a centrifugação a 20.500g durante 30 minutos a 4°C.

2.1.2 *Anastrepha pickeli*

As larvas de *A. pickeli* foram obtidas diretamente dos frutos de mandioca (*Manihot esculenta*) coletados, na cidade de Louveira, São Paulo, pois até o momento não foram desenvolvidas formas de criar essas larvas em laboratório. As moscas adultas de *A. pickeli* podem viver sob as mesmas condições em que vivem *A. fraterculus*. Foi verificado que após a eclosão de suas pupas, essas podem sobreviver por pelo menos um mês sem água e nenhum tipo de

alimento. Os frutos infestados por *A. pickeli* não são visualmente distintos dos não infestados, e sua retirada do fruto só pode ser feita em laboratório, para imediata dissecação. Cada fruto contém apenas uma larva de *A. pickeli*. As larvas foram dissecadas, e homogeneizadas em água e as preparações realizadas, da mesma forma que as larvas de *A. fraterculus*.

2.1.3 *Rhynchosciara americana*

As larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera, Sciaridae) são usualmente encontradas debaixo de plantas em decomposição, em bananais da orla marítima e alimentam-se principalmente de húmus. Em laboratório as larvas podem ser criadas com folhas de batata doce picadas e umedecidas (Lara *et al*, 1965). Neste estudo utilizamos fêmeas no final do 2º período do 4º estágio (Terra *et al*, 1973). Neste estágio as larvas permanecem a maior parte do tempo sob o alimento, de onde elas são coletadas e então dissecadas. As larvas foram lavadas em água destilada, dispostas sobre gelo picado para ficarem imóveis, e em seguida, dissecadas em NaCl 0.1M a 4°C. Para a separação do tubo digestivo completo das larvas, foram retiradas as glândulas salivares, túbulos de Malpighi, corpos gurdurosos e traquéias. Logo depois, com auxílio de uma pinça os cecos gástricos foram separados e lavados. Este material foi então homogeneizado em KCl 0.11M pH 7 a 4°C, em um homogeneizador do tipo Potter-Ehveljem, acoplado a um motor (Tecnal, modelo TE-039). Este material foi recolhido e filtrado em uma malha de nylon de 45 µm. Após este procedimento, o material foi centrifugado a 4°C por 30 minutos a 20.500 g. O sobrenadante (fração solúvel) foi mantido a -20°C. O precipitado foi re-homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0.1M, pH 7 (antes de ser tratado com papaína) ou em água, para outros experimentos.

2.1.4 *Spodoptera frugiperda*

Larvas da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram criadas de acordo com o método de Parra (1986). As larvas eram acondicionadas individualmente em tubos de vidro com uma dieta à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), gérmen de trigo, levedo e ágar, sendo mantidas sob um fotoperíodo natural (verão 14L:10E; inverno 10L:14E) a 25°C. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel 10%. Para os experimentos foram utilizadas larvas do quinto instar de ambos os sexos, com o intestino repleto de alimento, sendo dissecadas em NaCl 125mM. Na dissecação, o epitélio do ventrículo (EV) foi separado da membrana peritrófica com seu conteúdo (MP), sendo esses dois materiais homogenizados em água bidestilada separadamente, com auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Ehveljem. Antes da centrifugação este material foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para a completa solubilização de suas β -glicosidases.

2.1.5 *Diatraea saccharalis*

As larvas da broca da cana *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) foram fornecidas pelo Prof. Dr. J.R.P. Parra do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”. Suas larvas são criadas em dieta artificial à base de gérmen de trigo, farelo de soja, sacarose, sais de Wesson, nipargin, ácido ascórbico, cloreto de colina, formol 37%, vita gold, antibióticos tetrax ou tetraciclina, solução vitamínica, ágar e água destilada (Parra & Mihsfeldt, 1992). Foram utilizados insetos do último estágio larval que apresentavam o tubo digestivo repleto de alimento. Após a dissecação em NaCl 125mM do tubo completo, foi separado o epitélio do ventrículo (EV) da membrana peritrófica com seu conteúdo (MP). Estes dois materiais foram homogeneizados separadamente em água bidestilada em um homogeneizador do tipo Potter-Ehveljem. As cromatografias foram realizadas com a fração solúvel do homogeneizado do EV após centrifugação a 30.000g durante 30 minutos a 4°C. Antes da centrifugação este material foi

submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para a completa solubilização de suas β -glicosidases.

2.2 Obtenção do material presente no fruto de goiaba (*Psidium guajava*)

Inicialmente toda a polpa de uma goiaba foi retirada com uma colher e homogeneizada em um cadinho. Uma amostra de 1,5g dessa polpa foi homogeneizada em 1mL de água bidestilada a 4°C em um homogeneizador do tipo Potter-Ehveljem, acoplado a um motor (Tecnal, modelo TE-039). Este material foi recolhido e filtrado em uma malha de nylon de 45 μ m. A cromatografia (ver item 2.7.1) foi realizada com a fração solúvel deste homogeneizado, obtida após a centrifugação deste a 20.500g durante 30 minutos a 4°C.

2.3 Desenvolvimento de dieta contendo polpa de goiaba para a criação de larvas de *Anastrepha fraterculus*

A criação de *A. fraterculus* normalmente é feita colocando-se goiabas na gaiola onde vivem as moscas. Após uma semana as goiabas são retiradas e transferidas para um pote contendo vermiculita. As larvas resultantes dos ovos depositados sobre as goiabas penetram nos frutos e alimentam-se durante aproximadamente 15 dias. Após este período as larvas saem da goiaba e pupam.

Para a preparação da dieta com polpa de goiaba, os frutos são colocados em uma caixa de papelão vedada para não ocorrer contaminação. Após este período os frutos adquirem consistência semelhante àqueles que estão na vermiculita com as larvas se desenvolvendo. Nessa hora é retirada a polpa dos frutos, acrescenta-se 0,5 g de Nipagim / 100g de polpa, e mistura-se até a obtenção de uma massa homogênea. Cerca de 40 gramas dessa massa são transferidas para copos plásticos pequenos (50mL) para onde são transferidas as larvas. A dieta suporta o crescimento de 1 larva/grama de dieta.

2.4 Solubilização das hidrolases de membrana dos cecos de *R. americana* por papaína.

Para ativar a papaína, incubou-se 2,8 mg dessa enzima a 37°C por cinco minutos na presença de tampão fosfato de potássio 60 mM contendo 50mM de cisteína. A suspensão de membranas obtidas como descrito no item 2.13 foi incubada a 30°C com papaína ativada, numa razão de 1 mg de papaína para 10 mg de proteína de membrana. Ao final de uma hora de incubação a 30°C com agitação, foi adicionado TLCK de forma a este ficar em um excesso molar de 10 vezes em relação à papaína, sendo esse material submetido então a uma nova centrifugação a 20.500g durante 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado, sendo o sobrenadante usado para a realização de cromatografias e ensaios enzimáticos. A atividade das enzimas ensaiadas nessas preparações permanecem inalteradas por pelo menos um ano, se mantidas a -20°C.

