

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE β -1,3-GLUCANASES DE INSETOS

FERNANDO ARIEL GENTA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. CLÉLIA FERREIRA

SÃO PAULO

DEZ DE MARÇO DE 2004

“Purificação e caracterização de β -1,3-glucanases de insetos ”

FERNANDO ARIEL GENTA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:



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



Profa. Dra. MARIA JULIA MANSO ALVES
IQ - USP



Prof. Dr. BENSO SOARES DE ARAUJO
IQ - USP



Prof. Dr. JOÃO ATÍLIO JORGE
CLRP - USP



Profa. Dra. IVAR LUIS DOS SANTOS TERSARIOL
UMC

SÃO PAULO
14 DE ABRIL DE 2004

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

Genta, Fernando Ariel
G337p Purificação e caracterização de β -1,3-glucanases de
insetos / Fernando Ariel Genta. - São Paulo, 2004.
232p

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

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

574.1925 CDD

À querida irmã Ana Maria.

“If I spake,” saith he, “with the tongues of men and angels, and had not charity, it were but as a tinkling cymbal”; not but that it is an excellent thing to speak with the tongues of men and angels, but because, if it be severed from charity, and not referred to the good of men and mankind, it hath rather a sounding and unworthy glory, than a meriting and substantial virtue. And as for that censure of Salomon, concerning the excess of writing and reading books, and the anxiety of spirit which redoundeth from knowledge; and that admonition of Saint Paul, “That we be not seduced by vain philosophy”; let those places be rightly understood, and they do indeed excellently set forth the true bounds and limitations, whereby human knowledge is confined and circumscribed; and yet without any such contracting or coarctation, but that it may comprehend all the universal nature of things; for these limitations are three: the first, that we do not so place our felicity in knowledge, as we forget our mortality; the second, that we make application of our knowledge, to give ourselves repose and contentment, and not distaste or repining: the third, that we do not presume by the contemplation of nature to attain to the mysteries of God.

Francis Bacon, in *Advancement of Learning (First Book)*, 1605.

Quem não vive para servir, não serve para viver.

Apara-barro de caminhão, em Parati (RJ).

AGRADECIMENTOS

“Difficile non aliquem, ingratum quenquam praeterite”

Cicero, *Post Reditum, in Senatu*, XII, 30.

Aos chefes Clélia Ferreira e Walter Terra, pela oportunidade a mim concedida, pela sabedoria dos conselhos a mim dados, pela grande competência apresentada aos longos desses anos de trabalho, pelo grande privilégio de trabalhar em um grupo de pesquisa tão rico e proveitoso, e pela preciosa amizade. Trabalhar no Laboratório de Bioquímica de Insetos ao longo desses anos foi uma experiência extremamente prazerosa, e para mim inesquecível.

A Alcides Batista Dias Júnior, cuja preciosa amizade aos longos desses anos tem sido sempre um porto seguro, aonde pude descansar das minhas dúvidas e inquietações.

Aos colegas de laboratório Sandro, Plínio, Adriana, Ciça, Luiza, Nilde, Alexandre, Tamara, Érika, Fábio, Lucas, João, Paloma e Renata, pela maravilhosa e inspiradora convivência.

Aos alunos Lucas Blanes, Alexandra Frealdo Dumont e Átila Iamarino. Dificilmente terei novamente o prazer e a alegria de acompanhar o desenvolvimento de mentes tão brilhantes e perspicazes.

A Afonso Puig, Carla Laforgia, Cássio Passos Mourão, Élvio Ferreira Jr., Ricardo Furia Silva e Simone Mourão. Quando precisei, foram amigos como vocês o que me reconciliou com a vida.

A minha mãe, Erminia Filogenia Lugli Salzano; meu pai, Werther José Genta Bassi; meus irmãos, Ana, Diego e Rosário, pelo apoio incondicional dado a mim, sempre. Amo vocês.

E, por último, a Marisa Moura Momoli. Seria injusto e pobre colocar em palavras o que lhe devo. Farei minhas as palavras do poeta. Sem você, meu amor, eu não sou ninguém.

RESUMO

P. americana e *T. molitor* são capazes de secretar β -1,3-glucanases no tubo digestivo, pelas glândulas salivares e pelo epitélio do ventrículo, respectivamente. As laminarinases majoritárias de *P. americana* (LIQ1, 42kDa; LAM_P, 45kDa), *A. flavolineata* (LAM_A, 45kDa) e *T. molitor* (LAM_T, 50kDa) foram purificadas até a homogeneidade. Essas enzimas têm diferentes especificidades, padrões de ação e resíduos envolvidos em catálise, fazendo parte dos E.C. 3.2.1.6 - endo- β -1,3(4)-glucanase (LIQ1), E.C. 3.2.1.39 - endo- β -1,3-glucanase (LAM_P) ou E.C. 3.2.1.58 - exo- β -1,3-glucanase (LAM_A e LAM_T). O papel dessas enzimas é digerir β -glucanas de fungos e de cereais. LAM_P e LAM_A são inibidas por laminarina, pela formação de complexos enzima-substrato não-produtivos. LIQ1, LAM_P e LAM_A são enzimas processivas, com diferentes graus de ataque múltiplo e produzem série distintas de oligossacarídeos. LAM_A possui um sítio acessório de ligação para laminarina, o qual pode estar envolvido no mecanismo de processividade. Quitinases digestivas de insetos podem ser diferentes das descritas até o momento. *A. flavolineata* e *T. molitor* possuem sistemas celulásicos completos. Os três insetos apresentam proteínas de baixo peso molecular capazes de ligar-se a celulose ou a pachyman. O ancestral dos hexapoda provavelmente possuía β -1,3 e β -1,3(4) glucanases digestivas associadas a um hábito detritívoro.

SUMMARY

P. americana salivary glands and *T. molitor* midgut epithelium actively secrete laminarinases into the midgut. The major laminarinases from *P. americana* (LIQ1, 42kDa and LAM_P, 45kDa), *A. flavolineata* (LAM_A, 45kDa) and *T. molitor* (LAM_T, 50kDa) were purified until homogeneity. These enzymes have different specificities, action patterns and active-site catalytic groups, and correspond to E.C.s **3.2.1.6** - endo- β -1,3(4)-glucanase (LIQ1), **3.2.1.39** - endo- β -1,3-glucanase (LAM_P) or **3.2.1.58** - exo- β -1,3-glucanase (LAM_A and LAM_T). Their physiological role is fungal and cereal β -glucan digestion. LAM_P and LAM_A are inhibited by excess substrate (non-productive enzyme-substrate complexes). LIQ1, LAM_P and LAM_A have different multiple attack degrees and produce different oligosaccharides. LAM_A has a second substrate binding site, probably involved with processivity. *T. molitor* digestive chitinase is different from other insect chitinases. *A. flavolineata* and *T. molitor* can hydrolyse crystalline cellulose efficiently. The three studied insects have cellulose or pachyman-binding proteins with low molecular weights. Hexapoda ancestors probably had digestive β -1,3 and β -1,3(4)-glucanases and a detritivore habit.

ABREVIÇÕES

BSA - albumina sérica bovina
CAPS - ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico
CBD - domínio de ligação a carboidrato
cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar
CHMC - 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida
CMC - carboximetilcelulose
DNA - ácido desoxiribonucleico
DNS - ácido dinitrosalicílico
DPC - dietilpirocarbonato
E - enzima livre
E.C. - classe enzimática
EDC - 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA - ácido etileno diamino tetra acético
EGTA - ácido N,N,N',N'-etileno-glicol-bis-(éter-β-amino-etílico)-tetra acético
ES - complexo enzima-substrato
ES₂ - complexo inibitório entre enzima e duas moléculas de substrato
FG - Fenilglioxal
FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography
K_{cat} - constante de catálise
K_D - constante de dissociação do complexo enzima-substrato quando este último protege a enzima de um modificador químico
K_{e1} e **K_{e2}** - constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise na enzima livre
K_{es1} e **K_{es2}** - constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise no complexo enzima substrato
K_M - constante de Michaelis
K_{Mapp} - constante de Michaelis aparente
K_M^{*} - constante de Michaelis independente do pH
K_{obs} - constante de inativação de pseudo-primeira ordem em uma reação de modificação química
K_p - constante de velocidade de formação de produto
K_s - constante de dissociação do complexo enzima-substrato
LAM_A - β-1,3-glucanase de *Abracris flavolineata*
LAM_P - β-1,3-glucanase de *Periplaneta americana*
LAM_T - β-1,3-glucanase de *Tenebrio molitor*
LIQ1 - β-1,3(4)-glucanase de *Periplaneta americana*
MES - ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico
Mr - massa molecular relativa
Mw - massa molecular
NBS - N-Bromosuccinimida
PCR - reação da polimerase em cadeia
pHMB - para-hidroximercuribenzoato
pI - ponto isoelétrico
PTC - feniltiocarbamida
PVDF - difluoreto de polivinilideno

p/v - peso por volume
R_f - razão de migração
s - substrato
SBTI - inibidor da tripsina de soja
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio
TAPS - ácido tris-(hidroximetil)metilaminopropano sulfônico
TGO - reagente de tris - glicose oxidase
TNM - tetranitrometano
Tris - trishidroximetilaminometano
TTC - cloreto de trifeniltetrazólio
U - unidade de velocidade enzimática
UFC - unidade formadora de colônia
v - velocidade de reação
V_{max} - velocidade máxima
V_{maxapp} - velocidade máxima aparente
V_{max}* - velocidade máxima independente do pH
v/v - volume por volume
v/v/v - volume por volume por volume
YPDA - meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar
 $\alpha, \beta, \chi, \delta, \epsilon, \phi$ - fatores de multiplicação de constantes cinéticas

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Considerações iniciais.....	13
1.2. O sistema digestório de insetos.....	15
1.3. Enzimas de digestão inicial em insetos. Digestão de paredes celulares e β -1,3-glucanases.....	18
1.4. Classificação de β -1,3-Glucanases.....	21
1.5. Natureza e ocorrência de β -1,3-Glucanases em Insetos.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Material Biológico. Criações de insetos.....	28
2.2. Dissecção e preparação de frações solúveis.....	29
2.3. Ensaio enzimáticos.....	33
2.4. Determinação de proteína.....	34
2.5. Purificação das β -1,3-glucanases de <i>Periplaneta americana</i> (LIQ1 e LAM_P).....	34
2.5.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Metil Sepharose....	34
2.5.2. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC).....	35
2.6. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de <i>Abracris flavolineata</i> (LAM_A).....	36
2.6.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Econo Pac High Q (BioRad, EUA).....	36
2.6.2. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, Suécia).....	36
2.6.3. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Resource Q (Pharmacia, Suécia).....	36
2.6.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superose 12 (Pharmacia, Suécia).....	37
2.7. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de <i>Tenebrio molitor</i> (LAM_T)..	38
2.7.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna EconoPac HighQ.....	38
2.7.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Resource Q.....	38
2.7.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource PHE (Pharmacia, Suécia).....	39
2.7.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superdex 75 (Pharmacia, Suécia).....	39
2.8. Purificação da quitinase de <i>Tenebrio molitor</i>	40
2.8.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna EconoPac Methyl.....	40
2.8.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia).....	40
2.8.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Fenil Superose (Pharmacia, Suécia).....	41
2.8.4. Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75.....	41

2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Eletroforese em condições não desnaturantes e ensaio de atividades enzimáticas no gel.....	42
2.10. Determinação de parâmetros cinéticos.....	43
2.11. Oxidação e Redução de grupos diol em laminarina e quitina coloidal.....	46
2.12. Determinação da solubilidade em etanol dos produtos de ação de glucanases. Estimativas de grau de ataque múltiplo.....	47
2.13. Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de ação enzimática.....	48
2.13.1. β -1,3-glucanases.....	48
2.13.2. Quitinase.....	48
2.14. Modificação química.....	49
2.15. Ensaio de lise de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
2.16. Esterilização de ovos de <i>Tenebrio molitor</i> . Produção de larvas em ambiente estéril, dissecação, preparação das amostras e controle da esterilidade.....	53
2.16.1. Coleta de ovos.....	53
2.16.2. Esterilização.....	53
2.16.3. Eclosão e cultura.....	53
2.16.4. Dissecação.....	54
2.16.5. Preparação de homogeneizados.....	54
2.16.6. Plaqueamento.....	55
2.17. Alimentação de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> com antibióticos.....	55
2.18. Obtenção de seqüência de amino-ácidos N-terminal.....	56
2.19. Clonagem e sequenciamento da quitinase de <i>T. molitor</i>	56
2.20. Purificação de proteínas ligantes de papel.....	57
2.21. Purificação de proteínas ligantes de pachyman.....	58
2.22. Ensaio de hidrólise de celulose cristalina (Avicel).....	59
2.23. Determinação da configuração anomérica da glicose produzida por LAM_A.....	59
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Distribuição das atividades β -glucanásicas no tubo digestivo de <i>Periplaneta americana</i>	61
3.2. Purificação das β -1,3-glucanases digestivas de <i>P. americana</i>	65
3.3. Caracterização da liquenase digestiva de <i>P. americana</i> (LIQ1).....	71
3.4. Caracterização da laminarinase digestiva de <i>P. americana</i> (LAM_P).....	83
3.5. Purificação da laminarinase de <i>Abracris flavolineata</i>	92
3.6. Caracterização da laminarinase digestiva de <i>Abracris flavolineata</i>	96
3.7. Atividades β -glucanásicas no tubo digestivo de <i>Tenebrio molitor</i>	113
3.8. Purificação da laminarinase digestiva majoritária de <i>Tenebrio molitor</i>	126
3.9. Caracterização da laminarinase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i>	131
3.10. Purificação da quitinase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i>	148
3.11. Caracterização da quitinase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i>	152
3.12. Sistemas celulásicos de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Abracris flavolineata</i> e <i>Tenebrio molitor</i> . Purificação de proteínas ligantes de papel.....	158
3.13. Purificação de proteínas ligantes de pachyman.....	162
3.14. Atividades de polissacaridases no tubo digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	162

4. DISCUSSÃO	166
4.1. Secreção de β -1,3-glucanases pelas glândulas salivares de <i>Periplaneta americana</i>	166
4.2. Secreção de enzimas no ventrículo de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	168
4.3. Mecanismo de ação de LIQ1. Características do sítio ativo dessa enzima.....	171
4.4. Mecanismo de ação de LAM_P. Características do sítio ativo dessa enzima.....	177
4.5. Mecanismo de ação de LAM_A. Características do sítio ativo dessa enzima.....	182
4.6. Mecanismo de ação de LAM_T. Características do sítio ativo dessa enzima.....	198
4.7. A quitinase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i>	203
4.8. Sistemas celulásicos em insetos e proteínas ligantes de papel.....	207
4.9. β -1,3-glucanases em <i>Spodoptera frugiperda</i>	210
4.10. Proteínas ligantes de pachyman.....	212
4.11. Papel fisiológico das β -1,3-glucanases de insetos.....	214
4.12. Evolução de β -1,3-glucanases em insetos.....	216
5. CONCLUSÕES	220
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	221
7. CURRICULUM VITAE	232

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1.....	17
Figura 2.....	64
Figura 3.....	66
Figura 4.....	69
Figura 5.....	73
Figura 6.....	74
Figura 7.....	77
Figura 8.....	80
Figura 9.....	82
Figura 10.....	84
Figura 11.....	85
Figura 12.....	87
Figura 13.....	88
Figura 14.....	90
Figura 15.....	91
Figura 16.....	93
Figura 17.....	95
Figura 18.....	98
Figura 19.....	99
Figura 20.....	100
Figura 21.....	104
Figura 22.....	105
Figura 23.....	106
Figura 24.....	107
Figura 25.....	108
Figura 26.....	109
Figura 27.....	110
Figura 28.....	119
Figura 29.....	122
Figura 30.....	125
Figura 31.....	128
Figura 32.....	129
Figura 33.....	132
Figura 34.....	135
Figura 35.....	136
Figura 36.....	137
Figura 37.....	138
Figura 38.....	139
Figura 39.....	140
Figura 40.....	141
Figura 41.....	144
Figura 42.....	145
Figura 43.....	147
Figura 44.....	151
Figura 45.....	153
Figura 46.....	155

Figura 47.....	156 e 157
Figura 48.....	160
Figura 49.....	161
Figura 50.....	163
Figura 51.....	165
Figura 52.....	174
Figura 53.....	179
Figura 54.....	181
Figura 55.....	187
Figura 56.....	188
Figura 57.....	189
Figura 58.....	191
Figura 59.....	194 e 195
Figura 60.....	197
Figura 61.....	201
Figura 62.....	202
Tabela 1.....	20
Tabela 2.....	22
Tabela 3.....	24 e 25
Tabela 4.....	51
Tabela 5.....	61
Tabela 6.....	63
Tabela 7.....	71
Tabela 8.....	72
Tabela 9.....	75
Tabela 10.....	78
Tabela 11.....	86
Tabela 12.....	89
Tabela 13.....	96
Tabela 14.....	101
Tabela 15.....	111
Tabela 16.....	113
Tabela 17.....	115
Tabela 18.....	116
Tabela 19.....	117
Tabela 20.....	121
Tabela 21.....	123
Tabela 22.....	124
Tabela 23.....	130
Tabela 24.....	134
Tabela 25.....	142
Tabela 26.....	146
Tabela 27.....	158
Tabela 28.....	164

1.INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

O grupo dos insetos (Classe Hexapoda do filo Artropoda) é reconhecidamente o táxon mais bem sucedido ao longo da história evolutiva dos organismos biológicos terrestres em nosso planeta. O sucesso evolutivo dos insetos pode ser medido pela biomassa ou número de indivíduos presentes nos ecossistemas terrestres, mas sua grande capacidade adaptativa torna-se evidente ao deparamos com a diversidade biológica do grupo. Mais de 70% das espécies vivas conhecidas são insetos. Apenas a ordem Coleoptera (besouros) corresponde a mais de 50% das espécies biológicas descritas até agora. Já foram descritas cerca de 1 milhão de espécies de insetos, dentre as quais cerca de 400.000 são besouros (Ruppert & Barnes, 1994; Brusca & Brusca, 1990)

Organismos dessa classe ocupam praticamente todos os tipos de nichos ecológicos terrestres, assumindo papéis essenciais para a manutenção do equilíbrio de diferentes ecossistemas. Podem atuar como herbívoros, carnívoros ou detritívoros - sua participação é decisiva, por exemplo, na ciclagem de nutrientes em ecossistemas tropicais e na polinização de 80% das espécies de plantas conhecidas (Richards & Davis, 1977).

Apesar dessa grande importância biológica, o interesse no estudo desses organismos apresenta estreita relação com sua importância social e econômica. Alguns membros dessa classe são altamente benéficos para o

homem - especialmente como polinizadores de plantas cultivadas. Alguns são criados para a extração de produtos específicos, como o mel e a cera (abelhas, classe Hymenoptera) ou a seda (bicho-da-seda, o lepidóptero *Bombyx mori*). Contudo, há inúmeros casos em que insetos atuam desfavoravelmente em relação à espécie humana - principalmente como transmissores de doenças humanas (por exemplo, mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles*) ou predadores de plantas cultivadas ou estocadas pelo homem (por exemplo, broca da cana - *Diatraea saccharalis*, lagarta do cartucho do milho - *Spodoptera frugiperda*, broca do feijão - *Zabrotes subfasciatus*). Também há o caso de insetos parasitas e transmissores de doenças de plantas ou animais criados pelo homem (por exemplo, cigarras e moscas hematófagas, respectivamente).

O grande interesse no estudo de insetos pauta-se na necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle menos agressivas ao meio ambiente do que a pulverização de inseticidas. O uso de inseticidas tem levado, além do acúmulo de compostos tóxicos no solo e em lençóis freáticos, ao desenvolvimento de linhagens de insetos cada vez mais resistentes, tornando necessária uma mudança de estratégia no combate a esses organismos. Alternativas como o controle biológico, utilizando parasitas ou predadores, vêm sendo intensamente pesquisadas e, em alguns casos, utilizadas comercialmente com sucesso.

1.2. O sistema digestório de insetos.

O sistema digestório de insetos apresenta uma grande importância estratégica ao considerarmos o desenvolvimento de novas formas de controle. Ele é uma das grandes superfícies de contato desses organismos com o meio ambiente, e a mais suscetível a agentes externos de controle seletivo. Os exemplos mais importantes dessa estratégia de controle são a pulverização da bactéria *Bacillus thuringiensis* sobre a colheita, já usada no campo na proteção de diversos cultivares, e o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes à herbivoria. Essas podem apresentar em seu genoma inserções que levam à produção, nos tecidos ingeridos pelo inseto, de inibidores de enzimas digestivas ou de outras proteínas tóxicas ao inseto (Hilder *et al.*, 1987; McGaughey & Whalon, 1992; Schuler *et al.*, 1998; Shade *et al.*, 1994; Alstad & Andow 1995; Bauer 1995; Jouanin *et al.*, 1998).

Contudo, para que o desenvolvimento dessas formas de controle seja eficiente, é necessário conhecer em detalhe a estrutura e o funcionamento do sistema digestório do inseto-alvo. Isso é de particular importância se considerarmos que a fisiologia digestória do grupo é altamente diversificada, em escala muito maior do que nos outros grupos animais conhecidos. Por exemplo, é comum observar diferenças na anatomia do trato digestório e nas principais enzimas usadas pelo animal na digestão, entre insetos da mesma ordem ou até da mesma família. Isso é especialmente contrastante com o grupo dos vertebrados, o mais bem estudado até o momento em termos de fisiologia digestória, aonde é possível traçar semelhanças e paralelos entre todas as classes, ordens e famílias do grupo (Terra & Ferreira, 1994).

Há uma intensa discussão na literatura atual sobre os fatores preponderantes na evolução do tubo digestório em Hexapoda. Embora muitos autores destaquem a dieta como o fator principal no estabelecimento de padrões adaptativos, a importância da herança de características presentes nos ancestrais é inegável na maioria dos casos (Terra & Ferreira, 1994). De qualquer maneira, pode-se descrever o tubo digestório de insetos de acordo com o modelo geral exposto na figura 1 (Chapman, 1985).

O tubo digestório dos insetos pode ser dividido em três partes - Intestino Anterior, Intestino Médio (Ventrículo) e Intestino Posterior. O Intestino Médio é responsável pela maior parte da absorção de nutrientes, e é a única região capaz de secretar enzimas digestivas para o lúmen.

Os epitélios dos Intestinos Anterior e Posterior são recobertos por cutícula (exoesqueleto), e o do Intestino Médio é recoberto por uma película quitino-proteica denominada Membrana Peritrófica. Essa película divide o ventrículo em dois compartimentos: espaço ecto e endo-peritrófico. Tal divisão possui uma papel fundamental no estabelecimento de fluxos de líquido dentro do ventrículo, os quais diminuem drasticamente a excreção de enzimas digestivas. Além disso, essa compartimentalização do espaço pode ser acompanhada por uma compartimentalização bioquímica da digestão. No espaço endo-peritrófico é possível observar enzimas de digestão inicial (com menor massa molecular e capazes de atravessar os poros da membrana peritrófica) enquanto enzimas de digestão final são restritas ao espaço ecto-peritrófico (com maior massa molecular e maiores do que os poros da membrana peritrófica).

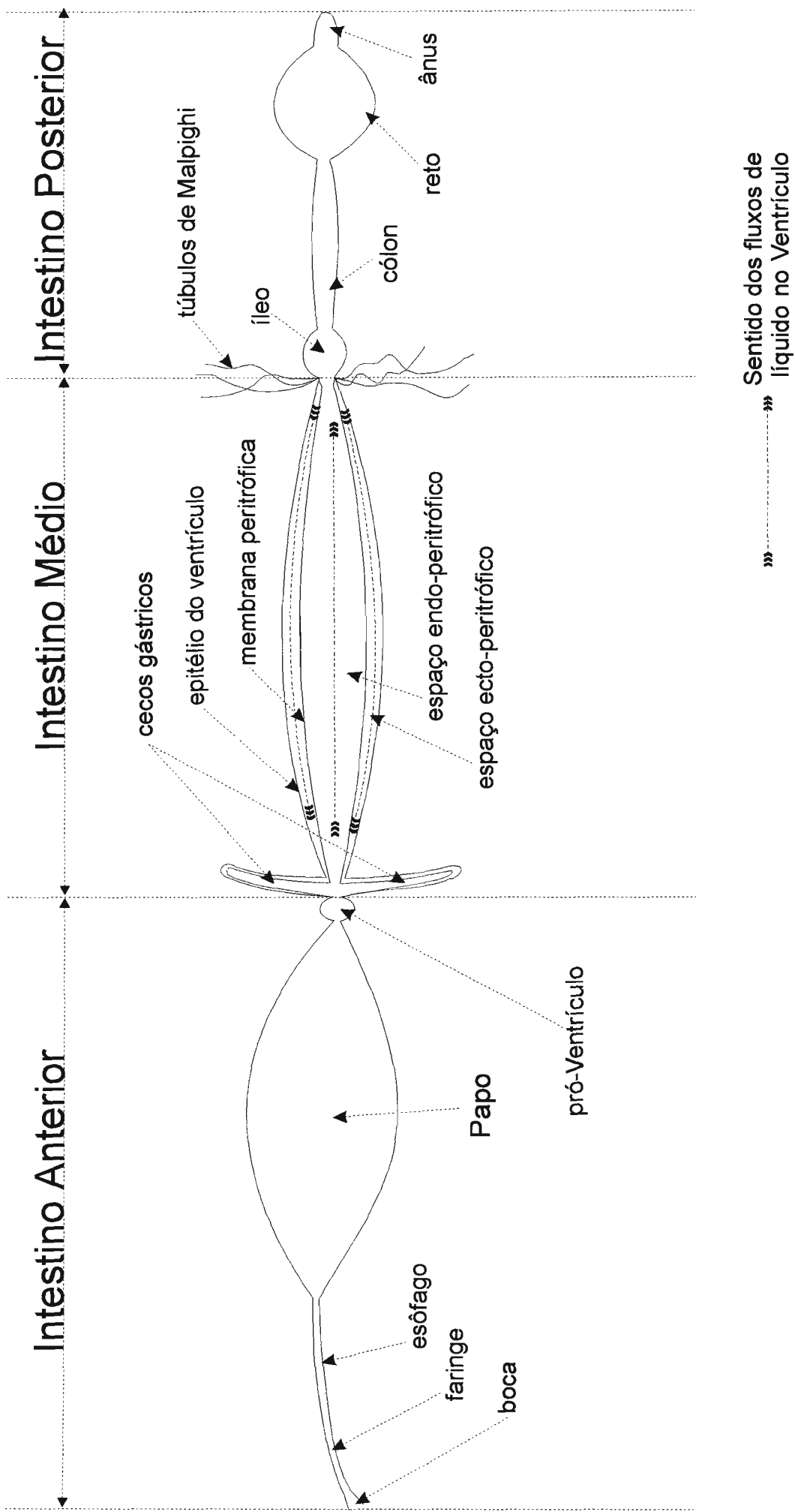


Figura 1. Diagrama geral do tubo digestivo de insetos. (de acordo com Chapman, 1985; Terra & Ferreira 1994)

1.3. Enzimas de digestão inicial em insetos. Digestão de paredes celulares e β -1,3-glucanases.

Enzimas de digestão inicial são aquelas responsáveis pelo reconhecimento e degradação das grandes moléculas de polímeros encontradas no alimento. Elas produzem oligômeros que são digeridos pelas enzimas de digestão intermediária, cuja ação libera dímeros (disacarídeos e dipeptídeos). Esses últimos são então clivados pelas enzimas de digestão final, gerando-se então o produto final da digestão, passível de absorção pelo epitélio (Terra & Ferreira, 2004).

Ao planejarmos interferências no processo digestório de insetos, por meio de inibidores de enzimas digestivas, a inibição das enzimas de digestão inicial é de certa forma estratégica, pois seu não-funcionamento resulta na ausência de substratos para todas as demais enzimas digestivas e, em última instância, na ausência de açúcares ou aminoácidos absorvíveis. Além disso, como na maioria dos insetos as enzimas de digestão inicial (despolimerases) são as primeiras a entrar em contato com o alimento no espaço endoperitrófico, sua inibição também é facilitada, pois não existem barreiras anatômicas ou fisiológicas entre as enzimas-alvo e os inibidores ingeridos.

Além dos fatores acima, muitas despolimerases são responsáveis pela degradação das paredes envoltórias das células vegetais ou fúngicas presentes no alimento. Dessa maneira, elas permitem o acesso de um grande número de enzimas aos nutrientes do conteúdo celular. Embora em certo grau a mastigação propicie o extravasamento celular, a degradação enzimática é

essencial para o aproveitamento dos componentes intracelulares, essenciais na alimentação do inseto (Terra & Ferreira, 1994).

Assim sendo, o estudo e desenvolvimento de formas de inibição desse tipo de enzima tem grande importância para o sucesso do controle desses organismos por meio da interferência em sua digestão. Para tal, é necessário conhecer em detalhe as enzimas alvo - e é nesse contexto que o estudo enzimológico da digestão de polissacarídeos e proteínas em insetos vem sendo proposto. Contudo, para muitas classes de enzimas digestivas o conhecimento obtido até agora é escasso e fragmentado, quando não inexistente. Esse é o caso das β -1,3-glucanases de insetos.

β -1,3-glucanases são enzimas capazes de realizar a hidrólise eficiente de β -1,3-glucanas, polímeros de glicose na configuração anomérica β onde a ligação entre unidades glicosídicas se dá entre os carbonos 1 e 3. Esses polissacarídeos são abundantes na natureza, ocorrendo em algas, plantas superiores e fungos (Aspinall, 1982). A ocorrência das principais β -glucanas está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura, ocorrência e função das principais β -glucanas encontradas na natureza.

β -glucana	tipo de ligação principal	ocorrência	função	Observações
celulose	β -1,4	vegetais em geral, bactérias	principal constituinte da parede celular	linear e insolúvel
laminarina	β -1,3	algas pardas	reserva	quando linear, insolúvel; podem ocorrer ramificações β -1,6 tornando a molécula solúvel; gelificante
calose	β -1,3	vegetais superiores	formação de poros do floema	linear e insolúvel
laricinana	β -1,3	coníferas	reserva; constituinte da parede celular	ramificações β -1,6; solúvel
pachyman	β -1,3	fungos	constituinte da parede celular	linear e insolúvel
β -1,3-1,6-glucanas	β -1,3	fungos	principal constituinte da parede celular	ramificações β -1,6; solúvel; gelificante
liquenana	β -1,4 e β -1,3	líquens	constituinte da parede celular reserva	linear e solúvel; alta capacidade gelificante
β -glucanas cereais	β -1,4 e β -1,3	cereais	constituinte da parede celular reserva	linear e solúvel; alta capacidade gelificante

Como o papel das β -1,3-glucanas é decisivo na constituição da parede celular de fungos, é de se esperar que β -1,3-glucanases sejam enzimas importantes para o processo digestório em insetos detritívoros. No caso de insetos herbívoros, β -1,3-glucanases parecem ter um papel importante apenas na digestão específica de gramíneas, pois em vegetais superiores β -1,3-glucanas ocorrem apenas como constituinte minoritário na parede de células do floema. Em gramíneas, β -1,3-1,4-glucanas (polisacarídeos mistos com ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4) são importantes polisacarídeos de reserva presentes na parede das células do endosperma secundário das sementes (Aspinall, 1982).

1.4. Classificação de β -1,3-Glucanases

β -1,3-glucanases podem ser agrupadas de acordo com o tipo de atividade enzimática apresentada. Uma classificação bastante simples pode ser feita de acordo com os substratos reconhecidos por cada enzima. Essas enzimas também podem ser classificadas de acordo com a porção do polisacarídeo que é clivada preferencialmente - nesse caso, observam-se enzimas que hidrolizam preferencialmente porções internas do substrato (endo- β -1,3-glucanases) e outras que atuam a partir das pontas da cadeia (exo- β -1,3-glucanases). O tipo de produto liberado a partir de um determinado substrato - glicose ou oligossacarídeos - também pode ser usado nesse tipo de classificação. Outra característica interessante que serve para diferenciar grupos dessas enzimas é a configuração anomérica dos produtos liberados. Há

enzimas que mantêm a configuração anomérica β presente originalmente no substrato, enquanto outras são capazes de invertê-la, liberando produtos na configuração anomérica α . Com base nos critérios acima, até o presente momento foram propostas as classes enzimáticas com atividade sobre β -1,3-glucanas relacionadas na tabela 2 (IUBMB-NC, 2004; Schomburg & Salzmann, 1991).

Tabela 2 - Classes enzimáticas com atividade sobre β -1,3-glucanas propostas até o momento.

Classe Enzimática	Nome	Descrição
3.2.1.6	endo-1,3(4)- β -glucanase	Hidrólise interna de ligações (1-3) ou (1-4) em β -glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é ligado à unidade glicosídica anterior pelo carbono 3.
3.2.1.39	glucan-endo-1,3- β -D-glucosidase	Hidrólise de ligações glicosídicas do tipo (1-3) em β -(1-3)-glucanas.
3.2.1.58	glucan-1,3- β -glucosidase	Hidrólise sucessiva de unidades de β -D-glicose da ponta não redutora de β -(1-3)-glucanas, liberando o anômero α da glicose.
3.2.1.73	licheninase	Hidrólise de ligações glicosídicas β -(1-4) em β -glucanas contendo ligações (1-3) e (1-4).

Entretanto, novos critérios para a classificação dessas enzimas vem sendo propostos recentemente. O mais bem sucedido leva em base o agrupamento de aminoácidos hidrofóbicos na estrutura primária de cada uma dessas enzimas. De acordo com a similaridade observada entre as seqüências de aminoácidos de diferentes enzimas, essas podem ser agrupadas em famílias. Essa classificação é muito mais abrangente, sendo aplicada para todos os tipos de enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas (glicosil-hidrolases; Henrissat, 1991; Coutinho & Henrissat, 2004).

A classificação de glicosil-hidrolases em famílias de acordo com a seqüência primária foi aceita e é bastante utilizada por que se reflete nas características tridimensionais e mecanísticas de cada membro da família. Enzimas da mesma família, até o presente momento, apresentam a mesma estrutura tridimensional, liberam o mesmo tipo de produto, com retenção ou inversão da configuração anomérica, e têm o mesmo mecanismo de catálise, com resíduos de aminoácidos envolvidos em reação idênticos. As características detalhadas das famílias de glicosil-hidrolases com atividade sobre β -1,3-glucanas descritas até agora encontram-se na tabela 3 (Coutinho & Henrissat, 2004).

Tabela 3 - Características de famílias de glicosil-hidrolases com atividade sobre β -1,3-glucanas descritas até o momento (Coutinho & Henrissat, 2004).

Família	Classes Enzimáticas	Mecanismo	Nucleófilo	Doador de Prótons	Estrutura tridimensional (CATH)	Seqüências
3	3.2.1.*					
	3.2.1.21					
	3.2.1.37				3.20.20.300 - (α/β) ₈ TIM Barrel	384
	3.2.1.52	Retenção	Aspartato	Glutamato	(HYDROLASE) +	
	3.2.1.55				3.40.50.1700 - 3-Layer (aba) Sandwich	
	3.2.1.58					
	3.2.1.74					
5	3.2.1.**					
	3.2.1.***					
	3.2.1.4					
	3.2.1.8					
	3.2.1.25					
	3.2.1.58	Retenção	Glutamato	Glutamato	3.20.20.80 - (α/β) ₈ TIM Barrel	439
	3.2.1.73				(GLYCOSIDASE)	
	3.2.1.75					
	3.2.1.78					
	3.2.1.91					
3.2.1.123						
8	3.2.1.2					
	3.2.1.4					
	3.2.1.13	Inversão	Aspartato	Glutamato	1.50.10.10 - Alpha/alpha Barrel	54
	3.2.1.8				(GLYCOSYLTRANSFERASE)	
	3.2.1.73					

Tabela 3 (continuação)

Família	Classes Enzimáticas	Mecanismo	Nucleófilo	Doador de Prótons	Estrutura tridimensional (CATH)	Seqüências
12	3.2.1.****					
	3.2.1.4	Retenção	Glutamato	Glutamato	2.60.120.180 - Jellyroll β -Sandwich (GLYCOSIDASE)	6
	3.2.1.73					
16	2.4.1.207					
	3.2.1.16					
	3.2.1.39					
	3.2.1.73	Retenção	Glutamato	Glutamato	2.60.120.200 - Jellyroll β -Sandwich (HYDROLASE)	316
	3.2.1.81					
	3.2.1.83					
17	3.2.1.103					
	2.4.1.*					
	3.2.1.39	Retenção	Glutamato	Glutamato	3.20.20.80 - (α/β) ₈ TIM Barrel (GLYCOSIDASE)	301
	3.2.1.58					
	3.2.1.73					
	3.2.1.39	?	?	?	?	27
	3.2.1.58					
	3.2.1.39	Inversão	?	?	?	12
	3.2.1.39	?	?	?	?	18

Classes Enzimáticas destacadas sobre fundo escuro possuem atividade sobre β -1,3-glucanas. As Classes Enzimáticas terminadas com * são atividades ainda não catalogadas, descritas como:

2.4.1.* - transglycosidase 3.2.1.* - exo- β -1,3-1,4-glucanase

3.2.1.*** - endo- β -1,3-mannanase 3.2.1.**** - xyloglucan hydrolase 3.2.1.** - endo- β -1,6-galactanase

CATH - Classificação de dobramentos, domínios e estruturas terciárias de proteínas.

1.5. Natureza e ocorrência de β -1,3-Glucanases em Insetos

β -1,3-glucanases digestivas são amplamente distribuídas em todas as ordens de insetos estudadas até o momento. Esse tipo de enzima digestiva já foi encontrado nas ordens Collembola, Trichoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Isoptera, Coleoptera e Diptera (Nielsen, 1966; Potts & Hewitt, 1974; Chipoulet & Chararas, 1984; Vonk & Western, 1984; Terra & Ferreira, 1994; Scrivener *et al.*, 1998)

O único caso em insetos no qual se estudou a atividade digestiva sobre β -1,3-glucanas em mais detalhe é o do besouro *Rhagium inquisitor* (Chipoulet & Chararas, 1984). A laminarinase intestinal majoritária desse inseto possui uma massa molecular de cerca de 100 kDa, um pH ótimo em torno de 6, e os principais produtos de ação da enzima são glicose, laminaribiose e laminaritriose. A enzima é altamente específica para β -1,3-glucanas, não hidrolizando β -1,3-1,4-glucanas. A enzima possui uma pequena atividade sobre laminaribiose e laminaritriose, mas não hidrolisa qualquer outro glicosídeo. Contudo, essa enzima não foi purificada até a homogeneidade, e também não foi caracterizada cineticamente. Não foram reunidas evidências conclusivas de que essa enzima seja secretada pelo epitélio ventricular, podendo ser um produto da flora intestinal do inseto.

Até o presente momento, nenhuma β -1,3-glucanase de insetos foi purificada e estudada em detalhe. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram a existência de grande atividade laminarinásica no tubo digestivo dos insetos *Rhynchosciara americana* (Diptera, mosca),

Periplaneta americana (Dictyoptera, barata), *Abracris flavolineata* (Orthoptera, gafanhoto), *Tenebrio molitor* (Coleoptera, besouro), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, mariposa). Em *P. americana* foi possível observar a existência de duas β -1,3-glucanases, mas não foi possível desenvolver uma marcha de purificação com resultados satisfatórios (Genta, 2000). Em *A. flavolineata*, já se havia observado a existência de uma β -1,3-glucanase majoritária, cujos produtos principais a partir de laminarina são glicose e laminaribiose, em uma proporção aproximada de 2:1.

O objetivo deste trabalho é purificar e caracterizar em detalhe as β -1,3-glucanases digestivas dos insetos *P. americana*, *A. flavolineata* e *T. molitor*. Procuramos não só ampliar o conhecimento referente a esse tipo de enzima digestiva em insetos, mas também reunir evidências de sua secreção pelo epitélio ventricular. Tentamos entender melhor o papel fisiológico dessas enzimas e como se deu a evolução dessa classe enzimática nesse grupo de organismos. Procurou-se realizar uma breve caracterização da atividade de β -1,3-glucanase em *S. frugiperda*. Em *T. molitor*, o entendimento da função de sua β -1,3-glucanase, e sua estreita relação fisiológica com a quitinase digestiva desse inseto, levou-nos a purificar e caracterizar também essa enzima.

Com os estudos realizados pretendemos, além de ampliar o conhecimento sobre a fisiologia digestiva de insetos, criar subsídios para a criação de novas formas de controle das populações desses organismos.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico. Criações de insetos.

A cultura de *Periplaneta americana* (Dictyoptera) foi mantida em um recipiente plástico (40x50x70cm) sob condições naturais de fotoregime e temperatura. Os animais foram acondicionados em tubos de cartão e suportes de papelão e alimentados com sementes de aveia (*Avena sativa*; Quaker ou Ferla, Brasil), ração para cães moída (Bonzo Mix Carnes, Purina, Brasil) e algodão úmido. Fêmeas e machos adultos foram recolhidos para dissecação, sempre às dez horas da manhã.

Ninfas e adultos de *Abracris flavolineata* (Orthoptera) foram criados em gaiolas de 30x30x40cm com estrutura de madeira e paredes de tela de arame, com orifícios quadrados de 1mm de largura. As gaiolas foram mantidas em uma sala com fotoregime (12:12), temperatura (26°C) e umidade (70%) controladas. Os animais foram alimentados com folhas frescas de malvavisco (*Malvaviscus* sp.) e papel úmido. Fêmeas e machos adultos, ao sofrerem leve pressão abdominal, regurgitam um líquido esverdeado rico em enzimas digestivas. O regurgitado coletado dessa maneira foi imediatamente congelado a -20°C.

Adultos e larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) foram criados em farelo de trigo dentro de caixas de madeira de 30x30x40cm, em uma sala com temperatura 26°C, umidade 70% e luminosidade constante. As larvas de último ínstar foram recolhidas para dissecação.

Larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) foram criadas de acordo com o método de Parra (1986). As larvas foram acondicionadas individualmente em tubos de vidro com uma dieta à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), gérmen de trigo, levedo e ágar e mantidas sob fotoregime natural 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.