2.5 Determinação de atividades enzimáticas

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando a mistura de reação em banho termostaticado (30°C) por diferentes períodos de tempo. Foram usados controles sem enzima (brancos de enzima) e sem substrato (branco de substrato) que foram incubados do mesmo modo que os experimentais. As atividades sobre os substratos NPβDglu, NPβDgal, NPβDfuc, NPSβDglu, NPSβDgal e NPSβDfuc (10mM) foram determinadas pela dosagem da liberação de p-nitrofenol segundo descrito por Terra *et al* (1979). Com os substratos amigdalina, prunasina, linamarina, celobiose, octil-βglu, laminaribiose, sacarose e sinigrina as atividades foram medidas através de detecção de glicose segundo Dahlqvist (1968). As atividades sobre MUβDglu (10 mM), MUαDglu (1mM) e MUβDgal (0,5mM) foram determinadas através da detecção de metilumbeliferona segundo Baker & Woo (1992). Em geral os substratos usados aqui foram ensaiados em concentração de 10 mM. Nos experimentos com *Anastrepha* os ensaios foram feitos em tampão citrato-fosfato 20 mM pH 5,5. O tampão fosfato 50mM pH 6,2 foi utilizado em praticamente todos os outros ensaios. A detecção de atividade com NPβDglu, NPβDgal e

sinigrina nas cromatografias usando o material proveniente de *Diatraea saccharalis* foram realizadas com substratos 40 mM. Variações nas concentrações de substratos e em soluções tampão serão indicadas ao longo do trabalho. As atividades enzimáticas foram expressas em miliunidades. Uma unidade corresponde a quantidade de enzima que processa 1 μ mol de substrato (ou ligação) por minuto.

2.6 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteína presente nas amostras foi realizada como descrito por Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina de ovo. Também foram realizadas quantificações com íons Ag^+ em meio alcalino (Krystal et al, 1985), também usando ovoalbumina como padrão.

2.7 Cromatografias

2.7.1 Cromatografias de troca iônica em sistema de baixa pressão (Econo System)

Adicionou-se à fração solúvel do intestino médio das larvas de *A. fraterculus* e *A. pickeli* o tampão Etanolamina 200mM pH 9,5 acrescido de 100mM de MgCl_2 (concentrações finais 20mM e 10mM, respectivamente). O material (100 animais/ml) foi aplicado em uma coluna EconoPac-HighQ (10ml) equilibrada com o tampão Etanolamina 20mM pH 9.5 acrescido de 10mM de MgCl_2 . Após a aplicação e a entrada de toda a amostra na coluna, o fluxo foi interrompido por um minuto. Logo após, passou-se pela coluna 5ml do tampão inicial, para remover as proteínas não ligadas à coluna. A eluição foi feita com um gradiente salino (65ml) de 0-0,55M de NaCl preparado no mesmo tampão. Após o gradiente foi aplicado tampão com 1M de NaCl (5ml). Foi utilizado um fluxo de 1mL/min e foram coletadas frações de 0,5mL. Foi realizada uma corrida nessas mesmas condições aplicando-se 1mL da fração solúvel de polpa de goiaba, preparada como descrito no item 2.2.

As amostras de *Diatraea saccharalis* foram aplicadas em EconoPac-HighQ 5mL, tendo sido previamente passadas pela coluna de filtração em gel Hi-Trap Dessalting de 5mL equilibrada com o tampão Etanolamina 20mM pH 9,5. Após o equilíbrio da coluna EconoPac-HighQ com esse mesmo tampão foi aplicada a amostra (25 animais/ml). Após a aplicação e a entrada de toda a amostra (4 ml) na coluna passou-se 5ml do tampão inicial, para remover as proteínas não ligadas à coluna. A eluição da coluna foi feita com um gradiente salino (10ml) de 0-1M de NaCl preparado no mesmo tampão. Após o gradiente foi aplicado tampão com 1M de NaCl (15ml). Foi utilizado um fluxo de 1mL/min e foram coletadas frações de 1mL.

2.7.2 Cromatografias de troca iônica em sistema FPLC (Pharmacia)

Antes da aplicação do material solubilizado por papaína (ver item 2.4) de *R. americana* na coluna Resource Q (20 animais/mL) este foi passado por uma coluna Hi-Trap Dessalting, previamente equilibrada com o tampão CAPS 20mM pH 9,5 contendo 10 mM de MgCl₂. Nesta filtração em gel foi aplicado 1,5mL do solubilizado, sendo coletados 2 mL, assegurando que toda proteína aplicada sairia da coluna equilibrada com o novo tampão. A coluna Resource Q (1mL) foi equilibrada com esse mesmo tampão. Logo após a aplicação dos 2 mL foram passados 5 mL do tampão inicial na Resource Q, para remover as proteínas não ligadas à coluna. A eluição foi feita com um gradiente salino (20ml) de 0,2-0,25M de NaCl preparado no mesmo tampão. Após o gradiente, foi aplicado tampão com 1M de NaCl (5ml). Foi utilizado um fluxo de 1mL/min e foram coletadas frações de 0,4 mL.

2.7.3 Cromatografias de interação hidrofóbica em sistema FPLC (Pharmacia)

As frações com atividade sobre MUβDglu recolhidas da cromatografia de troca iônica em coluna EconoPacHigh-Q (BioRad 10mL) foram reunidas e acrescidas de NaCl de modo a ficarem com uma concentração final de 5M. Foram aplicados (2mL) em três cromatografias

distintas nas colunas Resource PHE, ISO e ETH. Estas colunas foram previamente equilibradas em tampão citrato-fosfato 100mM pH 5,5 com 5 M de NaCl. Após a aplicação da amostra, passou-se pela coluna 5ml do tampão inicial seguido de um gradiente salino (20 mL) de 0-5 M de NaCl nesse mesmo tampão. Após o gradiente foi passado 5mL do tampão sem NaCl . O fluxo foi de 1mL/min sendo coletadas frações de 400µl em todas as corridas.

Os dois picos de atividade de β -glicosidase (B1 e B2) (frações com atividade sobre MU β Dglu), recolhidos da cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q do material de *R. americana* foram acrescidos de (NH₄)₂SO₄, formando soluções finais com 1M deste sal. Estes foram aplicados em duas cromatografias distintas em coluna Resource PHE. Esta coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão MES 200mM pH 6,0 contendo 1M de (NH₄)₂SO₄ e 10 mM de MgCl₂. Para B1, após a aplicação da amostra (1 mL), foram aplicados 5 mL desse tampão, e em seguida um gradiente de 60 mL (0,8-0,2 M) de (NH₄)₂SO₄ nesse mesmo tampão. Após o gradiente foram passados 5 mL do tampão sem sal. Para B2, após a aplicação da amostra (1mL), foram passados 5mL de tampão Mes 200mM pH 6,0 contendo 1M de (NH₄)₂SO₄ e 10mM de MgCl₂, e em seguida um gradiente de 20 mL (1M-0M) de (NH₄)₂SO₄. Após o gradiente foram passados 5 mL do tampão sem sal. O fluxo foi de 1mL/min sendo coletadas frações de 400 µl em todas as corridas. Também foram realizadas cromatografias em coluna Resource PHE com material proveniente de *Diatraea saccharalis*. O pico de atividade sobre NP β Dglu obtido na coluna de troca iônica High Q de 5mL foi acrescido de (NH₄)₂SO₄ até atingir a concentração de 1,7 M deste sal. A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão citrato-fosfato 100mM pH 6 contendo 1,7M de (NH₄)₂SO₄. Após a aplicação da amostra foram passados 5mL desse tampão, e em seguida um gradiente de 20 mL (0,7-0M) de (NH₄)₂SO₄. Após o gradiente foram passados 5 mL do tampão sem sal. O fluxo foi de 1 mL/min sendo coletadas frações de 400 µl.