2.2. Dissecção e preparação de frações solúveis.

As dissecções de *P. americana* foram realizadas em solução de cloreto de sódio 220mM a 4°C. Após a separação do tubo digestivo completo, descartaram-se os túbulos de Malpighi e os corpos gordurosos. As glândulas salivares foram separadas, e o tubo digestivo foi dividido em duas partes: Intestino Anterior (Papo e pró-ventrículo) mais Intestino Médio (Ventrículo) e Intestino Posterior. Cada um dos materiais foi homogeneizado em homogeneizador de Potter-Ehveljem acoplado a um homogeneizador mecânico (Tecnal, modelo TE-039) em água bidestilada gelada (dez movimentos de subida e descida do pistilo), sendo o produto final filtrado através de malha de nylon (poro de 100µM de largura) e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e utilizado para ensaios enzimáticos e purificação de β-1,3-glucanases. O precipitado foi descartado. O volume das preparações foi acertado para uma concentração de 4 animais por mililitro.

Para a determinação da distribuição de algumas atividades enzimáticas ao longo do tubo digestivo, os animais dissecados (4 lotes com 3 animais cada) tiveram seus tubos digestivos fracionados em glândulas salivares, papo, pró-ventrículo, cecos, ventrículo anterior (epitélio e conteúdo), ventrículo posterior (epitélio e conteúdo), íleo, cólon e reto. Homogeneizaram-se todas as frações em água bidestilada gelada em um aparelho de Potter-Ehveljem (dez movimentos de subida e descida do pistilo), sendo o produto final filtrado através de malha de nylon (poro de 100 μ M de largura). Centrifugaram-se os materiais provenientes do epitélio do ventrículo (anterior e posterior) a 4 °C por 30 minutos a 15.000g, e os materiais restantes a 4 °C por 10 minutos a 10.000g. Recolheram-se os sobrenadantes e ressuspenderam-se os precipitados de todas as frações em água bidestilada gelada, sendo esses os materiais usados para ensaios enzimáticos.

O regurgitado de *Abracris flavolineata* foi diluído 10 vezes com água bidestilada gelada e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 g, sendo o sobrenadante usado para ensaios enzimáticos (fração solúvel). Para a purificação da β -1,3-glucanase do inseto, o regurgitado foi diluído com tampão Imidazol 20mM pH 7,0 CaCl₂ 10mM.

Larvas de *Tenebrio molitor* foram dissecadas em solução de cloreto de sódio 342mM a 4 °C. Após a separação do tubo digestivo completo, foram retiradas glândulas salivares, túbulos de Malpighi e o intestino posterior. O material restante (intestino anterior mais ventrículo) foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Ehveljem acoplado a um homogeneizador mecânico (Tecnal, modelo TE-039) em água bidestilada

gelada. Após dez movimentos de subida e descida do pistilo, o material foi recolhido e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante (fração solúvel) foi usado para ensaios enzimáticos. O precipitado foi descartado. O volume das preparações foi acertado para uma concentração de 48 animais por mL. Para purificação de β -1,3-glucanases realizou-se a homogeneização em tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; PTC 10mM; pH 7. Para a purificação de quitinases, o material foi homogeneizado em tampão citrato 100mM pH 6 contendo PTC 10mM.

Para estudo da distribuição de enzimas ao longo do tubo digestivo, este foi dividido em intestino anterior, intestino médio (ventrículo) anterior e posterior (cortando o ventrículo em duas partes aproximadamente iguais) e intestino posterior. Retirou-se do interior do intestino médio a membrana peritrófica e seu conteúdo. Os epitélios foram lavados com solução salina. Todos esses materiais foram homogeneizados em uma solução de KCL 0,11M pH 7,0 gelada, utilizando um homogeneizador para microtubos (Sigma, USA, modelo Z35, 997-1) durante um minuto. Os homogeneizados do intestino anterior, da membrana peritrófica e do intestino posterior foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000g. As duas partes do epitélio do intestino médio, após mais duas lavagens com a salina de dissecação, foram homogeneizadas nos moldes acima e centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 25.000g. Os sobrenadantes foram recolhidos e os precipitados ressuspensos na salina de homogeneização. Esses materiais foram usados para determinação de atividades enzimáticas.

As larvas de *S. frugiperda* foram dissecadas em solução de cloreto de sódio 125mM a 4°C. Após a remoção do tubo digestivo, foram retiradas traquéias, túbulos de Malpighi, corpos gordurosos e o intestino posterior. Separou-se o epitélio do ventrículo da membrana peritrófica com o conteúdo. A membrana peritrófica foi homogeneizada em água bidestilada gelada em um homogeneizador de Potter-Ehveljem (10 movimentos de subida e descida do pistilo). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e utilizado para ensaios enzimáticos. As preparações tiveram seu volume acertado para 2 animais por mL.

Porções de farelo de trigo, aveia ou ração para cães foram homogeneizadas em água bidestilada, utilizando um homogeneizador mecânico (Sorvall, modelo Omni-Mixer) através de três pulsos de 6.000rpm com um minuto de duração, intercalados por 30 segundos de repouso. Após o ciclo inicial de homogeneização, o material foi submetido a sonicação por 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de mesma duração (Eurosonics, modelo SX-20), sendo então exposto a novo ciclo de homogeneização em Omni-Mixer. Após centrifugação (4°C, 10.000g, 10 minutos) coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado em lã de vidro. O precipitado foi ressuspenso em água bidestilada.

2.3. Ensaios enzimáticos.

Afora mencionado, quantificou-se a hidrólise dos substratos laminarina, liquenana, carboximetilcelulose (CMC), xilana, dextrana, β -glucana de *Hordeum vulgare*, β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*, pachyman (β -1,3-glucana de *Poria cocos*) e pectina na concentração de 0,25% (p/v). A hidrólise de amido solúvel foi ensaiada na concentração 0,5% (p/v), adicionando-se NaCl 10mM ao meio de reação. Nos ensaios sobre quitina usou-se quitina coloidal a 0,5% (p/v). Para todos os substratos acima acompanhou-se a formação de grupos redutores com o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS; Noelting & Bernfeld, 1948). A quitina coloidal foi preparada de acordo com Hsu & Lockwood, 1975. A β -glucana de *S. cerevisiae* foi preparada segundo Manners *et al.*, 1973.

Nos ensaios sobre celobiose (7mM), laminaribiose e gentiobiose (5mM), acompanhou-se a formação de glicose com o reagente Tris-Glicose Oxidase (TGO; Dalqvist, 1968). Nos ensaios sobre p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (5mM) acompanhou-se a formação de p-nitrofenolato (Terra *et al.*, 1979). A atividade de lisozima foi detectada através do descréscimo na turbidez (absorbância a 600nm) de uma suspensão de células de *Micrococcus lysodeikticus* a 1mg/mL.

Ensaios referentes a *P. americana*, *A. flavolineata* e *T. molitor*, afora mencionado, foram realizados em tampão fosfato 50mM pH 6. Ensaios

referentes a *S.frugiperda* foram realizados, afora mencionado, em tampão TAPS 50mM pH 9.

Nos ensaios sobre sacarídeos, uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de ligações glicosídicas por minuto (NC-IUB, 1983). Nos ensaios de lisozima, uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de diminuir a absorvância do meio de reação em 0,01 unidade por minuto (Lemos *et al.*, 1993).

2.4. Determinação de proteína.

Determinou-se a concentração de proteína nas amostras com os reagentes Coomassie Blue G (Bradford, 1976), cobre / ácido bicinchonínico (Smith *et al.*, 1985) ou prata em meio alcalino (Krystal *et al.*, 1985). Em todos os casos, utilizou-se ovoalbumina para confecção da curva padrão.

2.5. Purificação das β -1,3-glucanases de *Periplaneta americana* (LIQ1 e LAM_P).

2.5.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Metil Sepharose. A fração solúvel proveniente do tubo digestivo de 10 adultos de *P. americana* (2,5mL) foi saturada com cloreto de sódio (5M), sendo então aplicada em uma coluna Metil Sepharose (BioRad, EUA; 5mL) equilibrada em tampão MES 50mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 5M, pH 6 acoplada a um sistema

cromatográfico de baixa pressão (EconoSystem, BioRad, EUA). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 20mL do mesmo tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (5 a 0M de NaCl) de 60mL e lavagem com 40mL na concentração salina final. Utilizou-se um fluxo de 2mL/min e coletaram-se frações de 2mL. Reuniram-se as frações com maior atividade sobre laminarina (36 a 62 na figura 3A).

2.5.2. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC). Materiais recolhidos nas cromatografias do item 2.5.1. foram concentrados através de centrifugação em membranas Centriplus (capacidade 15mL, corte de 12.500 daltons, AMICOM, EUA) para um volume de 2mL, sendo então ressaturados com NaCl e aplicados em uma coluna Resource ETH (Pharmacia, Suécia) previamente equilibrada em tampão MES 50mM; CaCl₂ 10mM; NaCl 5M; pH 6 acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC, Pharmacia, Suécia). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5mL do mesmo tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (5 a 0M) de 20 mL e lavagem com 5 mL na concentração salina final. Utilizou-se um fluxo de 0,5mL/ min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações 28 a 30 (figura 3B, material LIQ1) e 54 a 57 (figura 3B, material LAM_P) foram reunidas para caracterização das enzimas purificadas.

2.6. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de *Abracris flavolineata* (LAM_A).

2.6.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Econo Pac High Q (BioRad, EUA). 60 μ L do regurgitado de *A. flavolineata* foram diluídos 40 vezes com tampão Imidazol 20mM pH 7 CaCl₂ 10mM, sendo então aplicados em uma coluna EconoPac HighQ (5 mL) equilibrada nesse tampão e acoplada a um sistema cromatográfico de baixa pressão (EconoSystem, BioRad, EUA). Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10 mL do mesmo tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas com um gradiente salino (40 mL) de 0 a 1M de NaCl, e com 10 mL de tampão com 1M de NaCl. Usou-se um fluxo de 2 mL/min e coletaram-se frações de 2 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (15 a 17 na figura 17A) foram reunidas.

2.6.2. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, Suécia). 1,5mL do material reunido após a cromatografia do item 2.6.1 foram aplicados com uma seringa em uma coluna HiTrap Desalting equilibrada em tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; pH 7. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10mL do mesmo tampão. Foram coletados os primeiros 2 mililitros, estando a coluna pronta para nova corrida após o término da lavagem.

2.6.3. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Resource Q (Pharmacia, Suécia). 2mL do material coletado na cromatografia do item 2.6.2 foram aplicados em uma coluna Resource Q (1mL) acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC, Pharmacia, Suécia) e equilibrada em

tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; pH 7. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20mL) de 0 a 1M de NaCl, sendo então passados pela coluna 5mL de tampão contendo NaCl 1M. Usou-se um fluxo de 1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (25 a 28 na figura 17B) foram reunidas.

2.6.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superose 12 (Pharmacia, Suécia). 500µL do material reunido após a cromatografia 2.6.3 foram aplicados em uma coluna Superose 12 HR10/30 acoplada a um sistema de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão citrato-fosfato 100mM pH 6 CaCl₂ 10mM. A coluna foi eluída com 30mL desse tampão. Usou-se um fluxo de 0,5mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (44 a 45 na figura 17C) foram reunidas para caracterização (material LAM_A).

Em todas as cromatografias de filtração em gel (ver itens 2.7.4 e 2.8.4) a eluição da atividade de interesse foi comparada com a eluição das seguintes proteínas de massa molecular conhecida (padrões): ribonuclease A (13.700 Da), SBTI (20100 Da), ovoalbumina (43000 Da), BSA (67000 Da) e tiroglobulina (669000 Da). Para cálculos de massa molecular relativa usou-se a relação linear entre o logaritmo da massa molecular e o parâmetro $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ (Amersham Biosciences, 2004), onde

V_e - volume de eluição da proteína de interesse;

V_0 - volume de eluição da tiroglobulina (volume de exclusão da coluna);

V_t - volume total da coluna.

2.7. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de *Tenebrio molitor* (LAM_T).

2.7.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna EconoPac HighQ.

2,5mL da fração solúvel de ventrículos de larvas de *T. molitor* homogeneizados em tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; PTC 10mM; pH 7 foram aplicados em uma coluna Econo Pac HighQ (5mL) acoplada a um sistema cromatográfico de baixa pressão (Econo System) e equilibrada com tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; pH 7. Após a aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 20mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (100mL) de 0 a 1M de NaCl e uma lavagem com 20mL de tampão contendo NaCl 1M. Usou-se um fluxo de 2mL/min e coletaram-se frações de 2mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (30 a 40 na figura 31A) foram reunidas.

2.7.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Resource Q. O

material recolhido após a cromatografia do item 2.7.1 foi diluído 10 vezes com tampão Imidazol 20mM; CaCl₂ 10mM; pH 7. 150mL do material diluído foram aplicados com o auxílio de um Superloop de 150mL (Pharmacia, Suécia) em uma coluna Resource Q (1mL) acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão e equilibrada nesse tampão. Após a aplicação (fluxo de 4mL/min), a coluna foi lavada com 5mL do tampão inicial (fluxo de 1mL/min). Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (60mL) de 0 a 1 M de NaCl e de 5mL de tampão contendo NaCl 1M. Usou-se um fluxo de

1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (37 a 43 na figura 31B) foram reunidas.

2.7.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource PHE (Pharmacia, Suécia). O material recolhido após a cromatografia do item 2.7.2 foi combinado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de maneira a obter uma concentração do sal de 1M e aplicado (2mL) em uma coluna Resource PHE (1mL) acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão MES 50mM; CaCl_2 10mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M; pH 6. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (60mL) de 1 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e uma lavagem com 5 mL de tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Usou-se um fluxo de 1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (137 a 142 na figura 31C) foram reunidas.

2.7.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superdex 75 (Pharmacia, Suécia). Alíquotas de 500 μ L do material recolhido após a cromatografia 2.7.3 foram aplicadas em uma coluna Superdex 75 HR10/30 acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão citrato-fosfato 100mM; CaCl_2 10mM; pH 6. Proteínas foram eluídas da coluna com 30mL desse tampão. Usou-se um fluxo de 1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre laminarina (22 a 25 na figura 31D) foram reunidas para estudo (material LAM_T).

2.8. Purificação da quitinase de *Tenebrio molitor*.

2.8.1. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna EconoPac Methyl. A fração solúvel de ventrículos de larvas de *T. molitor* homogeneizados em tampão citrato 100mM; PTC 10mM pH 6 foi combinada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de forma a obter uma concentração final do sal de 1,4M, sendo então incubada a 4°C com agitação por 30 minutos. A amostra foi então centrifugada a 4°C por 10 minutos a 10.000g. Coletou-se o sobrenadante; 2,5mL desse material foram aplicados em uma coluna Metil Sepharose (5mL) acoplada a um sistema cromatográfico EconoSystem e equilibrada com tampão citrato 50mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4M; pH 6. Após a aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 20mL desse tampão, seguidos de um gradiente salino (100mL) de 1,4M a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nesse tampão e 30mL de tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Usou-se um fluxo de 2mL/ min e coletaram-se frações com 2mL cada. As frações com maior atividade sobre quitina coloidal (30 a 45 na figura 44A) foram reunidas.

2.8.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia). O material recolhido após a cromatografia do item 2.8.1 foi dialisado contra tampão Imidazol 10mM pH 7. Após a diálise esse material foi aplicado com a ajuda de um Superloop de 150mL em uma coluna MonoQ HR5/5 acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão Imidazol 20mM pH 7. Após a aplicação da amostra, proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20mL) de 0 a 1M de NaCl e lavagem com 5 mL de tampão contendo NaCl 1M. Usou-se um fluxo de 1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre quitina coloidal (25 a 27 na figura 44B) foram reunidas.

2.8.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Fenil Superose (Pharmacia, Suécia). O material reunido após a cromatografia do item 2.8.2 foi combinado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de maneira a obter uma concentração do sal de 1,4M. 2mL dessa amostra foram aplicados em uma coluna Fenil Superose HR5/5 acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão citrato 50mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4M; pH 6. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20mL) de 1,4 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e uma lavagem com 5 mL de tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Usou-se um fluxo de 0,5mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL cada. As frações com maior atividade sobre quitina coloidal (63 a 66 na figura 44C) foram reunidas.

2.8.4. Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75. 500 μ L do material reunido após a cromatografia do item 2.8.3 foram aplicados em uma coluna Superdex 75 HR10/30 acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC) e equilibrada com tampão citrato 50mM pH 6. Após a aplicação da amostra, passaram-se pela coluna 30mL desse tampão. Usou-se um fluxo de 1mL/min e coletaram-se frações de 0,4mL. As frações com maior atividade sobre quitina coloidal (27 a 29 na figura 44E) foram reunidas para caracterização.

2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Eletroforese em condições não desnaturantes e ensaio de atividades enzimáticas no gel.

Amostras a serem aplicadas em SDS-PAGE foram dialisadas contra água milliQ (Millipore), liofilizadas e suspensas em tampão Tris-HCl 60mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); 2-mercaptoetanol 0,36mM; EDTA 0,5mM; glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v). Após serem aquecidas por 4 minutos a 95°C as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v; Laemli, 1970). As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de 0,2mA/cm² e coradas com prata (Blum *et al.*, 1987). Valores de massa molecular relativa (Mr) foram calculados a partir da comparação com proteínas de massa molecular conhecida: Fosforilase B (97,4kDa), Albumina Sérica Bovina (66,2kDa), Ovalbumina (45kDa), Anidrase Carbônica (31kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (SBTI, 21,5kDa), Lisozima (14,4kDa). Para cálculos de massa molecular relativa usou-se a relação linear entre o logaritmo da massa molecular e a migração relativa à linha de frente (R_f) no gel (Stryer, 1996).

Amostras a serem aplicadas em eletroforese nativa foram dialisadas contra água MilliQ, liofilizadas, suspensas em tampão Tris-HCl 60mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v) e aplicadas em um gel de poliacrilamida 7,5% contendo o substrato (laminarina, liquenana ou carboximetilcelulose) 1% (p/v). As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de 0,2mA/cm² a 4°C, sendo então lavadas 3 vezes com tampão MES 20mM pH 6 contendo CaCl₂ 10mM por 5 minutos com agitação. Após a

lavagem, incubou-se o gel em câmara úmida a 30°C. O gel ao término da incubação é mergulhado em uma solução de TTC 0,15% (p/v) em NaOH 1M e aquecido no forno de microondas em ciclos de 10 segundos até o aparecimento de bandas vermelhas (Manchenko, 1994). Para os ensaios de amilase e β -glicosidase, as amostras foram aplicadas em um gel de eletroforese sem o substrato (poliacrilamida 12%, p/v, para amilase). Para o ensaio de amilase, o gel de eletroforese, após as lavagens com tampão MES, foi sobreposto a um gel de poliacrilamida (12%, p/v) contendo amido solúvel (1%, p/v). Após a incubação em câmara úmida do conjunto, o gel contendo amido foi corado com TTC. Para o ensaio de β -glicosidase, um papel Whatman nº41 umedecido com uma solução 3mM de Metil-Umbelliferil- β -D-glicosídeo em tampão MES 20mM pH 6 foi colocado sobre o gel de eletroforese para a incubação em câmara úmida. Após a incubação, o papel foi retirado e o gel colocado em um transiluminador de luz ultravioleta, para a visualização de bandas fluorescentes (Manchenko, 1994).

2.10. Determinação de parâmetros cinéticos.

Em todas as determinações mediu-se a velocidade inicial de hidrólise em pelo menos dez concentrações diferentes do substrato. Os valores da constante de Michaelis e da Velocidade Máxima foram calculados pelo método dos mínimos quadrados usando o software Enzfitter (LeatherBarrow, R.J., Elsevier-Biosoft, 1987).

Para a determinação das constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise, os valores da constante de Michaelis e da Velocidade Máxima foram estimados em pelo menos 10 valores de pH nos quais a enzima é estável. Os tampões utilizados (25mM), acetato pH 3,5-5,5; fosfato pH 6-8 e tricina 8,25-9, tiveram a força iônica corrigida com NaCl para o equivalente a uma solução de NaCl 100mM. As constantes de dissociação dos grupos prototrópicos envolvidos em catálise foram calculadas utilizando o software Enzfitter de acordo com as equações a seguir (Dixon & Webb, 1958; Segel, 1993):

para LAM_P, LAM_A e LAM_T

$$V_{\max_{app}} = \frac{V_{\max}^*}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H^+]} \right)}$$

$$\frac{K_{M_{app}}}{V_{\max_{app}}} = \frac{K_s^*}{V_{\max}^*} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right)$$

para LIQ1

$$V_{\max_{\text{app}}} = V_{\max}^* \frac{\left(1 + \frac{\delta K_{es_2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{K_{es_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$\frac{K_{M_{\text{app}}}}{V_{\max_{\text{app}}}} = \frac{K_s^* \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e_1}} + \frac{K_{e_2}}{[H^+]} \right)}{V_{\max}^* \left(1 + \frac{\delta K_{es_2}}{[H^+]} \right)}$$

Nos casos em que se observou inibição da enzima por altas concentrações de substrato, os parâmetros cinéticos foram calculados usando as duas equações abaixo (Cleland, 1979, Segel, 1993):

modelo 1 (ver figura 11)

$$v = \frac{V_{\max} [s]}{K_s + [s] + \frac{[s]^2}{K_i}}$$

modelo 2 (ver figura 11)

$$v = \frac{V_{\max} [s] \left(1 + \frac{\beta[s]}{\alpha K_i} \right)}{K_s \left(1 + \frac{[s]}{K_i} \right) + [s] \left(1 + \frac{[s]}{\alpha K_i} \right)}$$

2.11. Oxidação e Redução de grupos diol em laminarina e quitina coloidal.

Laminarina foi submetida a redução com NaBH₄ ou oxidação com HIO₄ seguida de redução de acordo com Read *et al.* (1996). Os substratos modificados quimicamente foram utilizados para ensaios enzimáticos na concentração 0,05% (p/v), em tampão MES 25mM; CaCl₂ 10mM; pH 6.