2.8 Eletroforese em cilindro de poliacrilamida 9%

Um volume de 200 μ l da fração solúvel, obtida após tratamento com papaína das membranas dos cecos gástricos de *R. americana*, foi acrescido com 22,2 μ l de tampão de amostra para eletroforese nativa. Os tampões de amostra e de eletroforese, assim como o cilindro (10cm) de poliacrilamida foram preparados segundo Hedrick & Smith (1968). O tampão de eletroforese foi feito 9 vezes concentrado, permitindo a aplicação de uma maior quantidade de amostra por cilindro. A eletroforese foi desenvolvida a 4°C, sendo aplicado uma corrente elétrica de 2,5 mA por cilindro, durante aproximadamente 4 horas. Terminada a corrida, os géis foram colocados em placas de Petri em tampão citrato-fosfato 10 mM pH 6,0 a 4°C, com agitação durante uma hora, com duas trocas de tampão. Esse procedimento foi adotado para diminuir a concentração de Tris presente no gel, uma vez que essa substância costuma inibir glicosidases. Após este período, os géis foram fracionados em um fracionador de géis de poliacrilamida (Savant Microsystems, USA) em tampão citrato-fosfato 100 mM, pH6. As frações permaneceram a 4°C por 3 horas antes da retirada de alíquotas para os ensaios enzimáticos, para que as proteínas fossem eluídas do gel. Cada fração coletada continha aproximadamente 400 μ l.

2.9 Determinação dos parâmetros cinéticos

O valor da constante de Michaelis e de velocidade máxima foram calculadas utilizando o software Enzfitter (Leatherbarrow, R.J., Elsevier-Biosoft, 1987). Nas determinações de K_m a velocidade de hidrólise foi determinada usando pelo menos dez concentrações diferentes para cada substrato. Os parâmetros de ativação por Triton X-100 (K_a , α e β) foram calculados a partir de replotes de inclinação e intercepto feitos a partir de plotes de Lineweaver-Burk em diferentes concentrações de ativador e também por plotes secundários feito a partir dos replotes (ver Segel, 1993).

2.10 Determinação do pH ótimo das enzimas

Foram realizadas curvas de pH ótimo medidas a 30°C, utilizando como substrato NPβDgal 10mM. Os ensaios foram feitos em soluções tampão 50mM. Para os valores de pH de 3 a 5 foi usado o tampão acetato de sódio e para pH 5 a 7 tampão piperazina. Para os valores de pH 7 a 8 foi usado o tampão EPPS, enquanto para os valores de pH 8 a 9 utilizamos o tampão TAPS. Os pHs dos tampões foram medidos na mistura de reação a 30°C. Esse cuidado é necessário pois o pH da solução pode ser alterado pela concentração e pela temperatura.

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento de dieta contendo polpa de goiaba para a criação de *A. fraterculus*.

No laboratório de Moscas de Frutas da professora Dra. Denise Selivon do Instituto de Biociências da USP já haviam sido desenvolvidas dietas artificiais para a criação de *Anastrepha fraterculus*. Entretanto essas dietas não se mostraram úteis para a criação de larvas em larga escala, como era necessário para nossos experimentos, pois além de ser um procedimento muito demorado, ocorrem grandes perdas no manuseio, além de muitas mortes após a eclosão. Além disso, gostaríamos de criar as larvas em um de seus alimentos naturais como a goiaba e adicionar ao alimento natural quantidades conhecidas de certas substâncias. A dieta desenvolvida por nós suporta o crescimento de 1 larva/grama de alimento e uma longevidade de pelo menos 10 dias nessas condições, sem haver nenhuma morte. Observamos que é de fundamental importância para o sucesso da dieta a presença de Nipagim (antifúngico) e a umidade controlada, para que não ocorra contaminação e seu endurecimento.

Diferentes substâncias podem ser adicionadas a essa dieta com a obtenção de um número grande de insetos. Embora nós não a tenhamos utilizado, conforme será comentado ao longo da dissertação, decidimos descrever sua constituição pois seu desenvolvimento foi demorado e ela poderá ser utilizada pelo nosso ou por outros grupos para verificar o efeito de drogas e diferentes substâncias sobre o desenvolvimento dessas larvas.

3.2 Atividades enzimáticas presentes no tubo digestivo de *A. fraterculus* e *A. pickeli*.

Inicialmente ensaiamos atividade de β -glicosidases presentes nos homogeneizados do tubo digestivo de *A. fraterculus* e *A. pickeli* sobre vários substratos, pois pretendíamos realizar um estudo detalhado da especificidade dessas enzimas. Pode-se notar pelos dados apresentados na **Tabela 1** que em *A. fraterculus* as atividades de β -glicosidase são baixas, qualquer que seja o substrato utilizado.

SUBSTRATO	<i>Anastrepha fraterculus</i> (mU/mg)	<i>Anastrepha pickeli</i> (mU/mg)
MU β Dglu	0,01	0,06
MU β Dgal	0,17	0,03
NP β Dglu	0,05	0,87
NP β Dgal	1,42	1,37
MU α Dglu	0,02	0,02
Amigdalina	0	0,008
Prunasina	0,2	2100
Linamarina	0,03	18700
Celobiose	0,003	7
Octyl β glu	0,02	1400
Laminaribiose	0,06	23700
Sacarose	1,40	3700

Tabela 1- Atividades sobre diferentes substratos nos homogenizados do intestino médio de *Anastrepha fraterculus* e *Anastrepha pickeli*. Os dados são médias de três determinações realizadas em preparação contendo 100 animais.

Em *A. pickeli* a atividade detectada para β -glicosidase é bem alta, principalmente se levarmos em conta alguns substratos tais como laminaribiose (glicose β -1,3 glicose) e linamarina, que é o glicosídeo tóxico, cianogênico, presente no alimento natural destas larvas. No que se refere a β -glicosídeos, *A. fraterculus* possui atividade semelhante sobre os substratos sintéticos e sobre os naturais. A maior atividade β -glicosidásica presente no tubo digestivo desta larva é sobre o galactosídeo sintético NP β Dgal. Mesmo não estando com as enzimas isoladas, podemos dizer que certamente a larva de *A. fraterculus* possui uma β -glicosidase da classe B descrita por Terra & Ferreira, 2004. Conforme comentado na introdução, esses autores propuseram que uma função dessas enzimas seria a de clivar glicolipídeos vegetais.

A. pickeli possui, no conjunto, β -glicosidases com especificidades muito distintas daquelas encontradas em *A. fraterculus*. Levando-se em consideração os glicosídeos sintéticos, vemos que a atividade sobre glicosídeos e galactosídeos é da mesma ordem de grandeza e também que *A. pickeli* cliva muito melhor glicosídeos naturais que os sintéticos (Tabela 1). Isso mostra que certamente essa larva possui pelo menos uma enzima bastante ativa que pertence a classe A descrita por Terra e Ferreira (2004). Conforme comentado anteriormente, esse tipo de enzima teria como função a clivagem de di- e oligossacarídeos presentes na dieta. Como todas as β -glicosidases de insetos descritas até o momento, tanto em *A. fraterculus* quanto em *A. pickeli* há preferência pela clivagem de ligações glicose β -1,3 glicose (laminaribiose) a clivagem de ligações glicose β -1,4 glicose (celobiose), sendo que em *A. pickeli* essa preferência é ainda mais acentuada. A presença, em insetos, de β -glicosidases ativas sobre ligações β -1,3 e β -1,4 permite que eles digiram hemiceluloses, que são polímeros de carboidratos componentes da parede celular vegetal.

Uma vez que as atividades β -glicosidásicas em *A. fraterculus* eram muito baixas, decidimos verificar a atividade de α -glicosidase utilizando sacarose como substrato. Como podemos ver na Tabela 1, esse substrato natural é mais clivado que qualquer outro substrato

dessa classe. O fruto do qual o animal se alimenta possui 86% de H₂O, 1% de proteína, 1% de lipídeos e 12% de carboidratos (ver Morgante *et al*, 1996). Possivelmente a maior parte desse carboidrato (ou os carboidratos dele derivados) sejam α -glicosídeos e o inseto consegue suprir suas necessidades referentes a esses compostos utilizando-se somente de atividades altas de α -glicosidases.

Em *A. pickeli*, a atividade de β -glicosidases é bem maior que a de α -glicosidases. Desse modo, provavelmente o animal utilize a energia da glicose presente no glicosídeo cianogênico linamarina para se desenvolver.

Para nós foi inesperado encontrar uma atividade tão alta sobre o glicosídeo cianogênico linamarina. Nós imaginávamos que *A. pickeli* era capaz de sobreviver ingerindo o fruto da mandioca porque suas β -glicosidases seriam incapazes de clivar esse composto. Desse modo a sua habilidade de utilizar-se do fruto da mandioca seguiria o mesmo padrão dos exemplos dados na introdução, ou seja, uma diminuição da atividade capaz de clivar o glicosídeo tóxico sempre que o animal se depara com ele na dieta. Nosso estudo teve a importância de mostrar que essa não é a única estratégia utilizada pelos insetos e que eles são capazes, em alguns casos, de alimentarem-se de vegetais que contém glicosídeos cianogênicos mesmo possuindo enzimas com alta atividade sobre os mesmos. Nossa intenção inicial era criar *A. fraterculus* em dietas de polpa de goiaba e adicionar à dieta linamarina nas concentrações encontradas na natureza, para verificar seu efeito. Entretanto, ao contrário do que supúnhamos esse inseto praticamente não cliva linamarina, o que nos fez desistir desse experimento.

3.3 β -glicosidases digestivas de *A. fraterculus* e *A. pickeli*

Em *A. fraterculus* nós verificamos que as atividades de β -glicosidases são muito baixas. Embora em *A. pickeli* elas sejam altas, nós não dispomos de uma quantidade muito grande de insetos. Nossa idéia inicial era padronizar todos os experimentos usando o material proveniente de *A. fraterculus* e depois realizar alguns experimentos mais elucidativos com *A. pickeli*. Devido a baixa atividade encontrada em *A. fraterculus* não conseguimos obter todos os resultados desejados. Embora com essas dificuldades decidimos separar as β -glicosidases e obter as informações que fossem possíveis.

Foi comparada a atividade β -glicosidásica presente no precipitado ressuspenso em água e na fração sobrenadante obtida após a centrifugação do homogeneizado do ventrículo de *A. fraterculus*. Este dado mostra que cerca de 63% da atividade sobre MU β Dglu está presente no precipitado e cerca de 37% no sobrenadante, indicando a existência de β -glicosidases ligadas à membranas. Tentamos solubilizar essas enzimas usando papaína do mesmo modo que o descrito para *Rhynchosciara americana*, sem obtermos sucesso. Nós verificamos que quando o precipitado obtido após centrifugação do homogeneizado do ventrículo é ressuspenso em água e recentrifugado, metade da atividade se torna solúvel e a outra metade continua retida na fração membrana. Ao repetir esse processo, o resultado se repete. Não é muito provável que esse fenômeno ocorra pelo fato das β -glicosidases estarem sendo solubilizadas por uma protease endógena, tanto que não obtivemos sucesso na solubilização com papaína, e porque a fração de membranas utilizada nesse experimento não deve conter alta atividade de proteinases (ver dados de Diptera: Cyclorhapha em Espinoza Fuentes e Terra, 1987 e Espinoza Fuentes *et al*, 1987). O provável é que essas enzimas estejam aprisionadas fortemente ao glicocálix, como já foi demonstrado ocorrer em outros insetos (ver Ferreira *et al*, 1990; Ferreira *et al*, 1994) e que está gradativamente desprendendo-se daí. Outra possibilidade é que a enzima sedimentou por estar ligando-se a fragmentos maiores do alimento que estão sedimentando e ou os fragmentos vão

tornando-se menores nas sucessivas ressuspensões ou a enzima vai gradativamente desligando-se dele. Sedimentação de enzimas junto com o alimento já foi mostrado em insetos (Terra et al, 1990; Ferreira et al, 1994). Desse modo, a fração solúvel conteria as enzimas principais presentes nesse tubo digestivo e nós não estaríamos deixando de estudar uma β -glicosidase diferente por não usarmos a fração de membranas.

Embora seja comum a presença de β -glicosidases nos tubos digestivos de insetos, a baixa atividade apresentada por *A. fraterculus* nos levou a pensar na possibilidade dessa enzima estar sendo derivada do alimento ingerido. Um teste dessa hipótese foi feito separando-se essas enzimas em cromatografia de troca iônica do material proveniente do tubo digestivo de *A. fraterculus* e do fruto da goiaba. Como pode ser visto na **Fig. 1**, embora haja uma certa atividade no fruto, ela não é coincidente com aquelas encontradas no material derivado do tubo digestivo do inseto.

No que se refere a *A. pickeli*, a alta atividade apresentada pelas enzimas sugere fortemente que elas sejam sintetizadas pelo inseto. Sempre que β -glicosidases são detectadas no alimento, sua atividade é muito menor do que a obtida no tubo digestivo do inseto, mesmo que o material proveniente de uma massa muito maior de alimento seja utilizado em relação a massa de tubo digestivo (resultados para *A. fraterculus*; Ferreira et al, 2001).

Após tentativas de resolver as β -glicosidases solúveis presentes no tubo digestivo de *A. fraterculus* por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante e em alguns tipos de cromatografia, conseguimos verificar dois picos de atividade β -glicosidásica após cromatografia de troca iônica em coluna EconoPac-HighQ (**Fig. 1**). A recuperação da atividade após esse passo foi de 100%. O primeiro pico de atividade recolhido se apresentou bastante instável, principalmente ao congelamento. Não conseguimos determinar se nesse pico de atividade existe apenas uma β -glicosidase, no entanto seu formato sugere a existência de pelo menos duas enzimas.

Fig. 1- Cromatografia de troca iônica em coluna EconoPac-HighQ (BioRad) da fração solúvel do tubo digestivo médio de larvas de *A. fraterculus* ◇ e da fração solúvel do homogeneizado de goiaba ■. Substrato utilizado, MUβDGlu.