3 mL de quitina coloidal 1% (p/v) foram incubados com 1,5mL de periodato de sódio 0,25M a 20°C no escuro por 5 dias, sendo então adicionados 0,16mL de etileno glicol (Manners *et al.*, 1973). Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 10.000g. O precipitado (quitina) foi ressuspensão em 12mL de NaBH₄ 0,5M em NH₄OH 1M e incubado por 1 hora a 60°C no escuro. Interrompeu-se a reação com 3 mL de ácido acético 25% (v/v). A amostra foi novamente centrifugada e o precipitado ressuspensão em água milliQ, sendo então usado para ensaios enzimáticos. Uma amostra de quitina coloidal foi submetida apenas ao tratamento com NaBH₄.

2.12. Determinação da solubilidade em etanol dos produtos de ação de glucanases. Estimativas de grau de ataque múltiplo.

Ensaio sobre os substratos laminarina ou liquenana realizados de acordo com o item 2.3 foram misturados com 20 volumes de etanol absoluto. A mistura foi incubada a -20°C por 1 hora, sendo então centrifugada a 4°C por 10 minutos a 15.000g. Separou-se o sobrenadante do precipitado e posteriormente evaporou-se o solvente dos dois materiais sob vácuo à temperatura ambiente. Após a liofilização, a quantidade de grupos redutores presente em cada fração foi quantificada com a técnica do ácido dinitrosalicílico (Noelting & Bernfeld, 1948).

O grau de ataque múltiplo (ou processividade) de uma glucanase é definido como o número de ligações glicosídicas hidrolisadas seqüencialmente após o primeiro evento catalítico, ao longo de um ciclo de ligação ao substrato. Para uma endoglucanase, experimentalmente, é a razão entre a quantidade molar de produtos solúveis em etanol (oligosacarídeos com grau de polimerização pequeno) e a quantidade molar de produtos insolúveis (grau de polimerização grande) gerados a partir do polissacarídeo hidrolisado (Robyt & French, 1967).

2.13. Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de ação enzimática.

2.13.1. β -1,3-glucanases. O material utilizado no ensaio foi dialisado contra tampão MES 20mM; CaCl_2 10mM, pH 6, sendo então combinado (1:1) com uma solução aquosa do substrato (laminarina, liquenana ou CMC) a 1% (p/v). A mistura foi incubada a 30°C, sendo o ensaio interrompido por incubação a 100°C (3 minutos). Aplicaram-se 10 μL do material final obtido em uma placa de cromatografia delgada de sílica G de 0,25mm de espessura preparada segundo Stahl (1969). A fase móvel usada para separação foi butanol:etanol:água 50/30/20 (v/v/v), sendo a cromatografia realizada em atmosfera saturada com a fase e ao longo de 15cm da placa cromatográfica. Os carboidratos presentes foram evidenciados pela técnica do fenol-ácido sulfúrico (Stahl, 1969).

2.13.2. Quitinase. O material obtido após cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75 (item 2.8.4) foi dialisado contra tampão acetato 10mM pH 4, sendo então combinado (1:1) com quitina coloidal 1% (p/v), quitobiose, quitotriose, quitotetraose, quitopentaose ou quitohexaose na concentração de 1mg/mL em água. Após incubação a 30°C, o ensaio foi interrompido por incubação a 100°C (3 minutos) e centrifugado (10 minutos, 14.000g, temperatura ambiente). 10 μL do sobrenadante foram aplicados em uma placa de cromatografia em camada delgada de sílica G de 0,25mm de espessura preparada segundo Stahl (1969). A fase móvel usada para separação foi butanol:etanol:água: NH_4OH 40:49:10:1 (v/v/v/v), sendo a

cromatografia realizada em atmosfera saturada com a fase e ao longo de 15cm da placa cromatográfica. Açúcares redutores foram evidenciados pela técnica do nitrato de prata – hidróxido de sódio (Stahl, 1969).

2.14. Modificação química.

Preparações purificadas das β -1,3-glucanases de *A. flavolineata* (LAM_A) e *T. molitor* (LAM_T) foram incubadas com os reagentes expostos na tabela 4. Em cada caso a enzima foi previamente transferida através de diálise para as condições de modificação expostas na tabela 4. Nos experimentos com carbodiimidas, a reação de modificação foi interrompida com a adição de citrato (concentração final de 200mM) e nos experimentos com tetranitrometano, com a adição de fenol (concentração final de 130mM). Seguiu-se a determinação da atividade remanescente. Nos experimentos com outros modificadores, a reação de modificação foi interrompida através de diluição (15x) com tampão MES 5mM; CaCl₂ 0,5mM; pH 6 e cromatografia de filtração em gel em coluna HiTrap Desalting utilizando o mesmo tampão. Para o caso do EDTA, o tampão de diluição/cromatografia não continha CaCl₂. As amostras obtidas foram evaporadas sob vácuo à temperatura ambiente, e tiveram seu volume corrigido com água milliQ antes da determinação da atividade residual. Controles revelaram que as enzimas não perdem atividade na ausência dos modificadores químicos, nas condições usadas em cada um dos experimentos.

Também foram realizados experimentos de inativação das enzimas na presença dos reagentes de modificação adicionando laminarina à mistura de reação.

Tabela 4 - Natureza, reatividade e condições da reação de inativação para os diferentes modificadores químicos utilizados.

Inativador	Nome abreviado	Grupo ou aminoácido preferencialmente modificado	Tampão	Concentração (mM)	Referência
1-etil-3-(dimetilamino-propil)-carbodiimida	EDC	COO ⁻ / Aspartato ou Glutamato	TEMED 200mM pH 5	3,75-30	Bray & Clarke, 1990
1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida	CHMC	COO ⁻ / Aspartato ou Glutamato	TEMED 200mM pH 5	30	Bray & Clarke, 1990
tetranitrometano	TNM	Tirosina	fosfato 100mM pH 8	0,1-10	Riordan & Vallee 1972
fenilgloxal	FG	Arginina	EPPS 100mM pH 8 CaCl ₂ 5mM	2-20	Abe et al., 1993
ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	Cátions divalentes (Ca ⁺² , Mg ⁺²)	MES 100mM pH 6	10-100	Cristofoletti & Terra, 2000
ácido N,N,N',N'-etileno-glicol-bis-(éter-β-amino-etílico)-tetraacético	EGTA	Cátions divalentes (Ca ⁺² , Mg ⁺²)	MES 100mM pH 6	10-250	Cristofoletti & Terra, 2000
N-bromosuccinimida	NBS	Triptofano	citrato-fosfato 50mM pH 6 CaCl ₂ 5mM	10	Spande & Witkop, 1967
p-hidroxi-mercúrio-benzoato	pHMB	Cisteína	EPPS 4mM pH 8 CaCl ₂ 0,5mM	0,25-1	Skoubas & Georgatsos, 1997

2.15. Ensaios de lise de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

As enzimas purificadas a partir do tubo digestivo de *P. americana* (LAM_P, concentração 50 μ M e LIQ1, concentração 90 μ M) foram incubadas em presença de células de *S. cerevisiae* (linhagem S14, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Pedro Araújo, IQ-USP) nas concentrações de 5-11 Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por microlitro em meio hipertônico (tampão MES 25mM pH 6 com CaCl₂ 5mM, CMC 0,25%, NaCl 1,625 e 0,375M, respectivamente, para os ensaios com LIQ1 e LAM_P) ou em meio nutritivo (glicose 0,5% (p/v), extrato de levedo 0,5% (p/v), caseína hidrolisada 0,5% (p/v), citrato 10mM, CaCl₂ 5mM, pH 6). Após diferentes tempos de incubação, alíquotas de 50 μ L foram retiradas e plaqueadas em meio sólido YPDA (Johnston, 1994). Contou-se o número de UFCs restantes após 24 horas de crescimento a 30°C.

A enzima LAM_T purificada (60 μ M) foi incubada em presença de células de *S. cerevisiae* S14 nas concentrações de 4-50 UFCs/ μ L em tampão citrato fosfato 50mM, CaCl₂ 5mM, pH 6. Após diferentes tempos de incubação, alíquotas de 50 μ L foram retiradas, tendo o número de UFCs restantes determinado como acima.

2.16. Esterilização de ovos de *Tenebrio molitor*. Produção de larvas em ambiente estéril, dissecação, preparação das amostras e controle da esterilidade.

2.16.1. Coleta de ovos. Acondicionaram-se cerca de 20 adultos de *T. molitor* no interior de uma placa de Petri (diâmetro interno 150mm) com o fundo forrado com papel de filtro e coberto com ração. No interior da placa acondicionou-se uma tira de batata. A ração possui a seguinte composição: farinha de trigo 25% (v/v), farinha de aveia 25% (v/v), ração para frangos (Purina, Brasil) 15% (v/v) e farelo de trigo 35% (v/v). A cada dois dias, trocou-se a ração, a tira de batata e o papel de filtro. No papel de filtro, em média, puderam ser recolhidos cerca de 200 ovos de *T. molitor* (10-1000 ovos).

2.16.2. Esterilização. O papel de filtro com os ovos foi mergulhado em água destilada por 15 minutos com agitação, para que os ovos se soltassem do papel. A suspensão de ovos foi filtrada em um novo papel, que foi colocado em uma solução (em água MilliQ autoclavada) de Virkon 2% (Antecint, Reino Unido) com agitação por 50 minutos, no fluxo laminar. Após a incubação, os ovos foram lavados com água milliQ autoclavada por 5 minutos com agitação (3 vezes). Após a lavagem, os ovos foram espalhados com uma espátula (fornada durante a noite a 150°C) sobre um papel de filtro (previamente autoclavado por 2 vezes com intervalo de 24 horas) em uma placa de Petri (diâmetro interno 150mm) estéril. Os ovos foram incubados a 26°C no escuro por 5 a 7 dias, até a eclosão de todas as larvas.

2.16.3. Eclosão e cultura. As larvas recém-eclodidas (1º ínstar) foram transferidas no fluxo laminar com o auxílio de um palito de madeira

(autoclavado) para tubos Falcon de 15mL contendo cerca de 2 g de ração (autoclavado por 2 vezes, com um intervalo de 24 horas). Foram colocadas cerca de 10 larvas por tubo. Os tubos Falcon contendo larvas foram selados com alumínio e acondicionados em estufa a 30°C, sob condições de fotoperíodo controlado (12:12) e umidade natural. Para permitir a aeração das culturas, a tampa dos tubos foi afrouxada em uma volta. Quando necessário, os animais foram transferidos para outro tubo com ração esterilizada dentro do fluxo laminar. Após o crescimento, larvas de último ínstar foram recolhidas para dissecação.

2.16.4. Dissecação. Larvas de último ínstar foram recolhidas e, após anestesia no gelo, dissecadas em solução de cloreto de sódio 342mM estéril (filtração em membrana com poro de 0,22µm – Millipore, EUA) no fluxo laminar. Pinças e lâminas utilizadas para manipulação e dissecação foram fornadas (150°C) por uma noite. Após a separação do intestino médio, este foi acondicionado em um microtubo de 1,5mL (autoclavado) e congelado a -20°C. Larvas controles (animais criados em ração em condições não estéreis) foram dissecados, tendo o ventrículo congelado da mesma maneira.

2.16.5. Preparação de homogeneizados. A microtubos contendo um ventrículo de larva de *T. molitor*, foi adicionado 1mL de glicerol 20% (v/v) estéril (filtração em membrana com poro de 0,22µm). O material foi macerado e homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador para microtubos (Sigma, EUA, modelo Z35,997-1) durante 1 minuto no fluxo laminar. O pistilo do homogeneizador foi previamente esterilizado por imersão em etanol 70% (v/v)

durante 15 minutos sob radiação ultravioleta no fluxo laminar. O homogeneizado foi guardado a -20°C .

2.16.6. Plaqueamento. Aliquotas de $50\mu\text{L}$ do homogeneizado acima foram espalhadas em placas de Petri (diâmetro interno 100mm) contendo dois tipos de meio de cultura: meio YPDA – extrato de levedura 1% (p/v), peptona 1% (p/v), glicose 1% (p/v) e ágar 2% (p/v) ou meio YPDA contendo ampicilina 50mg/L. Quando necessário, o material a ser plaqueado foi diluído com glicerol 20% estéril. As placas de meio contendo amostras foram incubadas a 30°C por 1 semana, sendo então contado o número de colônias em cada uma (sob lente de aumento de 40-160x). Todas as manipulações foram feitas em fluxo laminar com material esterilizado.

2.17. Alimentação de larvas de *Tenebrio molitor* com antibióticos.

Farelo de trigo (10g) foi espalhado em uma bandeja de alumínio retangular (23,5cm x 35cm) e então umedecido com metanol. Após a evaporação do metanol (capela), aspergiu-se sobre o farelo 100mL de uma solução metanólica de nistatina (5.000.000U/L) e ampicilina (100mg/L). Após nova evaporação, o produto obtido foi raspado com espátula e macerado em almofariz. Cerca de 20 larvas de *T. molitor* (último ínstar) foram acondicionadas nesse alimento, à temperatura ambiente, por dois dias. Trocou-se a ração com antibióticos todos os dias. Após diferentes tempos de incubação no alimento, larvas foram retiradas, sendo dissecadas nos moldes expostos no item 2.16.4. Os ventrículos obtidos foram homogeneizados e analisados como exposto nos

itens 2.16.5 e 2.16.6. Larvas controles (alimentadas com farelo tratado apenas com metanol) foram analisadas da mesma maneira.

2.18. Obtenção de seqüência de amino-ácidos N-terminal.

Uma amostra contendo 1,5 μ mol da quitinase de *T. molitor* purificada foi submetida a SDS-PAGE (item 2.9.). Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Blue R (0,1%, p/v, em metanol:ácido acético:água 50:10:40, v/v/v) por 30 minutos, sendo então lavado por 2 horas com a mistura de solventes acima. A banda de proteína foi recortada do gel com uma lâmina e colocada em um microtubo de polipropileno (1,5mL), sendo liofilizada sob vácuo à temperatura ambiente. O gel foi então ressuspenso em 50 μ L de tampão CAPS 200mM pH 11, sendo adicionados posteriormente 200 μ L de água e 30 μ L de metanol. No microtubo colocou-se um pedaço de 2mm x 5mm de membrana de PVDF. Após verificar que a membrana estava fortemente azulada e o gel transparente (uma semana), o pedaço de PVDF foi retirado e lavado 5 vezes em 1mL de metanol, sendo então entregue ao serviço de seqüenciamento amino-terminal do laboratório do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto (Escola Paulista de Medicina – Unifesp).

2.19. Clonagem e sequenciamento da quitinase de *T. molitor*.

Um fragmento de DNA com cerca de 500 pares de bases cuja seqüência apresenta alta similaridade com quitinases depositadas em bancos de dados

foi amplificado por PCR, subclonado e seqüenciado em nosso laboratório durante as tentativas de clonagem da cisteína-proteinase de *T. molitor* (Plínio Tadeu Cristofolletti Jr., comunicação pessoal). Sintetizou-se um oligonucleotídeo complementar à porção 5' deste fragmento e, com a sonda oligonucleotídica referente ao braço 5' do fago lambda (no qual foi construída a biblioteca de cDNA das células do epitélio do ventrículo de larvas do inseto, ver Ferreira *et al.*, 2001), submeteu-se a biblioteca de cDNA a 50 ciclos de PCR, obtendo-se a amplificação de um fragmento de cerca de 650 pares de bases. Este fragmento foi subclonado no plasmídeo pGEM-T (Stratagene) e submetido a seqüenciamento pelo serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Sueli Lopes Gomes. A seqüência obtida foi analisada utilizando as ferramentas BLAST, CLUSTAL, TargetP, pI/MW e Signal Peptide Prediction, disponíveis na Internet (The National Center for Biotechnology Information Server, *In* <http://www.ncbi.gov>).

2.20. Purificação de proteínas ligantes de papel.

Colocou-se em uma placa de Petri (5 cm de diâmetro) um fragmento de papel Whatman nº41 de maneira a cobrir o fundo da placa. Sobre o papel aplicaram-se 300µL da fração solúvel do ventrículo de *P. americana*, 500µL da fração solúvel do ventrículo de *T. molitor* ou 50µL do regurgitado de *A. flavolineata*. Após 5 minutos de incubação, adicionaram-se 10mL de tampão MES 20mM, CaCl₂ 10mM pH 6. Após 1 minuto de incubação com agitação,

recolheu-se o tampão com uma pipeta Pasteur (material C1). Repetiu-se a operação mais duas vezes (materiais C2 e C3). Adicionaram-se então 10mL de uma solução aquosa de Tween 20 1% (v/v). Após 1 minuto de agitação, coletou-se o líquido com pipeta Pasteur (material C4). Repetiu-se a operação mais duas vezes (materiais C5 e C6).

2.21. Purificação de proteínas ligantes de pachyman.

Em um microtubo de polipropileno (1,5mL) foram colocados 100mg de pachyman (β -1,3-glucana linear insolúvel de *Poria cocos*). Sobre o polissacarídeo adicionaram-se 300 μ L da fração solúvel do ventrículo de *P. americana*, 500 μ L da fração solúvel do ventrículo de *T. molitor* ou 50 μ L do regurgitado de *A. flavolineata*. Após 5 minutos de incubação, o microtubo foi centrifugado por 1 minuto a 14.000g. O sobrenadante (material P0) foi retirado com uma seringa de 1mL. Adicionou-se então 1mL de tampão MES 20mM; CaCl₂ 10mM; pH 6. Após 1 minuto de incubação com agitação, o material foi centrifugado (condições acima) e o sobrenadante retirado (material P1). Repetiu-se a operação mais duas vezes (materiais P2 e P3). Adicionou-se então 1mL de Tween 20 1% (v/v). Após 1 minuto de incubação com agitação, o material foi centrifugado (condições anteriores) e o sobrenadante coletado (material P4). Repetiu-se a operação mais duas vezes (materiais P5 e P6).

2.22. Ensaio de hidrólise de celulose cristalina (Avicel)

Pesou-se 1,25 mg de Avicel (Merck) em um microtubo de polipropileno (2mL). Adicionou-se 500 μ L da fração solúvel do ventrículo de *T. molitor*, 500 μ L da fração solúvel do ventrículo de *P. americana* ou 500 μ L do regurgitado de *A. flavolineata* diluído com água 10 vezes. Adicionou-se aos ensaios azida de sódio (concentração final 0,05%, p/v). As suspensões foram incubadas com agitação a 30°C. Alíquotas de 50 μ L foram retiradas após diferentes intervalos de tempo e fervidas, sendo então centrifugadas (1 minuto a 14.000g). O sobrenadante foi coletado e usado para determinação de açúcares redutores solúveis liberados no ensaio, com o método do DNS (item 2.4). Controles (amostras sem a adição de celulose e amostras fervidas por 10 minutos) foram incubados da mesma forma que os tubos experimentais. O incremento observado na quantidade de açúcares solúveis foi expresso como porcentagem de hidrólise da celulose inicial.

2.23. Determinação da configuração anomérica da glicose produzida por LAM_A.

Uma amostra de 50 μ L da enzima LAM_A purificada foi combinada com 50 μ L de uma solução de laminarina 1% (p/v) em água. A mistura foi incubada por 15 minutos a 30°C, adicionando-se então 100 μ L de uma solução de glucono- δ -lactona 200mM preparada imediatamente antes do experimento, com o objetivo de interromper o ensaio. A glucono- δ -lactona é um inibidor

competitivo de glucanases. Ao produto final foi adicionado o reagente Tris Glicose-Oxidase, e acompanhou-se a formação de absorbância a 420nm durante 20 minutos. Um experimento semelhante foi realizado, fervendo-se a mistura de reação antes da adição da glucono- δ -lactona. Uma solução controle de glicose (imediatamente após seu preparo) também foi incubada com o reagente de TGO, antes ou depois de fervura, representando respectivamente a mistura de anômeros β/α (aproximadamente na proporção 2:1) ou uma solução composta majoritariamente pelo anômero β .

3. Resultados

3.1. Distribuição das atividades β -glucanásicas no tubo digestivo de *Periplaneta americana*.

A fração solúvel de tubos digestivos inteiros de adultos de *P. americana* possui considerável atividade hidrolítica sobre diferentes β -glucanas (ver tabela 5). O alimento fornecido aos animais durante sua criação possui quantidades muito pequenas desses três tipos de atividade enzimática, o que indica que essas enzimas são secretadas no tubo digestivo do animal, não sendo provenientes da dieta (tabela 5).

Tabela 5 - Atividades de hidrolases presentes em massas iguais (peso úmido) de aveia e tubos digestivos de *Periplaneta americana*.

Substrato	Aveia (mU/150mg)	<i>P. americana</i> (mU/animal)
CMC	0	290 \pm 9
Liquenana	80 \pm 8	4000 \pm 400
Laminarina	0	1600 \pm 200

O peso úmido do tubo digestivo de *P. americana* é 150 \pm 5mg. Os resultados são a média e o desvio padrão da média de 4 determinações. A ração para cachorros não apresentou nenhuma atividade.

As atividades sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose presentes no tubo digestivo de *P. americana* concentram-se nas regiões anteriores (tabela 6). Podemos observar uma significativa porcentagem dessas atividades nas glândulas salivares do inseto, as quais possuem uma alta atividade específica sobre os três substratos. Além disso, é importante ressaltar que apenas uma pequena fração dessas atividades encontra-se no intestino posterior, aonde observamos pequenos valores de atividade específica dessas hidrolases. Esses dados indicam que a secreção desse tipo de enzima é salivar, e que a flora intestinal presente no intestino posterior não contribui significativamente para a digestão de β -glucanas.