Para termos uma indicação de quantas enzimas estariam presentes no material do segundo pico dessa cromatografia determinamos seu K_m para MU β Dglu (**Fig. 3**). O valor obtido foi de $0.12 \pm 0.01 \text{ mM}$ e, uma vez que somente uma reta foi verificada no plote de Lineweaver-Burk, somente uma enzima deve estar presente. Este material presente no segundo pico obtido após cromatografia em coluna EconoPac-HighQ foi submetido a uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna resource ISO, após o qual ele torna-se bastante instável. O fato de obtermos um pico de atividade simétrico (**Fig. 4**) é mais uma evidência de que nesse material só está presente uma β -glicosidase.

No material eluído da cromatografia da fração solúvel de *A. pickeli* em coluna EconoPac-HighQ podemos observar também duas atividades sobre MU β Dglu, com atividades relativas semelhantes às obtidas com o material de *A. fraterculus* e que são eluídas da coluna praticamente nas mesmas concentrações salinas (**Fig. 5**). É muito plausível supor que essas enzimas sejam as responsáveis pela clivagem de substratos mais hidrofóbicos, tais como os sintéticos, cujas hidrólises não diferem muito em *A. fraterculus* e *A. pickeli*. A terceira enzima detectada em *A. pickeli* quando se utiliza linamarina como substrato deve ser a principal responsável pela clivagem dos β -glicosídeos naturais nesse inseto.

Embora não possamos afirmar com certeza, nossos resultados indicam que em *A. fraterculus* existe ao menos duas β -glicosidases e em *A. pickeli* três.

3.4 β -glicosidases digestivas de *Rhynchosciara americana*

As β -glicosidases de *R. americana* são integrantes das membranas microvilares, principalmente das células dos cecos gástricos (Ferreira & Terra, 1982). As β -glicosidases foram solubilizadas por papaína como descrito em material e métodos e cerca de 60% da atividade foi solubilizada após 1 hora de tratamento com papaína. A soma da atividade de β -glicosidase

Figura 3- Plote de Lineweaver-Burk para verificar o efeito da concentração de substrato na enzima presente no pico 2 da Fig. 1

Figura 4 - Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource ISO (Pharmacia) do material obtido no segundo pico de atividade da cromatografia anterior. Substrato utilizado, MU β Dglu.

Figura 5 - Cromatografia de troca iônica em coluna EconoPac-HighQ (BioRad) da fração solúvel do intestino médio de larvas de *A. pickeli*. A- ensaio sobre MU β Dglu. B- Ensaio sobre linamarina.

encontrada no sobrenadante e no sedimento após o tratamento com papaína perfaz 100% da atividade inicial, indicando que o tratamento não inativa as β -glicosidases. Como pretendíamos obter uma quantidade razoável de material, e de preferência puro, iniciamos as tentativas de separação das β -glicosidases utilizando cromatografias.

As primeiras cromatografias realizadas foram de troca iônica utilizando a coluna Resource Q, como descrito anteriormente. Essa cromatografia evidenciou a presença de dois picos de atividade um pouco sobrepostos e um deles (o que apresenta maior atividade sobre MU β Dglu) apresenta um ombro que sugere a presença de uma terceira enzima (**Fig. 6**). O perfil de atividade mostrado na Fig.6 para MU β Dglu é idêntico ao que se obtém utilizando celobiose ou NP β Dglu como substrato. Do mesmo modo, o perfil apresentado para atividade sobre MU β Dgal é idêntico ao obtido com NP β Dgal.

Outras cromatografias foram realizadas alterando-se algumas condições da cromatografia acima no intuito de obtermos resultados mais satisfatórios na separação das enzimas. O tampão CAPS foi substituído por etanolamina em uma delas, e em outras, volume e/ou a inclinação do gradiente de NaCl foram alterados. Usando o tampão etanolamina a recuperação da atividade enzimática era menor, e alterações no gradiente salino não levaram a um aumento na resolução das atividades enzimáticas. Devido ao exposto acima voltamos a utilizar as condições descritas em Materiais e Métodos e coletamos os picos de atividade apresentados na Fig. 6, que foram denominados B1 (frações de 24 a 26) e B2 (frações 29 a 33).

Os materiais B1 e B2 foram separadamente submetidos a cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resouce PHE (Pharmacia). Quando aplicado o material B1 obtivemos a eluição de um único pico de atividade capaz de clivar MU β Dglu (**Fig. 7a**) e MU β Dgal (**Fig.7b**) com a mesma eficiência.

Fig. 6- Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (Parmacia) do material solubilizado por papaína a partir dos cecos de *Rhynchosciara americana*. Atividade sobre MUβDglu ○ . Atividade sobre MUβDgal ●

Figura 7 - Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (Parmacia) das frações 24 a 26 (B1) reunidas após cromatografia em coluna Resource Q (Fig.6).
 A - Atividade sobre MU β Dglu B - Atividade sobre MU β Dgal

Quando aplicado B2 na Resource PHE obtivemos um único pico de atividade contra MU β Dglu (**Fig. 8a**) que deve conter mais de uma atividade enzimática (ver o nítido ombro presente no pico de atividade). Quando o substrato utilizado nessa cromatografia foi o MU β Dgal, além dessas enzimas ativas sobre MU β Dglu, uma outra enzima é detectada (**Fig. 8b**). Na tentativa de melhorar a separação das enzimas o material B2 foi submetido à mesma cromatografia com o gradiente de sal alterado, e também substituiu-se a coluna Resource PHE pela Resource ISO. Entretanto esses procedimentos não resultaram em aumentos na resolução das diferentes enzimas. As enzimas eluídas nas cromatografias de interação hidrofóbicas são instáveis após o congelamento e, além de não obter a completa separação das enzimas, não tínhamos um grande rendimento.

Uma vez que sabíamos que três β -glicosidases de *R. americana* eram resolvidas após separação em gel de poliacrilamida nativo (Ferreira & Terra, 1983), decidimos utilizar esse método, uma vez que as cromatografias não estavam sendo eficientes na separação das enzimas. Após eletroforese em cilindro de poliacrilamida (ver item 2.8) e utilizando MU β Dglu e MU β Dgal no ensaio verificamos que parece haver duas enzimas no pico de maior migração eletroforética (**Fig. 9**) e não somente uma como reportado por Ferreira e Terra (1983). Talvez essa discrepância de resultados se deva ao fato de estarmos usando um substrato fluorescente, que é mais sensível e não um cromogênico, como o usado por Ferreira e Terra (1983). As enzimas separadas por nós foram denominadas β gly 1, 2, 3 e 4, sendo que β gly 1 é a de menor migração eletroforética; β gly 1, 2 e 3 são galactosidases e β gly 4 uma glicosidase. As enzimas isoladas por este procedimento também mostram-se instáveis ao congelamento e ao armazenamento a 4°C. Devido a isso foi adicionado glicerol 20% às amostras, o que permitiu que as enzimas permanecessem estáveis a zero graus por pelo menos duas semanas.

Figura 8- Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (Parmacia) das frações 29 a 33 (B2) reunidas após cromatografia em coluna Resource Q (Fig. 6).
A - Atividade sobre MU β Dglu B - Atividade sobre MU β Dgal

Figura 9- Eletroforese em cilindro de poliacrilamida (9%) do material solubilizado por papaína a partir dos cecos de *R. americana*.

○ Atividade sobre MUβDglu

● Atividade sobre MUβDgal.

A única enzima que já tinha sido parcialmente caracterizada por Ferreira e Terra (1983) foi a β gly 4, que é uma glicosidase. Os resultados obtidos na determinação de K_m para β gly 1, 2 e 4 estão apresentados na **Tabela 2**. Pelos dados obtidos com a β gly 4 esta possui um K_m de 4,5mM, mas podemos deduzir que o glicerol está inibindo esta enzima, uma vez que o K_m é cerca de três vezes maior que o encontrado por Ferreira e Terra (1983), na ausência dessa substância. As enzimas β gly 1 e β gly 2 parecem não ser afetadas por glicerol, uma vez que os valores de K_m apresentados foram obtidos na ausência dessa substância e eles são iguais aos obtidos em sua presença nos experimentos com Triton X-100, como veremos adiante. O alto K_m apresentado pela β gly 1 e β gly 2 (com cerca de 33mM) indica que o substrato natural dessas enzimas deve ter características gerais um tanto diferentes dos sintéticos usados aqui. Segundo a hipótese apresentada em Terra e Ferreira (2004) de que essas enzimas teriam como função clivar glicolipídeos, seu K_m talvez fosse menor que obtido aqui se usássemos alquil- β -glicosídeos.

A **Fig. 10** mostra as curvas do efeito do pH na atividade de β gly 1 e β gly2. Pode-se ver que ambas tem um pH ótimo entre 5,0 e 5,5 e que a atividade decresce de modo relativamente lento no ramo alcalino. Valores de pH ótimo ligeiramente ácidos são comuns em α - e β -glicosidases de todas as ordens de insetos (Terra e Ferreira, 1994).

Conforme comentado na introdução, as enzimas que clivam bem substratos hidrofóbicos normalmente são galactosidases e algumas dessas enzimas são ativadas por substâncias anfipáticas tais como Triton X-100. Como desejamos saber a universalidade dessa propriedade e *R. americana* apresenta várias galactosidases, decidimos verificar seu comportamento frente a esse detergente.

β gly1

Substrato	Km (mM)
NP β Dgal	32 ± 3
MU β Dgal	> 0.5

β gly 2

Substrato	Km (mM)
NP β Dgal	34 ± 3
MU β Dgal	> 0.5

β gly 4

Substrato	Km (mM)
NP β Dglu	$4,5 \pm 0,4$
NP β Dfuc	$1,7 \pm 0,2$

Tabela 2- Km das β -glicosidases de *R. americana* para alguns substratos.

Figura 10 - Efeito do pH na atividade de β gly 1 (A) e β gly 2 (B) de *R. americana*.

As Figuras 11, 12, 13 e 14 mostram plotes de Lineweaver-Burk utilizando diferentes concentrações de Triton X-100, ou replotes desses gráficos. A β gly 1 e a β gly 3 não são ativadas por Triton X-100, uma vez que nem a velocidade máxima nem o Km são afetados por essa substância (**Fig. 11 e 12**), pelo menos nas concentrações utilizadas. A β gly 2 e a β gly 4 são ativadas pelo detergente, sendo que na β gly 2, a menor concentração utilizada ($3\mu\text{M}$) já mostrou o efeito máximo (**Fig. 13**). Essas duas enzimas são ativadas pelo monômero do detergente, uma vez que a concentração micelar crítica (CMC) do Triton X-100 não deve ter sido atingida (ela está em torno de $1,7\text{mM}$, mas varia com as condições do meio). Os dados da **Fig. 14** foram replotados para calcular os parâmetros de ativação por Triton X-100. Foram feitos inicialmente plotes secundários (**Fig. 15a**) aonde o delta de intercepto (ou da inclinação) da curva experimental em relação ao controle é plotado versus a concentração do ativador (Segel, 1993). Por esses gráficos podemos ver que as concentrações usadas são muito baixas, atingindo-se logo um valor constante conforme varia-se a concentração de Triton X-100. Calculamos os parâmetros cinéticos da ativação a partir do plote recíproco dos plotes secundários (**Fig. 15b**) (ver Segel 1993), e obtivemos um valor para α (que é o número de vezes que o Km é afetado pela presença do ativador) de 0,5, e um valor para β (que é o número de vezes que a V_{max} é afetada pela presença do ativador) de 1,9 e o K_a para o Triton X-100 foi de $4\mu\text{M}$. Os dados de α e β não são discrepantes do que seria esperado comparando-se os dados para Km e V_{max} observados nas curvas de Lineweaver-Burk, indicando que esses valores são confiáveis. O valor de K_a é bem pequeno, sendo o menor já determinado usando-se detergente em β -glicosidases de insetos.

Esses resultados confirmam a hipótese de que a maioria das β -galactosidases digestivas de insetos são ativadas por substâncias anfipáticas semelhantes a Triton X-100, mesmo aquelas que são proteínas integrantes de membranas. Além disso, observamos uma glicosidase que é ativada por essa substância.

Figura 11- Replots da inclinação e do intercepto obtidos nos plotes de Lineweaver-Burk versus a concentração de Triton X-100. Enzima utilizada β gly 1 agindo sobre NP β Dgal .

Figura 12- Plotes de Lineweaver-Burk em concentrações crescentes de Triton X-100. Enzima utilizada β gly 3, agindo sobre NP β Dgal

Figura 13- Plotes de Lineweaver-Burk em concentrações crescentes de Triton X-100. Enzima utilizada β gly 2 agindo sobre NP β Dgal.

Figura 14- Plotes de Lineweaver-Burk em concentrações crescentes de Triton X-100. Enzima utilizada β gly 4 agindo sobre NP β Dgli.

Figura 15- Ativação da $\beta\text{gly 4}$ por Triton X-100. A- plotes secundários das inclinações e interceptos dos plotes de Lineweaver-Burk apresentados na Fig.14. B- plotes recíprocos dos plotes secundários apresentados em A. Somente os dados referentes as três menores concentrações de Triton X-100 foram utilizados.

3.5 β -Tioglicosidases em insetos.

De modo análogo às β -glicosidases, as β -tioglicosidases devem ter papel importante na interação inseto planta e sua ocorrência só é bem documentada em afídeos. Para verificarmos se essas enzimas são mais difundidas entre os insetos realizamos ensaios com tioglicosídeos utilizando material do tubo digestivo de insetos provenientes de diferentes ordens. Para termos uma idéia da possibilidade de encontrarmos uma tioglicosidase nesses materiais decidimos comparar a atividade específica encontrada na clivagem de NP β DSglu e NP β DSgal com aquelas obtidas para os O-glicosídeos correspondentes, que sabidamente são clivados por enzimas secretadas pelo animal. Os dados referentes aos tioglicosídeos estão apresentados na **Tabela 3** e os referentes aos O-glicosídeos na **Tabela 4**. Além dos insetos indicados na tabela 3, atividades sobre os três tioglicosídeos indicados nessa tabela também foram medidas no ventrículo de *Periplaneta americana* (Dictioptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *A. fraterculus*, *A. pickeli* e *M. domestica* (Diptera), sendo que nenhuma atividade foi detectada.