O ensaio de atividade sobre laminarina (β -1,3-glucana) após separação eletroforética revela que *P. americana* possui três laminarinases no ventrículo (ver figura 2). A observação das mesmas três bandas de atividade no material obtido a partir das glândulas salivares do inseto reforça a hipótese de que essas glândulas são o principal sítio de secreção desse tipo de enzima digestiva em *P. americana*.

Tabela 6 - β -glucanases e quantidade de proteína presente nas glândulas salivares e em diferentes partes do tubo digestivo (epitélio e conteúdo) de adultos de *P. americana*.

Substrato	Intestino Anterior		Intestino Médio		Intestino Posterior	
	Glândulas Salivares	Papo	Cecos	Ventrículo	Íleo + Cólon	Reto
CMC	5,3 (9)	28,8 (23)	18,2 (25)	25,9 (37)	20 (22)	1,8 (10)
Liquenana	13 (250)	20,9 (170)	20,3 (300)	28,3 (390)	16,4 (170)	1,1 (62)
Laminarina	20,1 (240)	17,6 (90)	26,2 (240)	26,2 (240)	8,7 (47)	1,2 (54)
proteína (mg/animal)	0,96	2,18	1,25	1,24	1,80	0,29

Os resultados são a atividade relativa expressa como a porcentagem em relação à soma das atividades encontradas nas diferentes partes do tubo digestivo. As atividades específicas (entre parênteses) estão expressas em mU/mg proteína. Os dados são o resultado do ensaio de quatro preparações diferentes com 3 animais cada. O desvio padrão da média variou entre 5-20% da média.

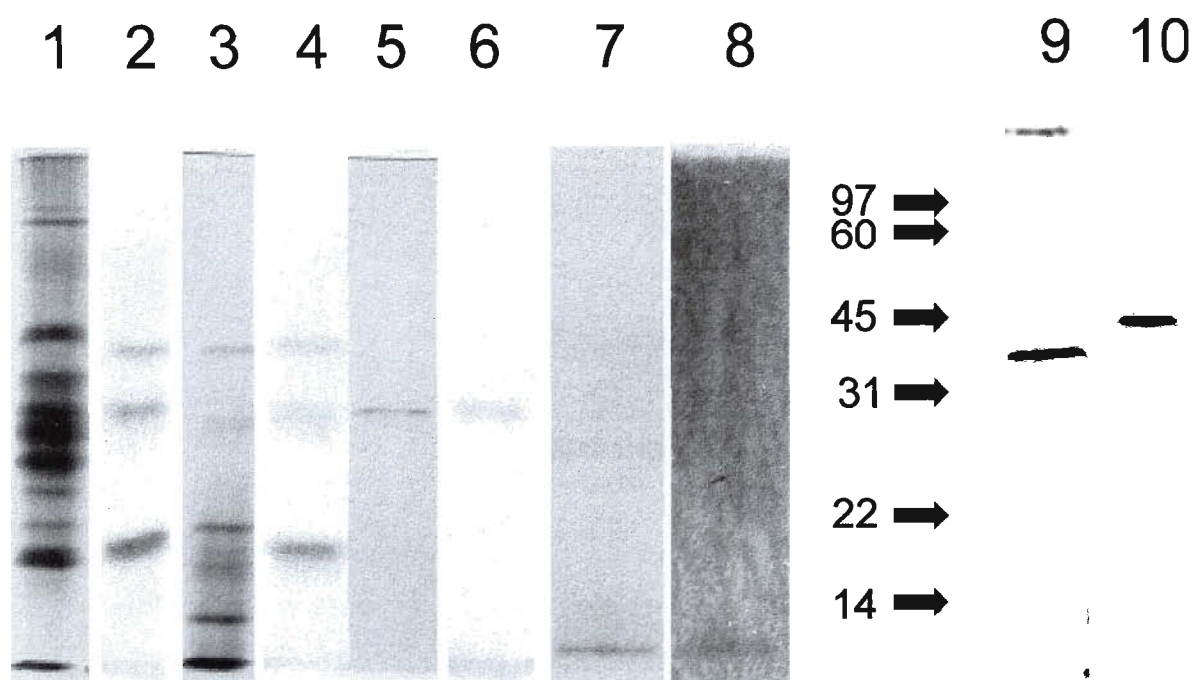


Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida. Raias 1 a 6, gel de poliacrilamida 7,5% contendo laminarina 1%. Raias 1 e 2, fração solúvel da glândula salivar; 3 e 4, fração solúvel do conteúdo do ventrículo; 5 e 6, material LAM_P. Raia 7 - PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% do material LIQ1. Raia 8 - gel de poliacrilamida 7,5% contendo laminarina 1% após sobreposição com o gel da raia 7 por 20 minutos a 30°C. Raias 9 e 10 - SDS-PAGE dos materiais LIQ1 e LAM_P (Poliacrilamida 12%). As setas indicam a migração dos padrões de massa molecular. Raias 1,3, 5, 7, 9 e 10 foram coradas com prata para detecção de proteínas. Raias 2,4,6 e 8 foram tratadas com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para revelação de grupos redutores após incubação, mostrando atividades sobre laminarina.

3.2. Purificação das β -1,3-glucanases digestivas de *P. americana*.

A purificação das β -1,3-glucanases digestivas de *P. americana* consiste em duas cromatografias hidrofóbicas realizadas sequencialmente, em sistemas cromatográficos de baixa pressão (coluna Metil Sepharose, figura 3A) e alta pressão (coluna Resource ETH; figura 3B). Após a cromatografia em coluna Resource ETH, as duas β -1,3-glucanases majoritárias do inseto são purificadas até a homogeneidade (figura 2). É importante verificar que a banda de proteína existente em cada um dos materiais obtidos (LIQ1 e LAM_P) coincide exatamente com a banda de atividade visualizada no ensaio sobre laminarina após a eletroforese (figura 2).

Na cromatografia em coluna Metil Sepharose (figura 3A), observamos um pico de atividade sobre laminarina que não se liga à coluna (frações 7 a 10 da figura 3A). A observação desse pico poderia ser o resultado de uma saturação da coluna. Entretanto, a reaplicação desse material na coluna Metil Sepharose resulta novamente na eluição dessa atividade no lavado da coluna (dados não apresentados). Assim sendo, esse pico de atividade é uma enzima diferente das outras. Contudo, por se tratar de uma atividade minoritária (3% da atividade total), esse material não foi estudado em detalhe.

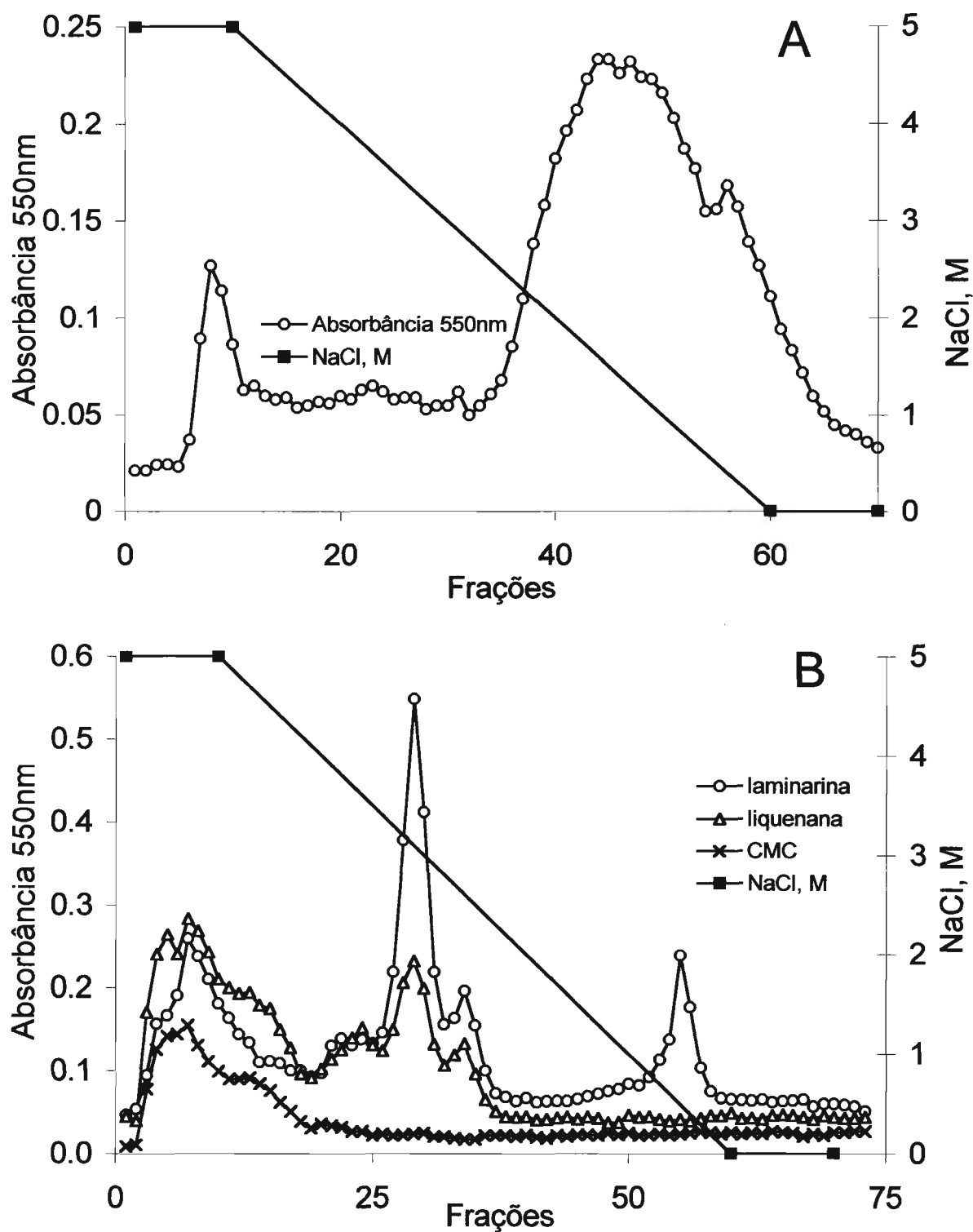


Figura 3 - Purificação das β -1,3-glicanases majoritárias de *P. americana*. A) Cromatografia em coluna Metil-Sepharose da fração solúvel do ventrículo. Foram reunidas as frações 36-62. B) Cromatografia em coluna Resource ETH do material reunido na cromatografia A. Frações reunidas: 28 a 30 (material LIQ1) e 54 a 57 (material LAM_P).

É possível observar na cromatografia em coluna Resource ETH pelo menos outros três picos de atividade sobre laminarina (frações 3 a 19, 21 a 23, 33 a 35 na figura 3B). O primeiro pico (frações 3 a 19) já foi estudado em detalhe pelo nosso laboratório e é constituído principalmente por celulasas (β -1,4-glucanases). Os outros dois picos minoritários (frações 21 a 23 e 33 a 35) não ocorrem em todas as cromatografias, podendo ser produtos de proteólise parcial de algumas das enzimas majoritárias. Pelas razões acima, nenhum desses materiais foi estudado em detalhe.

É importante ressaltar que o sal utilizado nos tampões das cromatografias hidrofóbicas dessa marcha foi o cloreto de sódio, e não o sulfato de amônio, sal mais comumente utilizado nessa técnica. A eficiência das cromatografias com o uso do cloreto de sódio indica que as enzimas isoladas são bastante hidrofóbicas, pois esse sal é um dos mais cosmotrópicos de acordo com a série de Hoffmeister. Tal fato provavelmente foi o responsável pela grande eficiência das cromatografias na purificação dessas glucanases. Outra vantagem é que se evitou a exposição das enzimas ao sulfato de amônio, o que leva a uma rápida perda de atividade dos materiais (dados não apresentados).

Não foi possível realizar cálculos de recuperação de atividade ou de enriquecimento ao longo dessa marcha de purificação. O ensaio da atividade da fração solúvel do ventrículo de *P. americana* sobre β -glucanas revelou-se não linear (figura 4A). Além disso, há fortes indícios da presença de um inibidor na fração solúvel, pois a diluição desse material resulta na obtenção de valores de atividade específica mais elevados (figura 4B). Os valores de recuperação

calculados para o primeiro passo da marcha variam, por exemplo, de 10% a 1000%, provavelmente devido aos dois fatores acima. A separação de diferentes enzimas ao longo da marcha também complica o cálculo de recuperação, pois efeitos como sinergismo entre formas no material inicial não podem ser descartados.

Apesar desses problemas, podemos observar que *P. americana*, apesar de apresentar um sistema de digestão de β -glucanas bastante complexo, possui duas β -1,3-glucanases principais: uma enzima (LIQ1) capaz de hidrolisar liquenana (β -1,3-1,4-glucana) e laminarina (β -1,3-glucana) com cerca de 42 kDa (SDS-PAGE, figura 2), e outra enzima capaz de clivar apenas laminarina (LAM), com cerca de 45 kDa (SDS-PAGE, figura 2). Essas duas enzimas foram caracterizadas em detalhe posteriormente (itens 3.3 e 3.4).

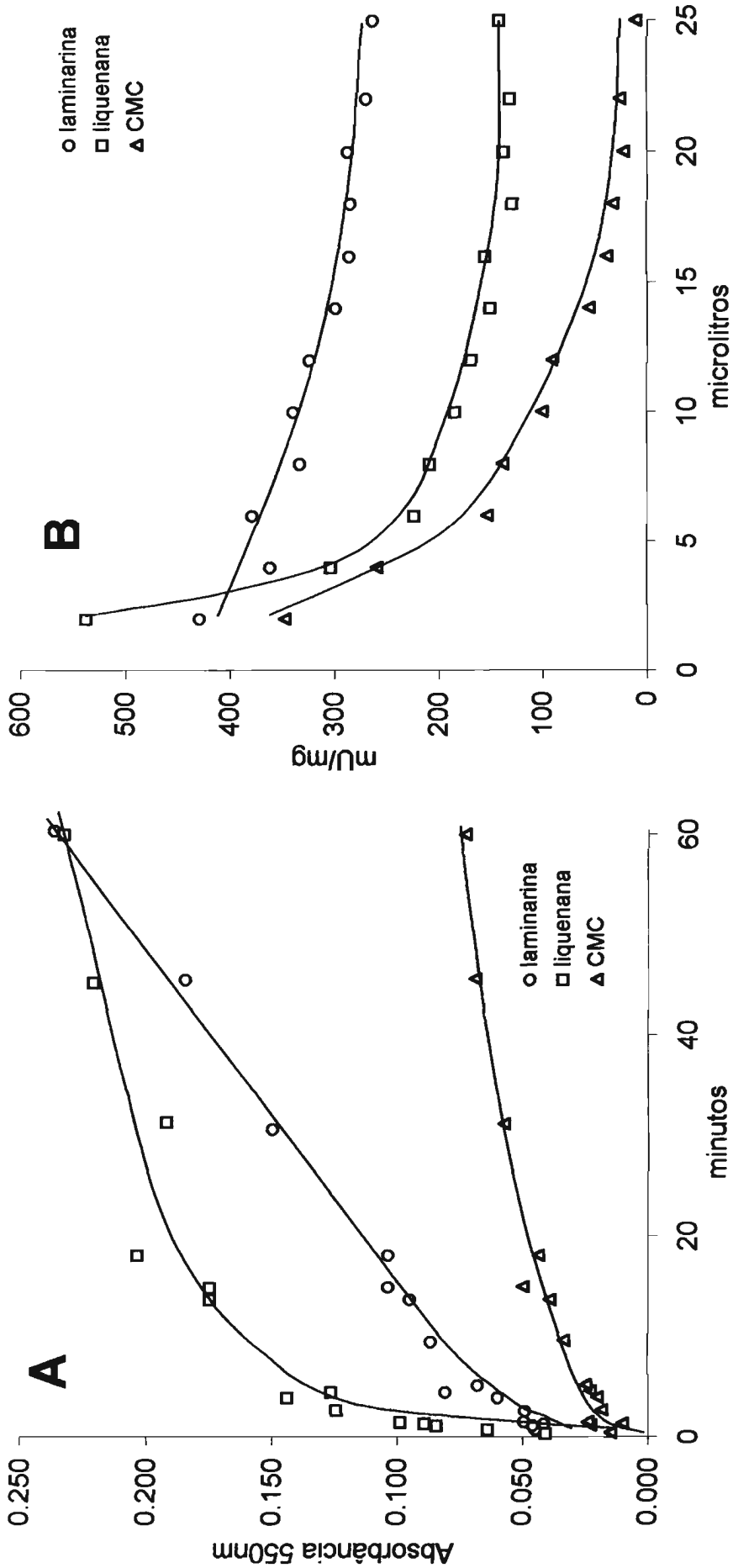


Figura 4 - A) Ensaio das atividades sobre laminarina, liquenana e CMC presentes na fração solúvel do ventrículo de *P. americana*. B) Determinação da atividade específica de β -glucanases na fração solúvel do ventrículo de *P. americana* usando diferentes quantidades de material na mistura de reação.

A marcha de purificação apresentada acima foi usada para purificar as β -1,3-glucanases presentes na glândula salivar do inseto. Submetendo a fração solúvel das glândulas salivares de *P. americana* às duas cromatografias hidrofóbicas apresentadas acima, obtivemos resultados muito semelhantes aos observados na figura 3. Foi possível, a partir das glândulas salivares do inseto, isolar enzimas com o mesmo comportamento cromatográfico e massa molecular que LAM_P e LIQ1, o que indica claramente que essas enzimas são secretadas por essas glândulas. Essas enzimas, purificadas a partir da glândula salivar, foram caracterizadas com a intenção de compará-las com as enzimas purificadas a partir do ventrículo. Pretendeu-se assim corroborar a hipótese de que LIQ1 e LAM_P são, de fato, secretadas pelas glândulas salivares de *P. americana*.

Dessa maneira, foram obtidos parâmetros cinéticos preliminares relacionados à hidrólise de laminarina por essas enzimas e à inativação frente ao reagente 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carboddimida (EDC), para enzimas purificadas a partir do ventrículo e da glândula salivar. Os resultados estão expostos na tabela 7. A semelhança entre as enzimas (LAM_P e LIQ1) purificadas a partir das glândulas salivares do inseto e as enzimas purificadas a partir do ventrículo reforça a hipótese de que as principais β -1,3-glucanases encontradas no ventrículo de *P. americana* têm origem salivar.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos de LAM_P e LIQ1 purificadas a partir das glândulas salivares ou do ventrículo de *P. americana*.

enzima	constante de Michaelis (laminarina, %)		constante de inativação (EDC, $10^{-3}M^{-1}s^{-1}$)	
	glândula salivar	ventrículo	glândula salivar	ventrículo
LAM_P	$0,066 \pm 0,019$	$0,062 \pm 0,006$	2,61	2,45
LIQ1	$0,085 \pm 0,008$	$0,082 \pm 0,007$	2,66	2,53

3.3. Caracterização da liquenase digestiva de *P. americana* (LIQ1).

O pH ótimo de LIQ1, usando laminarina ou liquenana como substratos, é 6 (dados não apresentados). O melhor substrato de LIQ1 é a laminarina (β -1,3-glucana; tabela 8), embora liquenana também seja um bom substrato para essa enzima (tabela 8). A preferência por laminarina é resultado de uma menor constante de Michaelis para esse substrato. Em um primeiro momento, não foi possível detectar atividade de LIQ1 sobre β -1,4-glucanas (carboximetilcelulose e celulose microcristalina - Avicel). Assim sendo, imaginamos que LIQ1, ao atacar liquenana, hidrolisa preferencialmente as ligações do tipo β -1,3 presentes nesse substrato.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de diferentes substratos por LIQ1.

Substrato	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M	k_{cat}/K_M relativo
laminarina	$0,16 \pm 0,01$	750 ± 10	4700	100
liquenana	$0,36 \pm 0,04$	1050 ± 60	2920	62

A determinação dos parâmetros cinéticos de LIQ1 revelou que essa enzima apresenta uma cinética de reação Michaeliana frente aos seus dois principais substratos. Os parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LIQ1 foram determinados em diferentes valores de pH, com o objetivo de estudar a participação de grupos prototrópicos na catálise. Obtiveram-se os resultados apresentados na figura 5.

Observando os resultados correspondentes à enzima livre (gráficos A e C da figura 5), obtidos a partir dos valores de V_{max}/K_M , o envolvimento de dois grupos prototrópicos na catálise torna-se evidente. Entretanto, os dados relativos ao complexo enzima-substrato (figuras 5B e 5D) indicam fortemente a participação de apenas um grupo prototrópico envolvido em catálise. Essa contradição aparente é explicada se adotarmos que LIQ1 não é capaz de ligar-se ao substrato quando está com os dois grupos prototrópicos protonados (figura 6). Assim sendo, podemos imaginar que a presença de um dos grupos prototrópicos desprotonados é importante para a ligação do substrato.