Analisando-se os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4, aparentemente os Lepidoptera *D. saccharalis* e *S. frugiperda* poderiam ter uma tioglicosidase, que seria mais ativa que aquela que poderia ocorrer em *R. americana*. Nós adquirimos como substrato para tioglicosidase Sinigrina, que tem a vantagem de ser natural e ser facilmente encontrado comercialmente. A atividade específica determinada para o epetélcio do ventrículo de *D. saccharalis* usando esse substrato foi de $2,7 \times 10^{-4}$ mU/mg. Ensaíamos também a atividade no material solubilizado da membrana dos cecos de *R. americana* por papaína e encontramos $4,8 \times 10^{-5}$ mU/mg. Em *B. brassicae*, o extrato bruto dos afídeos apresentou uma atividade específica de cerca de 0.2 U/mg, que é bem maior que o encontrado aqui (Pontoppidan *et al.* 2001).

Tabela 3- Atividades específicas (mU/mg) sobre tioglicosídeos sintéticos para diferentes ordens de insetos. * Os valores indicados para *R. americana* correspondem à fração solúvel e particulada das células dos cecos gástricos.

Espécie	NPSβDglu	NPSβDgal	NPSβDfuc
<i>Diatraea saccharalis</i> (MP)	0	0	0
<i>Diatraea saccharalis</i> (EV)	6.4	0.85	1.27
<i>Spodoptera frugiperda</i> (MP)	0.03	0.008	0.27
<i>Spodoptera frugiperda</i> (EV)	1.4	0.53	10.5
<i>Rhynchosciara americana</i> * (fração solúvel)	0.05	0.77	0.15
<i>Rhynchosciara americana</i> * (fração de membrana)	0	0	0

Tabela 4- Atividade específica (mU/mg) de β-glicosidases presentes no intestino médio de alguns insetos.

Substratos		
Insetos	NPβDglu	NPβDgal
* <i>Abracris flavolineata</i>	350	250
* <i>Tenebrio molitor</i>	170	50
* <i>Rhynchosciara americana</i>	24	63
* <i>Spodoptera frugiperda</i>	13	9
* <i>Diatraea saccharalis</i>	9	3.8
<i>Anastrepha fraterculus</i>	0.05	1.4
<i>Anastrepha pickeli</i>	0.87	1.3

*Dados de Ferreira *et al.* (1998)

Mesmo com essas baixas atividades decidimos determinar atividade sobre sinigrina após resolução das β -glicosidases por cromatografia. Foi feita uma cromatografia hidrofóbica como descrito em Azevedo *et al* (2003), porque ela permite separar todas as β -glicosidases de *D. saccharalis*. Na **Fig. 16** estão apresentados os resultados obtidos para *D. saccharalis*. Podemos ver que a atividade sobre sinigrina é coincidente com somente um dos picos de atividade sobre MU β Dglu e MU β Dgal. Nós sabemos que esses dois últimos substratos são clivados pela mesma enzima (ver Azevedo *et al*, 2003). Se compararmos o formato do segundo pico de atividade enzimática sobre os substratos sintéticos e sobre a sinigrina podemos notar que todos eles tem exatamente o mesmo formato, indicando que a mesma enzima que cliva O-glicosídeos pode clivar S-glicosídeos. Devemos ressaltar que essa atividade enzimática não pode ser derivada do alimento, uma vez que a *D. saccharalis* aqui utilizada foi criada em dieta artificial que é preparada em altas temperaturas utilizando-se panela de pressão. Para verificar se a mesma enzima está clivando O- e S-glicosídeos, realizamos uma inativação térmica usando o material presente no segundo pico da cromatografia apresentada na **Fig. 16**.

Os resultados apresentados na **Fig. 17** mostram que tanto clivando NP β Dgal quanto clivando sinigrina, obtemos a mesma cinética de inativação. Desse modo, temos uma só enzima responsável pela clivagem dos dois substratos. É interessante ressaltar que a mesma quantidade de enzima e o mesmo tempo de incubação foram utilizados para obter os dados apresentados na **Fig. 16**. Levando-se em consideração a sensibilidade dos métodos utilizados para detecção de glicose (derivada da sinigrina) e de p-nitrofenolato (derivado do NP β Dgal) vemos que a atividade enzimática sobre tio-glicosídeos é somente duas vezes menor que sobre NP β Dgal.

Figura 16- Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (Pharmacia) do material proveniente de cromatografia de troca iônica resource Q de *Diatraea saccharalis*.

○ MUβDglu ● MUβDgal ▲ Sinigrina

Figura 17- Inativação térmica à 52°C da β glicosidase presente no segundo pico de atividade apresentado na Fig. 16. Substrato: O NP β Dgal ■ Sinigrina

Tanto quanto sabemos, essa é a primeira vez que atividades equivalentes sobre O- e S-glicosídeos são mostradas em uma enzima. Embora outros experimentos devam ser realizados para comprovar a veracidade desse fato, tudo indica que estamos frente a uma enzima com propriedades especiais, diferente das β -tioglicosidases presentes em plantas e microorganismos. Nós utilizamos o material de membrana dos cecos de *R. americana* solubilizado por papaína e separado por eletroforese, para verificar atividade sobre sinigrina e encontramos dois picos de atividade que são distintos daqueles que se obtém quando usamos O-glicosídeos (**Fig. 18**). A possibilidade das enzimas que clivam tioglicosídeos serem derivadas da dieta é remota, uma vez que trata-se de uma preparação de membranas que não entram em contato direto com o alimento devido a presença da membrana peritrófica e derivadas de um epitélio que foi extensivamente lavado em salina antes de ser homogeneizado e centrifugado.

Levando-se em consideração que a) a β -tioglicosidase de afídeo que foi seqüenciada tem maior identidade com as β -glicosidases digestivas de insetos do que com as β -tioglicosidases de plantas e outros organismos e b) nós encontramos no tubo digestivo dos insetos enzimas que clivam com atividade semelhante O- e S-glicosídeos e outras que somente clivam S-glicosídeos, podemos supor que, nos insetos, as β -glicosidases (que só clivam O-glicosídeos) devem ter dado origem às enzimas capazes de clivar tanto O- quanto S- glicosídeos (semelhantes àquela encontrada em *D. saccharalis*). Posteriormente essas enzimas originaram as β -tioglicosidases de insetos (semelhantes às enzimas que nós encontramos em *R. americana*).

O trabalho inicial em β -tioglicosidases apresentado aqui, tem o mérito de ter mostrado que essas enzimas tem uma distribuição maior nos insetos do que se pensava antes e que há β -tioglicosidases com atividade tão alta quanto a de β -glicosidases. Desse modo, os glicosinolatos podem ser clivados no tubo digestivo tanto quanto os β -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas, e a atividade dessas enzimas precisa ser levada em consideração quando se estuda a interação inseto-planta em insetos que ingerem plantas contendo glicosinolatos.

Figura 18 - Eletroforese em cilindro de poliacrilamida (9%) do material solubilizado por papaína a partir dos cecos de *R. americana*.
 ○ NPβDglu ● NPβDgal ▲ Sinigrina

4- Considerações finais

Muitos estudos ainda devem ser realizados para que seja possível entender os mecanismos pelos quais os insetos se adaptam à presença de glicosídeos tóxicos nas plantas. Entretanto, os dados apresentados aqui ilustram a variabilidade dessas adaptações dos insetos, viabilizando a utilização de nutrientes normalmente inacessíveis a outros animais.

5 Referências bibliográficas

- Azevedo, T.R., Terra W.T. & Ferreira C. (2003) Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33, 81-92.
- 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, 499-504.
- Barnes, R.D. & Rupert, E.E. (1996) *Zoologia dos invertebrados*. 6º Ed., Roca, São Paulo. Pp1029.
- 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.
- Dahlqvist, A. (1968) Assay of intestinal dissaccharidases. *Analyt. Biochem.* 22, 99-107.
- Davies, G., Wilson, K.S. & Henrisat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, 557-559.
- Desroches, P., Mandon, N., Beahr, J.C. & Huignard, J.(1997). Mediation of host-plant use by a glucoside in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera; bruchidae). *J. Insect Physiol.* 43,439-446.
- Espinoza-Fluentes, F. P., Ribeiro, A. F., Terra W. R. (1987) Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fraction of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.* 17, 819-827.
- Ferreira C. & Terra W.R. (1982) Function of midgut caeca and ventriculus: microvilli bound enzymes from cells of different midgut regions of starving and feeding *Rhynchosciara americana* larvae . *Insect Biochem.* vol 12, No.3, pp. 257-262.

- 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* larva). *Biochem. J.* 213, 43-51.
- Ferreira, C., Capella, A. N., Sitnik, R. & Terra, W. (1994) 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., Parra, J.R.P. & Terra, W.R. (1997). The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem Physiol.* 119B, 219-225.
- Ferreira, C., Torres, B.B. & Terra, W.R. (1998) Substrate specificities of midgut β -glycosidases from insects of different orders. *Comp. Biochem. Physiol.* 199 B, 219 -225.
- Ferreira, A.H.P., Marana, S., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2001) Purification, molecular cloning, and properties of a of β -glycosidases isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 1065-1076.
- Ferreira A.H.P., Ribeiro, A. F., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2002). Secretion of β -glycosidases by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae . *J. Insect Physiol.* 48, 113-118.
- Ferreira A.H.P., Terra W. R & Ferreira C. (2003) Characterization of a β -glycosidase highly active on disaccharides and of a β -galactosidase from *Tenebrio molitor* midgut lumen. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33, 253-256.
- Gopalan,V., Daniels L.B.,Glew, R.H. & Claeysens, M. (1989). Kinetic analysis of the interaction of alkyl glycosides with two human β -glucosidases. *Biochem J.* 262, 541-548.

- Grossmann, G.A. & Terra, W.R. (2001) α -Galactosidases from the larval midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 109-122.
- Harwood, J.L. (1980) Plant acyl lipids. Structure, distribution and analysis. In: (Stumpf P.K., Ed.) *The Biochemistry of plants: A Comprehensive treatise. Lipids: Structure and Function*. Vol.4. Academic Press, New York, pp. 1-56.
- Henrissat, B. & Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637-644.
- Hedrick, J.L. & 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.
- Jones A.M.E; Bridges M.; Bones A.M. & Cole R.; Rossiter J.T. (2001) Purification and characterization of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 1-5.
- Jones A.M.E; Bridges M.; Bones A.M., Cole R. & Rossiter J.T. (2002) Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 275-284.
- Krystal, G., MacDonald, C., Munt,B. & Ashwell, S. (1985) A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Analytical Biochemistry* 148, 451-460.
- Lara, F.J.S., Tamaki, H. & Pavan, C. (1965). Laboratory culture of *R. angeale*. *Am. Nat.* 99, 189-191.
- Lindroth, R.L. (1988) Hydrolysis of phenolic glycosides by midgut beta-glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 18, 789-792.

- Mainguet, A.M., Louveaux, A., Sayed G. El. & Rollin P. (2000) Ability of a generalist insect, *Schitocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: Tolerance or adaptation? *Entomol. Exp. Applicata* 94, 309-317.
- 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. (2000) Purification and properties of a β -glycosidase from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 30, 1139-1146.
- Marana, S.R., Jacobs-Lorena, M., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2001) Amino acids involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1545, 41-52.
- Marana, S.R., Terra W. r. & Ferreira C. (2002) The role fo amino acid residues Q39 and E₄₅₁ in the determination of substrate specificity of the *Spodoptera frugiperda* β -glycosidase. *Eur J. Biochemistry* 269, 3705-3714.
- McDanell, R., McLean, A.E.M., Hanley, A.B., Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. (1988) Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review. *Food Chem. Toxicol.* 26, 59-70.
- McMahon J.M., White W.L.B. & Sayre R.Y. (1995) Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Exp. Bot* 46, 731-741.

- Morgante, J.S., Selivon D., Solferini V.N. & Nascimento A.S. (1996). Genetic and morphological differentiation in the species *Anastrepha pickeli* and *A. montei*. In Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. 596 pp. Ed. By Mcpherson B. A. and Steck G.J., St Lucie Press, Delray Beach.
- Parra, J.R.P. & Mishfeldt, L. J. (1992). Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer, In: Anderson, T.E., Leppla, N.C., (Eds.), Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management, Westview Press, Boulder, CO.
- Parra, J.R.P. (1986) Criação de insetos para estudos com patógenos. In Alvez SB (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Editora Monole. 348-373.
- Pontoppidan B., Ekbom B., Eriksson S. & Meijer J (2001). Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) a brassica herbivore. Eur. J. Biochemistry. 268, 1041-1048.
- Segel, H.I. (1993) *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzymes systems*. John Wiley & Sons, INC, New York.
- Selivon, D., Perondini, A. L.P. & Morgante, J. S. (1999) Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Genet. Mol. Biol.*, Dec., vol.22, no.4, 507-510.
- Silva, M.C.P., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2004). The role of carboxyl, Arg and His groups in catalysis by a midgut trehalase purified from a insect larvae. Submetido a publicação.
- Sierks, M. R., Bock, K., Refn, S. & Svensson, B.(1992). Active site similarities of glucose dehydrogenase, glucose oxidase, and glucosamylase probed by deoxygenated substrates. *Biochemistry* 31, 8972-8977.

- Spencer K.C. (1998) Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interactions. In *Chemical mediation of evolution*. Ed by Spencer K.O. Academic press, San Diego.
- Terra, W.R., De Bianchi, A. G., Gambarini, A. G. & Lara, F. J. S. (1973) Haemolymph amino acids and related compounds during cocon production by the larvae of the fly, *Rhynchosciara americana*. *J. Insect Physiol.* 19, 2097-2106.
- Terra, W.R., Ferreira, C. & De Bianchi, A.G. (1979) Distribution of digestive enzyme among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-494.
- Terra, W. R., Lemos, F. J. A., Jordão B. P. (1990) Enzyme depletion in insect feeding experiments: fact or artifact? *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 59-61.
- Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra, W. R. & Ferreira, C. (2004). Biochemistry of Digestion. In (Gilbert L.I; Iatrov, K., Gill S. (eds) *Comprehensive Insect Science Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*, Vol 4, Biochemistry, and Molecular Biology Elsevier, Oxford.
- Van Etten, C. H. and Tookey, H. L. (1983). In: *CRC Handbook of Naturally Occuring Food Toxicants*, M. Rechcigl Jr Ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 15-30.
- Vetter J. (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38, 11-36.
- Withers S. G. (2001) Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carb Polymers* 44, 325-337.
- Whiters S.G. & Rupitz (1990) Measurement of active site homology between potato and rabbit muscle α -glucan phosphorylases through use of a free energy relationship. *Biochemistry* 29, 6405-6409.