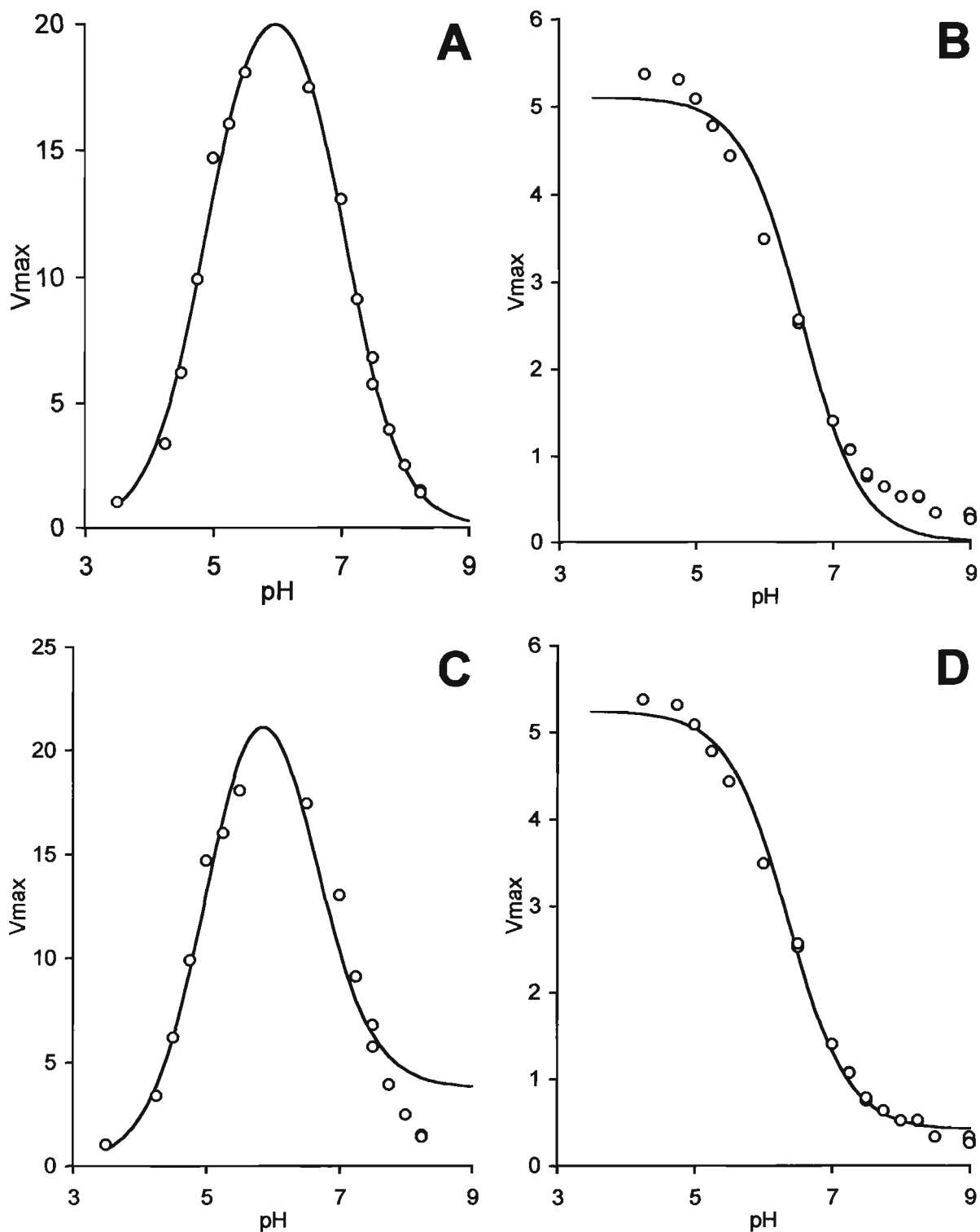
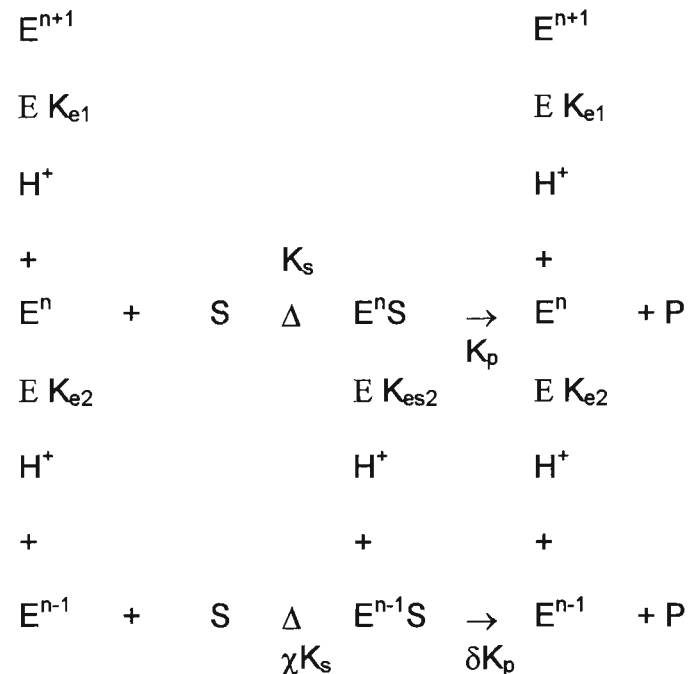


Figura 5 - Efeito do pH nos parâmetros cinéticos de LIQ1. Os círculos são os dados experimentais e as curvas são traçados teóricos baseados nas constantes encontradas pelo método dos mínimos quadrados em cada caso. A e B, curvas calculadas adotando $\beta=0$. C e D, curvas calculadas adotando $\beta>0$.

Figura 6 - Sistema de equilíbrio rápido utilizado para descrever o comportamento de LIQ1 em função do pH.



Entretanto, nenhum dos sistemas de equilíbrio rápido disponíveis pôde descrever adequadamente os dados obtidos para LIQ1. Tal fato ocorre por que os dados de Velocidade máxima em função de pH (gráficos B e D da figura 5) indicam a existência de uma forma da enzima com os dois grupos prototrópicos desprotonados que é parcialmente ativa, não se observando o reflexo da existência dessa forma nos dados referentes à enzima livre (V_{max}/K_M , gráficos A e C da figura 5).

Essa contradição resulta em ajustes inadequados para os dois melhores modelos de equilíbrio rápido disponíveis. Em um deles, ao adotarmos a forma duplamente desprotonada ativa ($\delta > 0$), obtemos um ajuste adequado para os

dados de V_{\max} , mas claramente dissonante nos dados relativos a V_{\max}/K_M (gráficos C e D da figura 5). No outro, ao descartarmos a possibilidade de catálise pela enzima duplamente desprotonada ($\delta=0$), obtemos um ajuste apropriado aos dados de V_{\max}/K_M , mas distanciado dos dados relativos à V_{\max} (gráficos A e B da figura 4). As constantes de dissociação obtidas a partir desses dois ajustes são apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 - Constantes de dissociação de grupos prototrópicos de LIQ1 envolvidos em catálise, calculadas de acordo com os dois modelos possíveis ($\delta=0$ ou $\delta>0$).

assumindo	δ	pKe1	pKe2	pKes2
$\delta=0$	0	$4,88\pm 0,04$	$7,07\pm 0,04$	$6,55\pm 0,06$
$\delta>0$	0,08	$5,0\pm 0,2$	$6,6\pm 0,1$	$6,36\pm 0,04$

É provável que essa impossibilidade de ajuste seja resultado do fato de que LIQ1 possui características diferentes das necessárias para seu encaixe em modelos de equilíbrio rápido (principalmente, K_1 e $K_2 \gg K_{\text{cat}}$). Assim sendo, seria necessário aplicar modelos de estado estacionário aos dados obtidos para essa enzima. Um modelo de estado estacionário é compatível com a idéia de duas formas de enzima, livre ou associada ao substrato,

cineticamente independentes entre si em termos de protonação e desprotonação, que é a situação indicada pelos dados apresentados.

De qualquer forma, podemos concluir que LIQ1 apresenta dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise na enzima livre, com pKs em torno de 5 e 7, e um grupo prototrópico envolvido em catálise no complexo enzima-substrato, com um pK em torno de 6,5. Provavelmente a forma duplamente desprotonada da enzima possui cerca de 8% da atividade da forma mais ativa, que possui um dos grupos protonado e o outro desprotonado.

Passamos ao estudo do padrão de ação de LIQ1 sobre laminarina e liquenana. O tratamento da molécula de laminarina com borohidreto leva à oxidação da ponta redutora desse polissacarídeo (figura 7B). Porém, isso não afeta a atividade de LIQ1 sobre esse substrato (dados não apresentados). O tratamento da laminarina com periodato e borohidreto, além da oxidação da ponta redutora, resulta na destruição da unidade glicosídica da ponta não redutora da cadeia polisacarídica (figura 7C). Esse tratamento também não afeta a atividade de LIQ1 sobre esse substrato (dados não apresentados). Dessa maneira podemos concluir que as pontas do polissacarídeo não são reconhecidas pelo sítio ativo dessa enzima e que, dessa forma, LIQ1 é uma endo-glucanase.

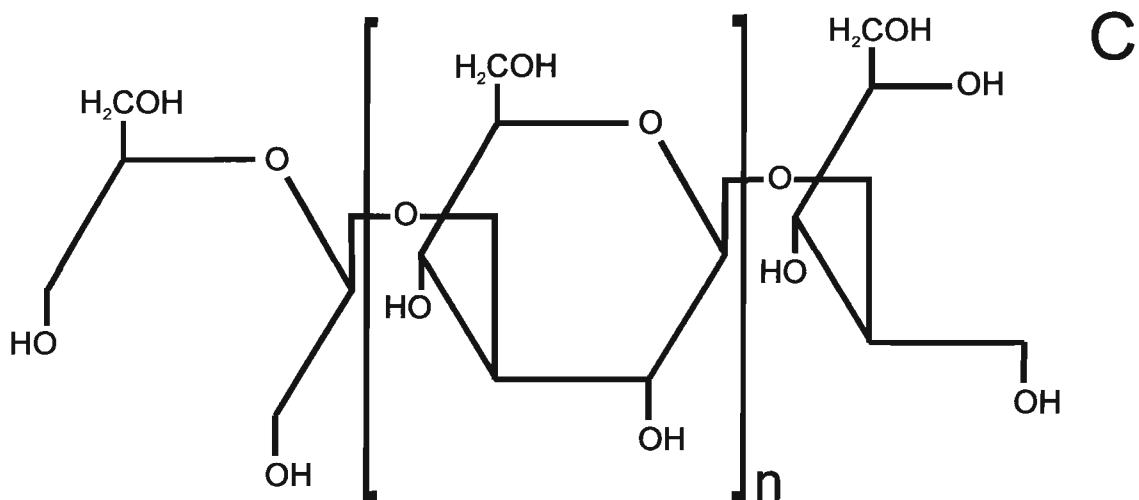
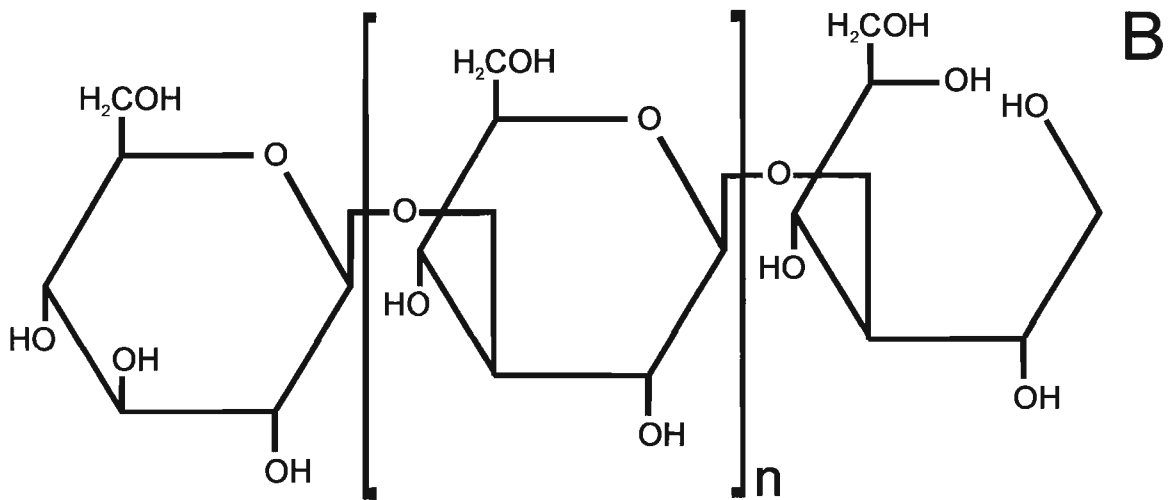
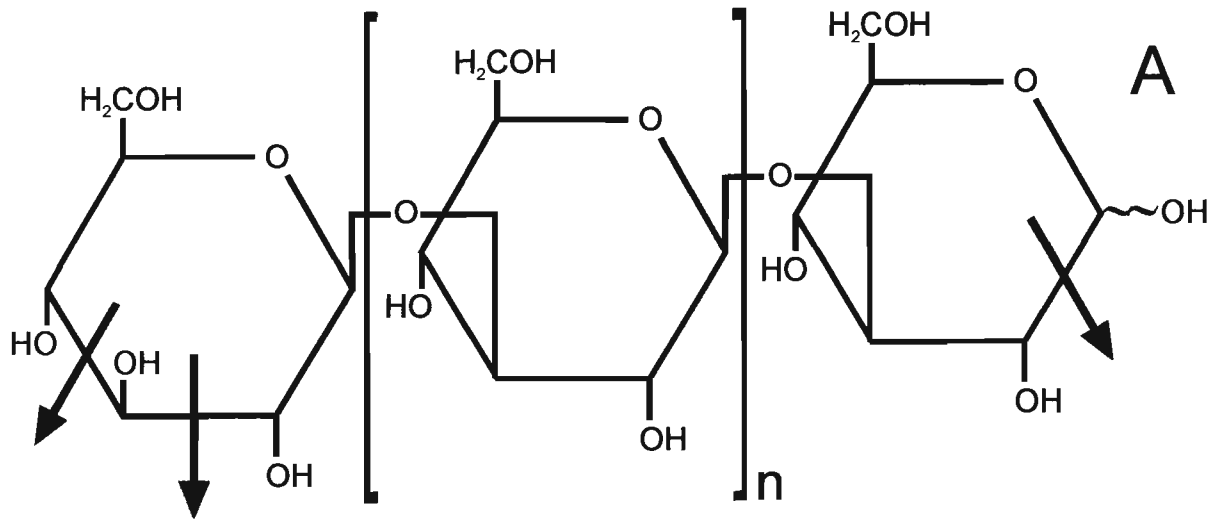


Figura 7 - Fórmula estrutural da laminarina antes (A) e depois de tratamento com borohidreto (B) ou periodato seguido de borohidreto (C). As setas em (A) indicam ligações carbono-carbono suscetíveis à oxidação por periodato (grupos diol). De acordo com Aspinnall, 1982.

Entretanto, LIQ1, ao atuar sobre laminarina, é capaz de liberar quantidades significativas de glicose (tabela 10). Esse comportamento pode ser explicado apenas pela existência de processividade (ataque múltiplo), aonde, após a primeira clivagem da cadeia polissacarídica (no meio da cadeia, o que dá à enzima o caráter de endoglucanase), a enzima desliza ao longo da molécula de substrato, com a produção subsequente de produtos de baixo grau de polimerização.

Tabela 10 - Percentual de glicose e solubilidade em etanol nos produtos liberados por LIQ1 durante a hidrólise de β -glucanas.

Substrato	Glicose (%)	Produtos Solúveis (%)	Produtos Insolúveis (%)	Razão Sol./Insol.
Laminarina	20	81 \pm 6	19 \pm 6	4
Liquenana	0	22 \pm 1	78 \pm 1	0,3

Assim sendo, estimou-se o grau de ataque múltiplo de LIQ1 ao hidrolisar laminarina ou liquenana, medindo-se a relação entre produtos solúveis em etanol (oligosacarídeos e glicose) e insolúveis nesse solvente (polisacarídeos). Obtiveram-se os valores expostos na tabela 10. Podemos ver que LIQ1 possui a capacidade de clivar 4 ligações glicosídicas da mesma molécula de laminarina após o ataque inicial, o que dá a essa enzima um caráter

sacarificante, enquanto que sobre liquenana a enzima comporta-se como liquefadora, ou seja, praticamente não possui processividade. Sobre liquenana, a enzima realiza um segundo corte da cadeia a cada quatro ciclos de ligação ao substrato.

Os produtos de baixo grau de polimerização gerados por LIQ1 foram analisados através de cromatografia em camada delgada de sílica (figura 8). Podemos ver que o principal produto dessa enzima ao atacar laminarina é laminaripentaose. A glicose gerada pela enzima não aparece nessa técnica devido a uma questão de sensibilidade – se a glicose é, em proporções molares, um quarto dos produtos solúveis em etanol, e considerando que a técnica usada (fenol-sulfúrico) é cinco vezes mais sensível para laminaripentaose do que para glicose, esperamos uma relação de intensidade de banda de 15:1 entre laminaripentaose e glicose. Dessa maneira, podemos concluir que LIQ1, em atuar sobre laminarina, gera preferencialmente moléculas de glicose e laminaripentaose, além de um produto de alto grau de polimerização - na proporção 1:3:1.

Ao atacar liquenana, LIQ1 gera como produtos de ataque múltiplo três tipos de oligosacarídeos (figura 8). Dois deles são celotetraose e celopentaose, e o outro possui uma migração relativa que não se encaixa em nenhum dos padrões de celotetraosídeos, podendo apenas ser alinhado com uma molécula de laminarihexaose. Esse tipo de cadeia não ocorre na molécula de liquenana – dessa maneira, acreditamos que esse produto seja um oligossacarídeo misto, com ligações β -1,4 e β -1,3 alternadas na cadeia.

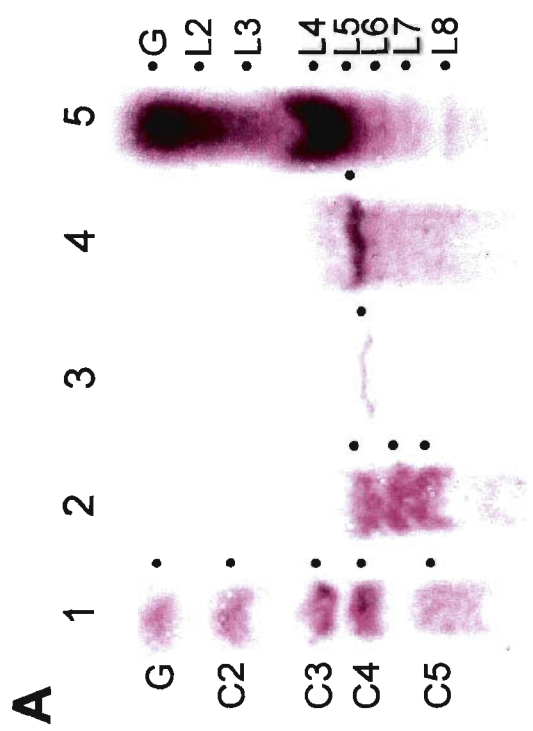
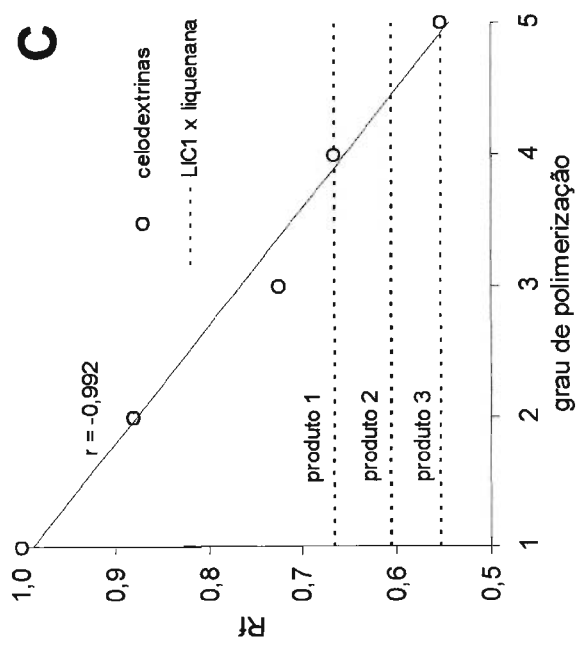
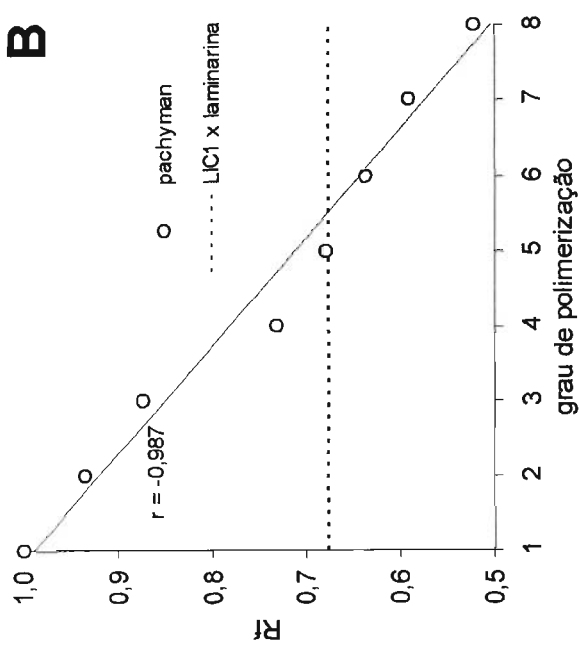


Figura 8 - A) Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de ação de LIQ1. Raia 1 - padrões de glicose (G) e celodextrinas (C2-C5); Raia 2 - ensaio de LIQ1 sobre liquenana; Raia 3 - ensaio de LIQ1 sobre carboximetilcelulose; Raia 4 - ensaio de LIQ1 sobre laminarina; Raia 5 - hidrolisado de Pachyman (β -1,3-glucana linear de *P. cocos*), resultando em glicose (G) e laminaridextrinas (L2-L8). B) Plote das migrações relativas à glicose de laminaridextrinas (hidrolisado pachyman) e do produto de LIC1 sobre laminarina. C) Plote das migrações relativas à glicose de celodextrinas e dos produtos de LIC1 sobre liquenana. As linhas tracejadas indicam as migrações dos produtos de LIC1.

Embora uma possível atividade de LIQ1 sobre carboximetilcelulose não tenha sido detectada em ensaios nos quais se media a produção de poder redutor, pudemos observar que LIQ1, após longos períodos de incubação com carboximetilcelulose (4-10h), é capaz de liberar celotetraose a partir desse polissacarídeo (figura 8). Isso demonstra que essa enzima possui uma pequena capacidade de hidrolisar ligações do tipo β -1,4, embora esse tipo de atividade seja insignificante em comparação com a atividade dessa enzima sobre β -1,3-glucanas.

LIQ1 é capaz de digerir a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, levando à morte celular dessa levedura (figura 9). Em meio hipotônico, apenas 60% das células do fungo permanecem viáveis após cerca de 5 horas de incubação com a enzima (figura 9). Em meio isotônico nutritivo, 85% das células permanecem viáveis após 4 horas de incubação com LIQ1 (dados não apresentados).

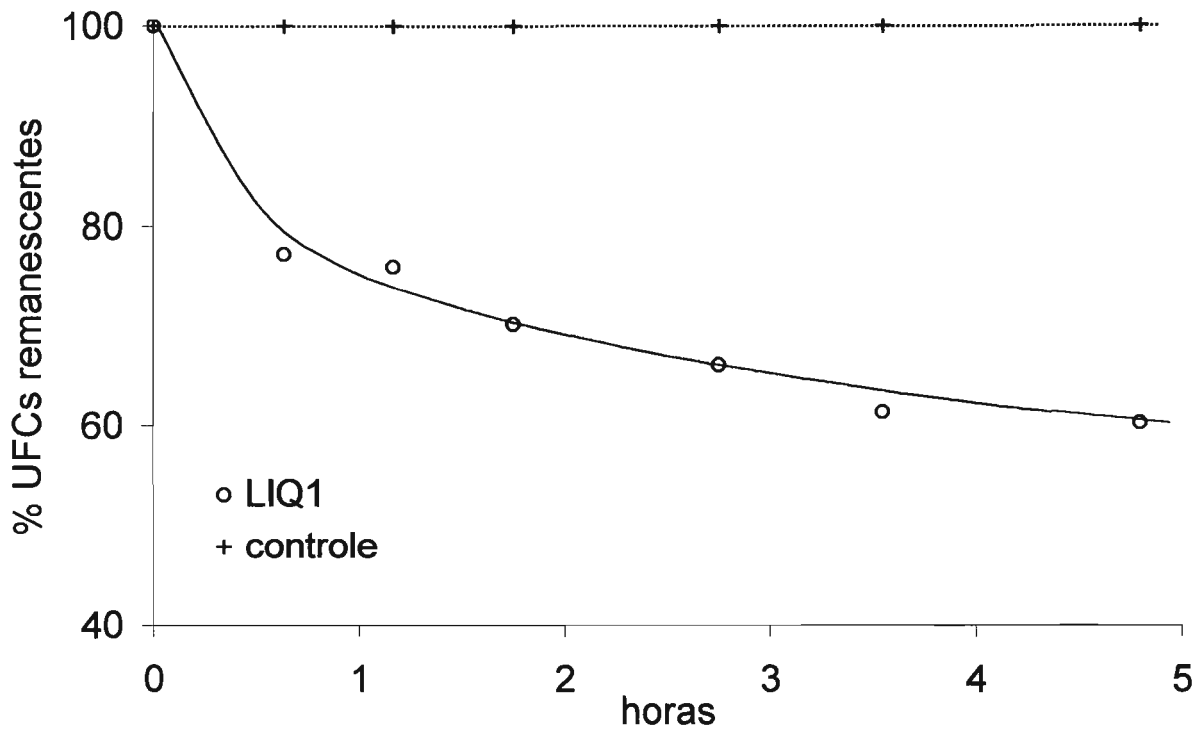


Figura 9 - Lise de células de *S. cerevisiae* em meio hipotônico após incubação com o material LIQ1 purificado.

3.4. Caracterização da laminarinase digestiva de *P. americana* (LAM_P).

O pH ótimo da laminarinase de *P. americana* (LAM_P) é 6, e essa enzima aparentemente possui uma especificidade bastante estrita, clivando apenas β -1,3-glucanas. Essa enzima não possui atividade sobre nenhum dos outros substratos testados - liquenana, β -1,3-1,4-glucana de *Hordeum vulgare*, carboximetilcelulose e laminaribiose (dados não apresentados).

A tentativa de obtenção dos parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_P revelou que essa enzima é inibida por altas concentrações de substrato (figura 10). Apenas dois modelos cinéticos foram capazes de descrever satisfatoriamente os dados obtidos (figura 11). Os parâmetros cinéticos obtidos de acordo com cada um dos modelos estão expostos na tabela 11. Os dados não permitem decidir por nenhum dos dois modelos apresentados. De qualquer maneira, sabemos que LAM_P apresenta uma constante de Michaelis para laminarina em torno de 0,1%, e uma constante de catálise de cerca de 100 s^{-1} . Assim sendo, essa enzima possui uma eficiência catalítica apenas um pouco menor do que LIQ1 (tabelas 8 e 11), devido principalmente a um menor valor de k_{cat} .

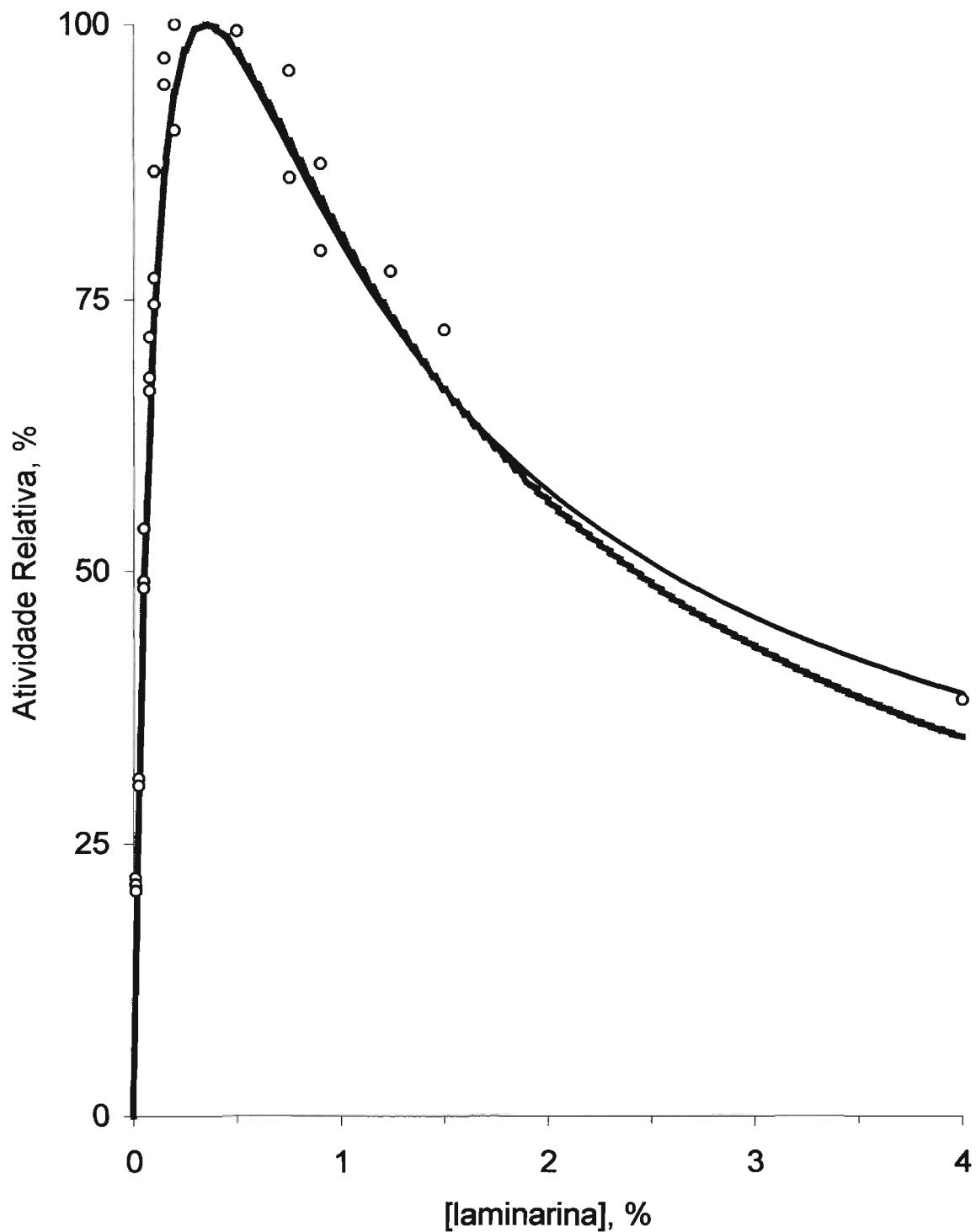
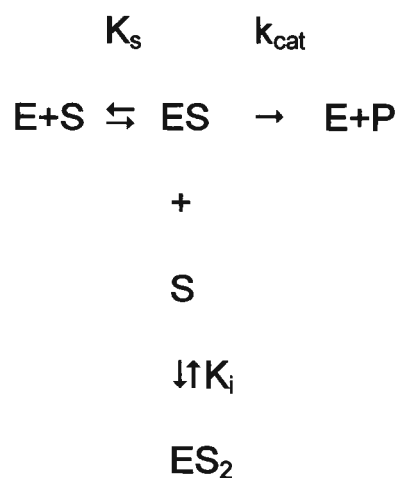


Figura 10 - Efeito da concentração de laminarina na atividade da enzima LAM_P purificada. Os círculos representam pontos experimentais. As linhas curvas representam traçados teóricos correspondentes às constantes cinéticas calculadas de acordo com o modelo I (linha clara) ou com o modelo II (linha escura).

Figura 11 - Modelos cinéticos de equilíbrio rápido usados para a interpretação de curvas de velocidade com inibição por altas concentrações de substrato (LAM_P e LAM_A).

Modelo I



Modelo II

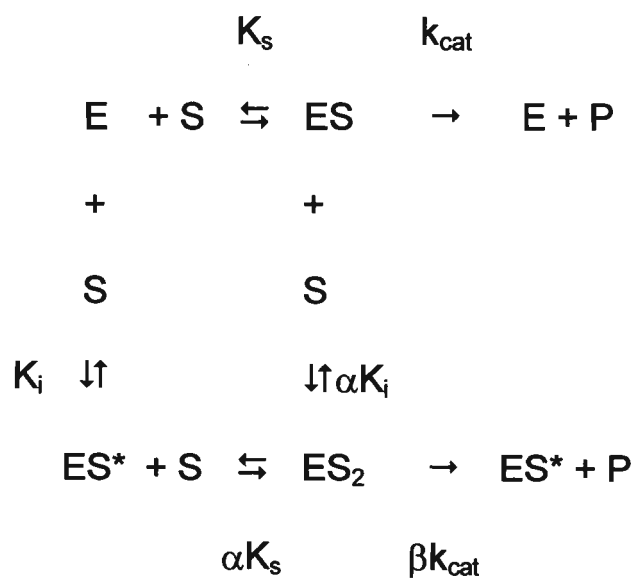


Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de LAM_P calculados de acordo com os modelos propostos de inibição por altas concentrações de substrato (laminarina).

	Modelo1	Modelo2
K_s (%)	$0,116 \pm 0,006$	$0,166 \pm 0,060$
K_i (%)	$1.065 \pm 0,063$	$0,777 \pm 0,086$
k_p (s^{-1})	105 ± 6	138 ± 5
α	-	$0,50 \pm 0,04$
β	-	$0,054 \pm 0,013$
k_p/K_s ($s^{-1}\%^{-1}$)	1100	830

Os parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_P foram determinados em diferentes valores de pH, com o objetivo de verificar se há a participação de grupos prototrópicos na catálise por essa enzima. Por tornar mais simples a análise dos dados cinéticos, usou-se o modelo I para a interpretação desses resultados. Esses experimentos (figura 12) mostram que LAM_P possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise, com pKs em torno de 4,5 e 8,3 na enzima livre e 4,3 e 8,2 no complexo enzima-substrato (calculados de acordo com o modelo da figura 13). Dessa maneira, ao contrário do observado para LIQ1, a ligação do substrato parece não afetar a desprotonação desses dois grupos.

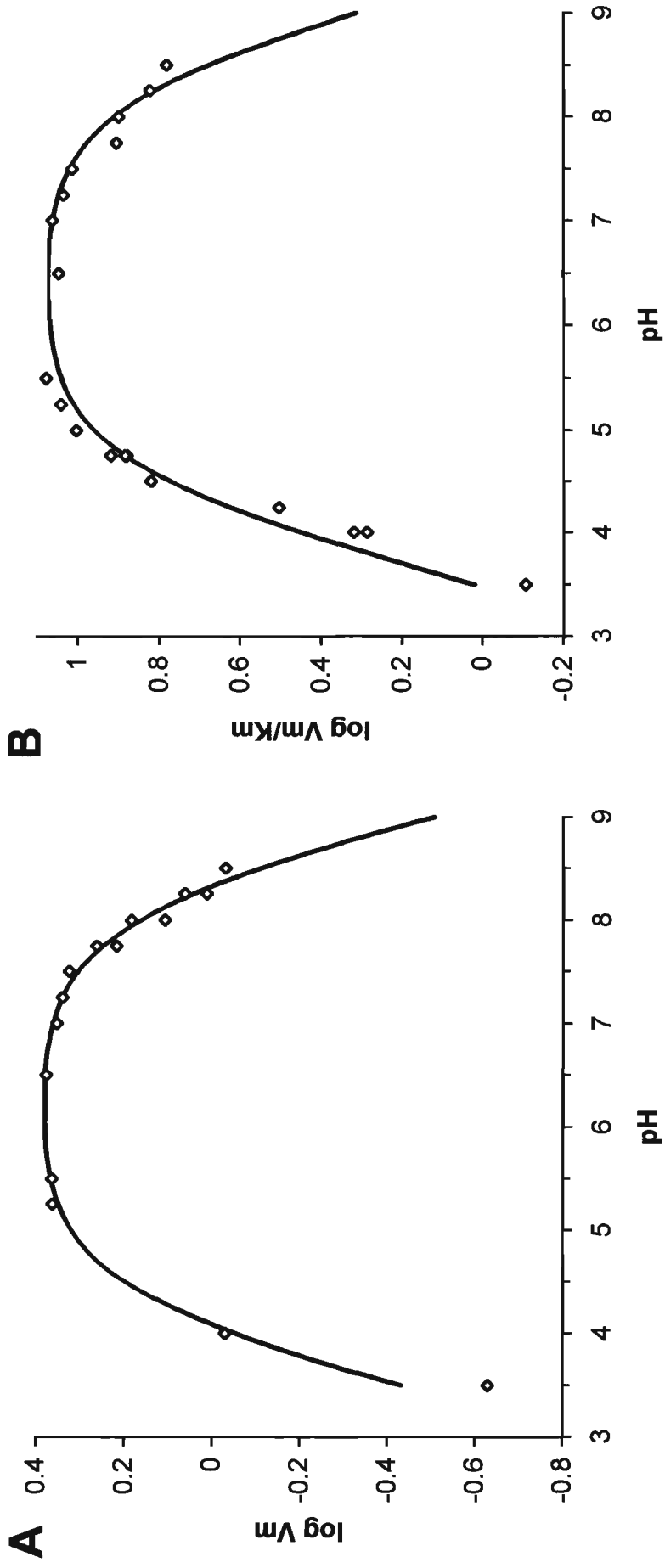
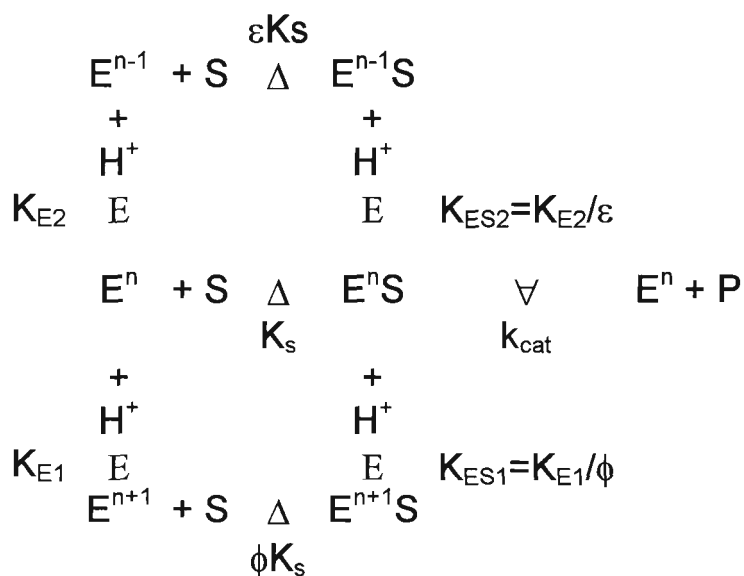


Figura 12 - Plotes de Dixon dos parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_P em diferentes valores de pH. A) Velocidade Máxima; B) Razão entre Velocidade Máxima e Constante de Michaelis. $pK_{e1}=4,53\pm0,07$; $pK_{e2} =8,31\pm0,05$; $pK_{es1}=4,25\pm0,08$; $pK_{es2}=8,16\pm0,04$.

Figura 13 - Modelo cinético de equilíbrio rápido usado para explicar o comportamento de LAM_P em função do pH.



Foram realizados ensaios de LAM_P sobre moléculas de laminarina com as pontas redutora e não redutora modificadas quimicamente (redução com periodato e oxidação com borohidreto, ver figura 7). LAM_P não perde significativamente a atividade após a modificação química do substrato (dados não apresentados), o que indica que essa enzima, à semelhança de LIQ1, também é uma endoglucanase. Grande parte dos produtos gerados por essa enzima é glicose, e a maior parte dos produtos de LAM_P é solúvel em etanol - ou seja, possui baixo grau de polimerização (tabela 12). Dessa forma, LAM_P é uma endo-glucanase sacarificante, ou seja, com um alto grau de ataque múltiplo (11). Os produtos de baixo grau de polimerização gerados por LAM_P ao atacar laminarina são uma série de oligossacarídeos (figura 14), com uma

particularidade – aparentemente, a enzima não é capaz de produzir laminaritríose.

Tabela 12 - Percentual de glicose e solubilidade em etanol dos produtos da hidrólise de laminarina por LAM_P.

glicose (%)	60
Produtos solúveis (%)	92±8
Produtos Insolúveis (%)	8±2
Razão solúveis / insolúveis	11

LAM_P é capaz de atacar a parede celular de *S. cerevisiae*, levando à morte celular em meio hipotônico. Apenas 45% das células dessa levedura expostas a essa enzima permanecem viáveis após 6 horas de incubação (figura 13). Entretanto, em meio isotônico nutritivo, 100% das células expostas a LAM_P permanecem viáveis após 4 horas de incubação.

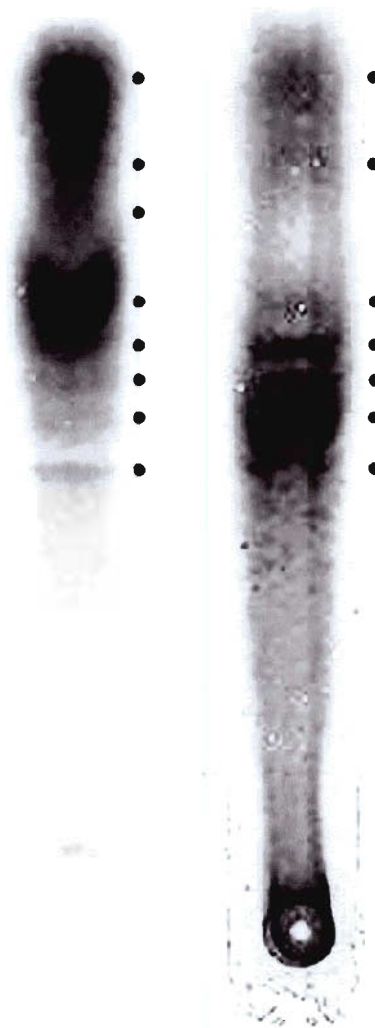


Figura 14 - Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de hidrólise de laminarina por LAM_P. Raia 1 - Produtos de LAM_P. Raia 2 - Hidrolisado de pachyman.

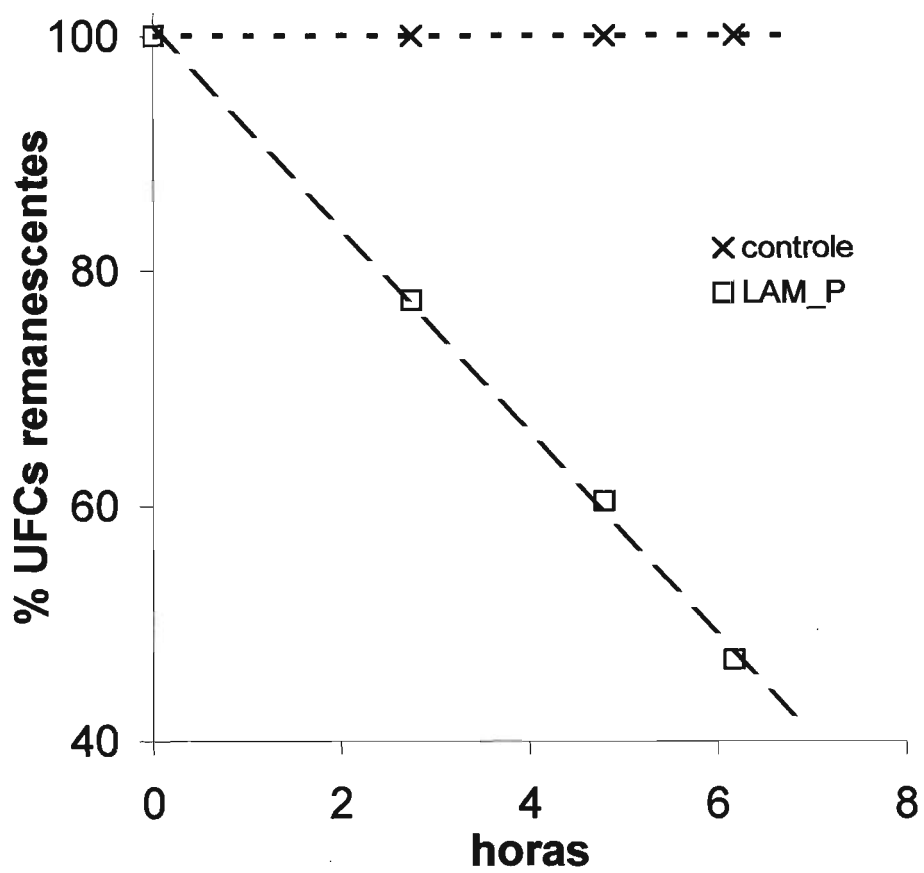


Figura 15 - Lise de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio hipotônico após incubação com a enzima LAM_P purificada.

3.5. Purificação da laminarinase de *Abracris flavolineata*.

O regurgitado de adultos do gafanhoto *Abracris flavolineata* possui uma significativa atividade sobre laminarina (7 mU por microlitro e 168 mU por miligrama de proteína). Essa atividade (350 mU por animal, se considerarmos que a partir de uma fêmea são coletados 50 microlitros de regurgitado) é comparável, em quantidade e em atividade específica, à atividade observada em adultos de *Periplaneta americana* (tabelas 5 e 6), o que indica que essa enzima possivelmente tem um papel digestivo à semelhança do observado nesse inseto. O ensaio de atividade sobre laminarina após eletroforese revelou que o regurgitado de *A. flavolineata* possui três enzimas com atividade sobre laminarina, sendo uma delas majoritária (figura 16 raia 2).

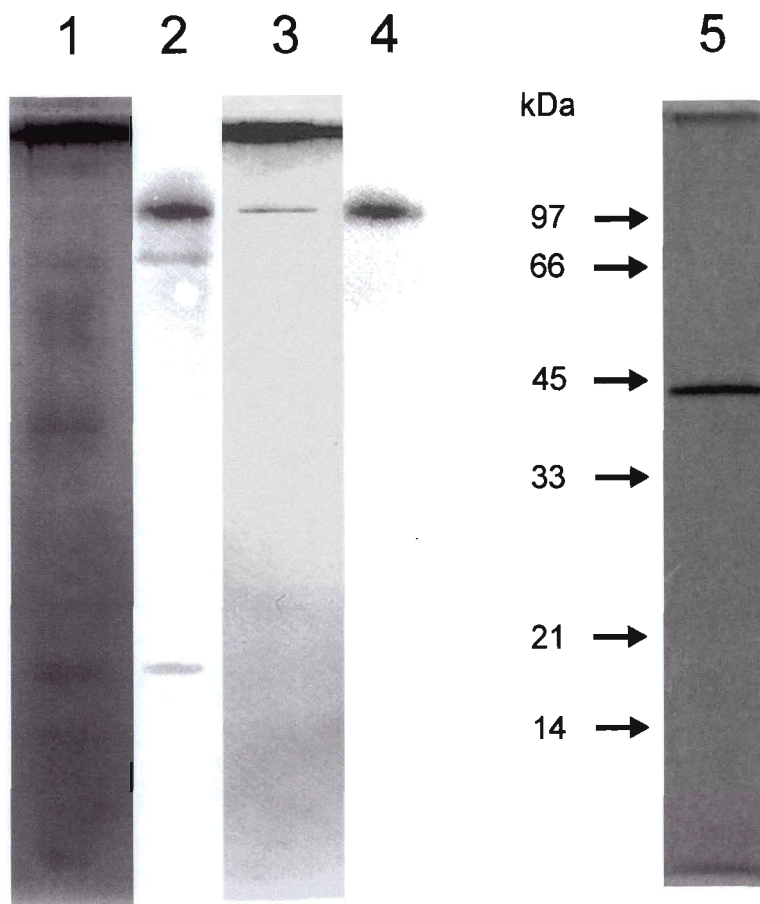


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida. Raias 1 a 4, eletroforese nativa em gel de poliacrilamida 12% contendo laminarina 1%. Raia 5, SDS-PAGE (poliacrilamida 12%). Raias 1 e 2, regurgitado de *Abracris flavolineata*. Raias 3 a 5, material LAM_A. As raias 1, 3, e 5 foram coradas com prata para visualização de proteínas. As raias 2 e 4 foram coradas com cloreto de trifeniltetrazólio para visualização de grupos redutores após incubação do gel a 30°C (atividade de laminarinase). As setas indicam a migração dos padrões de massa molecular no SDS-PAGE

Submetendo o regurgitado a uma seqüência de três cromatografias, foi possível purificar a laminarinase digestiva majoritária do inseto (LAM_A). A marcha de purificação (figura 17) consiste de uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão (figura 17A) seguida de uma cromatografia de troca iônica e de uma cromatografia de filtração em gel em sistema de alta pressão (FPLC; figuras 17B e 17C, respectivamente). O SDS-PAGE do material recolhido após a cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12 revela a existência de um único polipeptídeo com cerca de 45 kDa (figura 16 raia 5), massa molecular compatível com a observada na cromatografia (45 kDa). Isso indica que essa laminarinase é uma proteína monomérica. O ensaio de atividade sobre laminarina após eletroforese nativa do material após a purificação revela apenas uma banda de atividade (figura 16 raia 3), coincidente com a banda de proteína e com a atividade majoritária do regurgitado (figura 16, respectivamente raias 4 e 2). A recuperação e o enriquecimento da atividade sobre laminarina após cada passo da purificação encontram-se listados na tabela 13. É possível que as atividades minoritárias observadas após a eletroforese do regurgitado correspondam ao pico de atividade minoritário observado após a cromatografia em coluna EconoPacHighQ (frações 10 a 12, figura 17A). Esse material não foi estudado em detalhe.

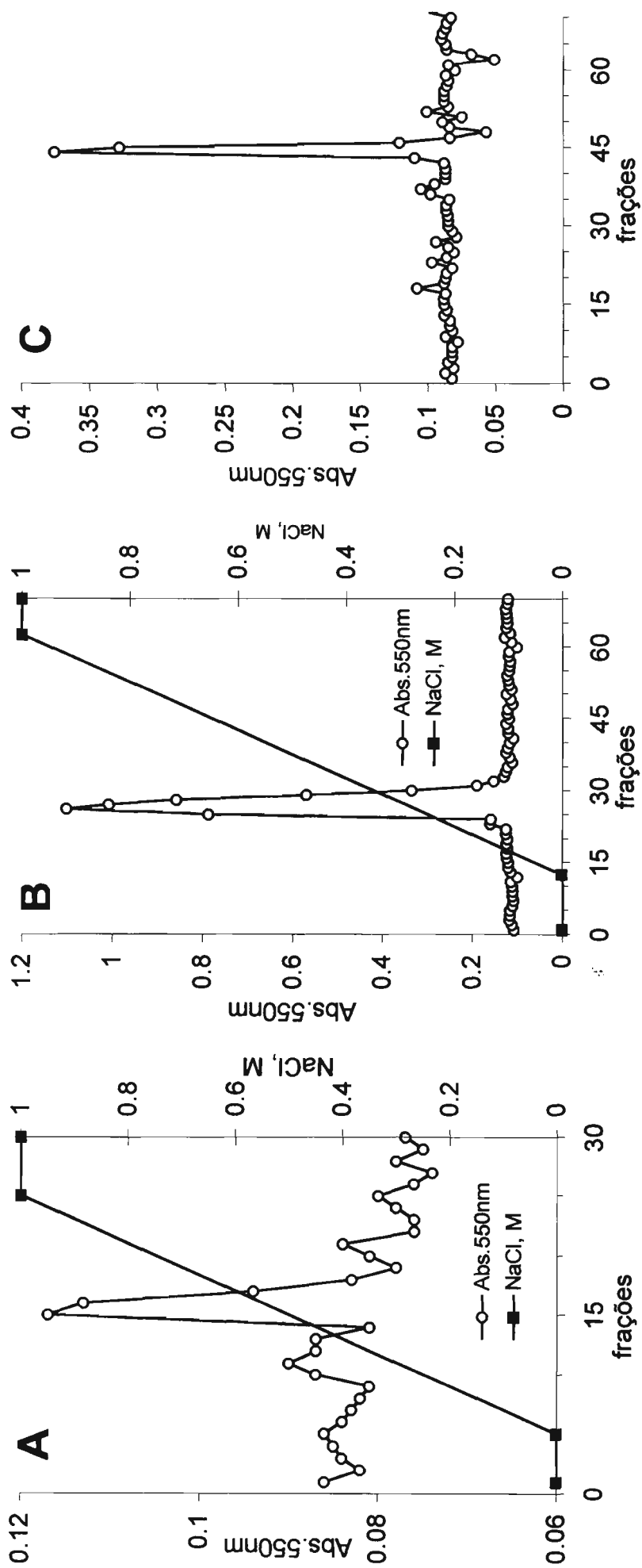


Figura 17 - Marcha de purificação da laminarinase majoritária de *Abraxis flavolineata*. A) Cromatografia em coluna Econo Pac HighQ da fração solúvel do regurgitado. Frações recolhidas: 15 a 17. B) Cromatografia em coluna Resource Q do material recolhido na cromatografia A. Frações recolhidas: 25 a 28. C) Cromatografia em coluna Superose 12 do material recolhido na cromatografia B. Frações recolhidas: 44 e 45 (material LAM_A).

Tabela 13 - Recuperação e enriquecimento da atividade sobre laminarina ao longo da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva majoritária do regurgitado de *A. flavolineata*.

	Atividade (mU) mU/mg Enriquecimento (x)		
Fração solúvel	147	168	1
Econo Pac HighQ	57	218	1,3
Resource Q	31	407	2,4
Superose 12	27	1890	11,2

3.6. Caracterização da laminarinase digestiva de *Abracris flavolineata*.

O pH ótimo da laminarinase de *A. flavolineata* (LAM_P) ao atuar sobre laminarina é 6. Essa enzima também é capaz de hidrolisar β 1-3,1-4 glucanas como liquenana e a β -glucana de *Hordeum vulgare*, embora com menos eficiência - respectivamente 81% e 36% da atividade sobre laminarina (dados não apresentados). Uma análise anterior dos produtos liberados por LAM_A (Dumont, Genta, Marana, Terra, Ferreira, dados não publicados) já havia demonstrado que glicose (61 %) e laminaribiose (39 %) são os únicos produtos liberados por essa enzima, o que indica fortemente que LAM_A é uma exo-glucanase. Pôde-se verificar, através da resposta da Glicose-Oxidase à fervura dos produtos de reação liberados por LAM_A, que essa enzima libera glicose

na configuração anomérica β , ou seja, mantendo a configuração anomérica das ligações presentes no substrato (figura 18).

O tratamento da laminarina com periodato e borohidreto (destruição das pontas redutoras e não redutoras do substrato, ver figura 7) leva a uma diminuição da atividade de LAM_A sobre esse polissacarídeo (figura 19), o que corrobora a indicação de que essa enzima é uma exo-glucanase. LAM_A atua ao atacar a ponta não redutora do substrato, visto que a simples destruição da ponta redutora (tratamento com borohidreto) não afeta a atividade da enzima. É bastante singular a coincidência de valores entre a perda de atividade com a destruição das pontas do polissacarídeo (64 %) e o percentual de glicose em relação ao total de produtos liberados pela enzima ao atuar sobre o substrato intacto (61%). LAM_A parece ser incapaz de clivar a primeira ligação glicosídica a partir da ponta não redutora do substrato modificado, mas retém completamente a capacidade de hidrolisar a segunda ligação (figura 19).

Durante a obtenção de parâmetros cinéticos para LAM_A, observamos que essa enzima apresenta-se fortemente inibida por concentrações elevadas do substrato (figura 20). À semelhança do observado para LAM_P, apenas dois dos modelos cinéticos testados ajustaram-se adequadamente aos dados obtidos (figura 11). Os parâmetros cinéticos para a hidrólise de laminarina de acordo com cada um dos modelos estão expostos na tabela 14. A constante de Michaelis de LAM_A para a hidrólise da β -1,3-1,4-glucana de *H. vulgare* é 0,8% (p/v), sendo que esse substrato não inibe a enzima em altas concentrações (dados não apresentados).

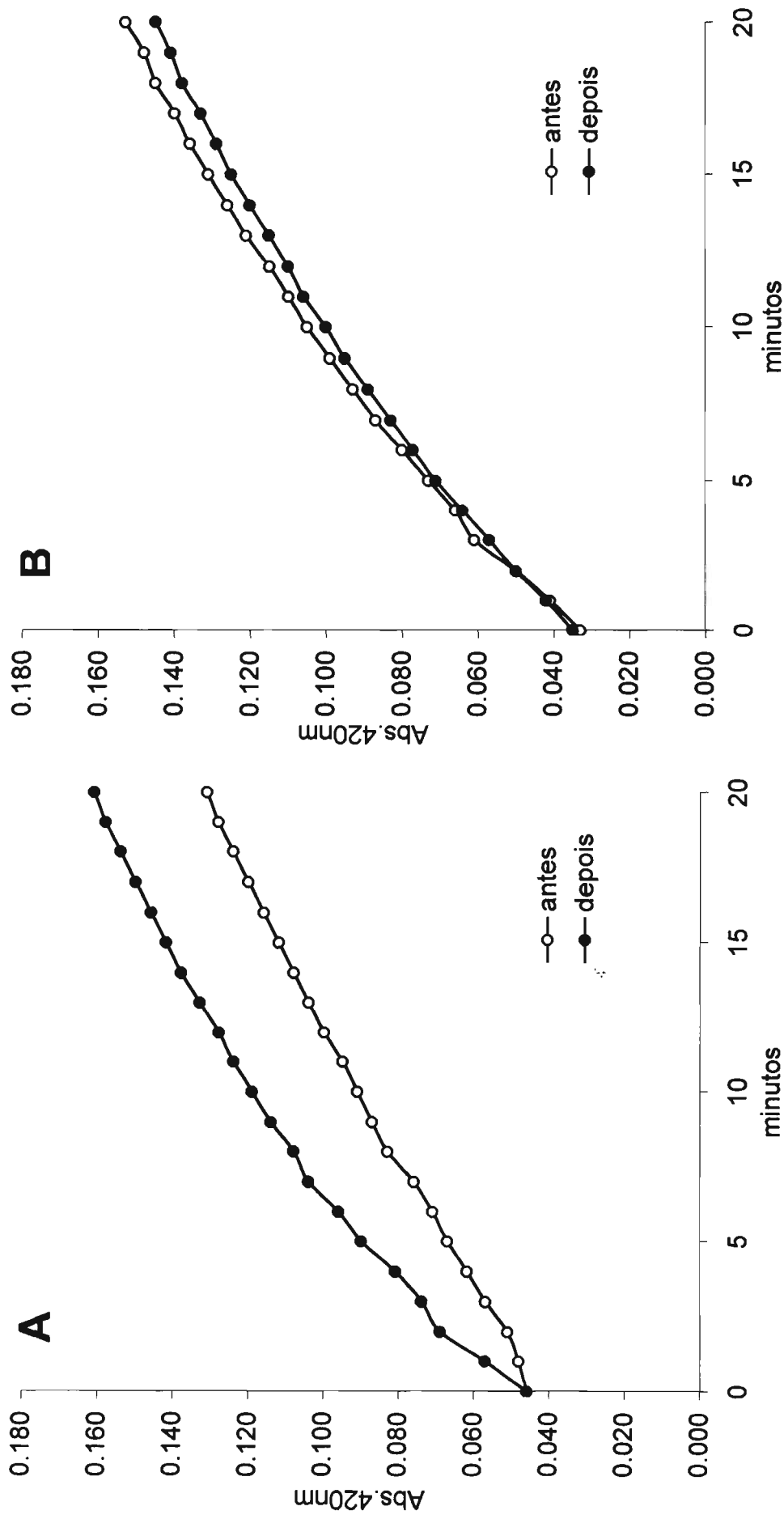


Figura 18 - Resposta do reagente Tris-Glicose Oxidase (TGO) à fervura de uma solução controle de glicose (A) e aos produtos de reação de LAM_A com laminarina (B).

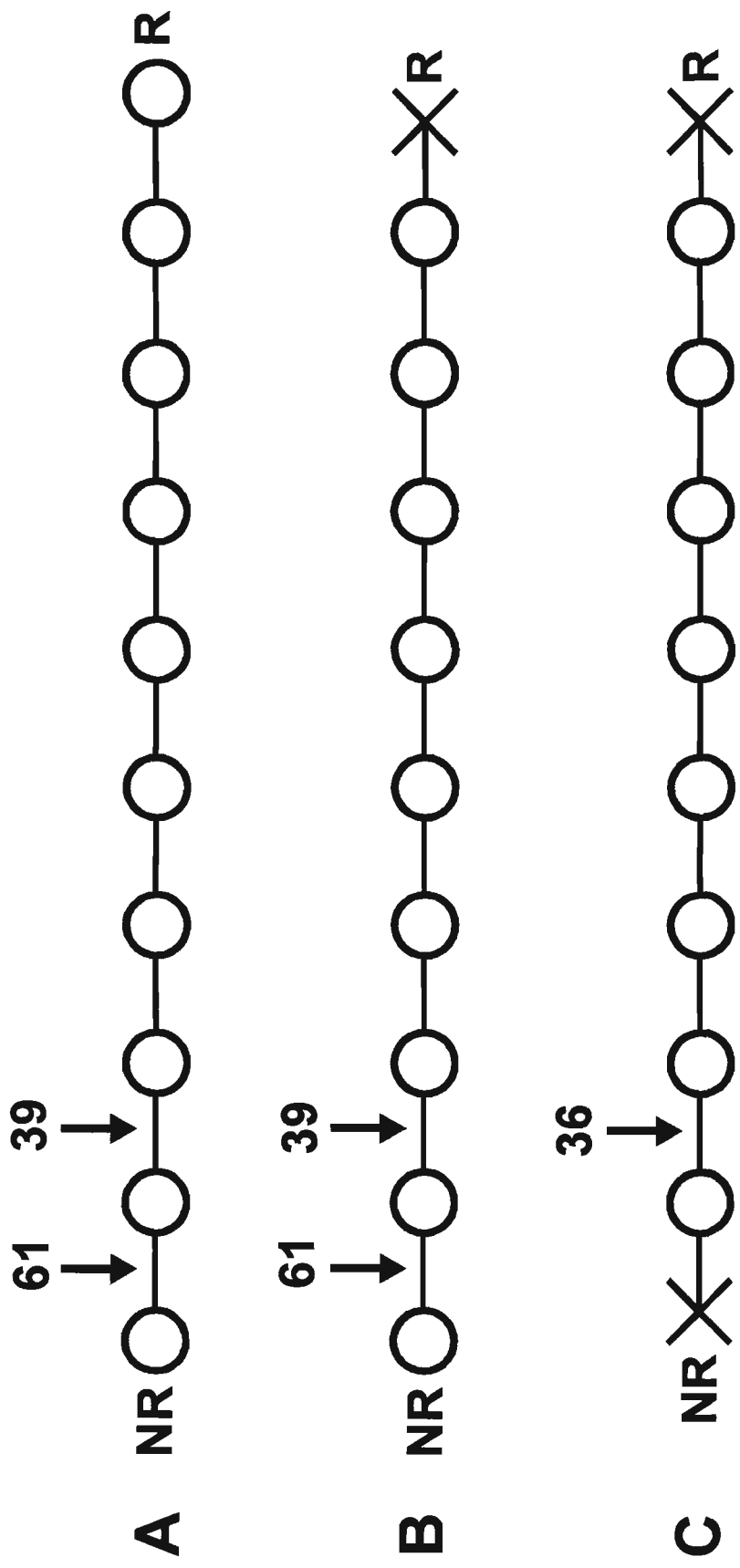


Figura 19 - Eficiência relativa (em relação ao total de ligações hidrolisadas no controle A) de hidrólise por LAM_A de diferentes ligações glicosídicas presentes em A) laminarina B) laminarina tratada com borohidreto C) laminarina tratada com periodato e borohidreto.

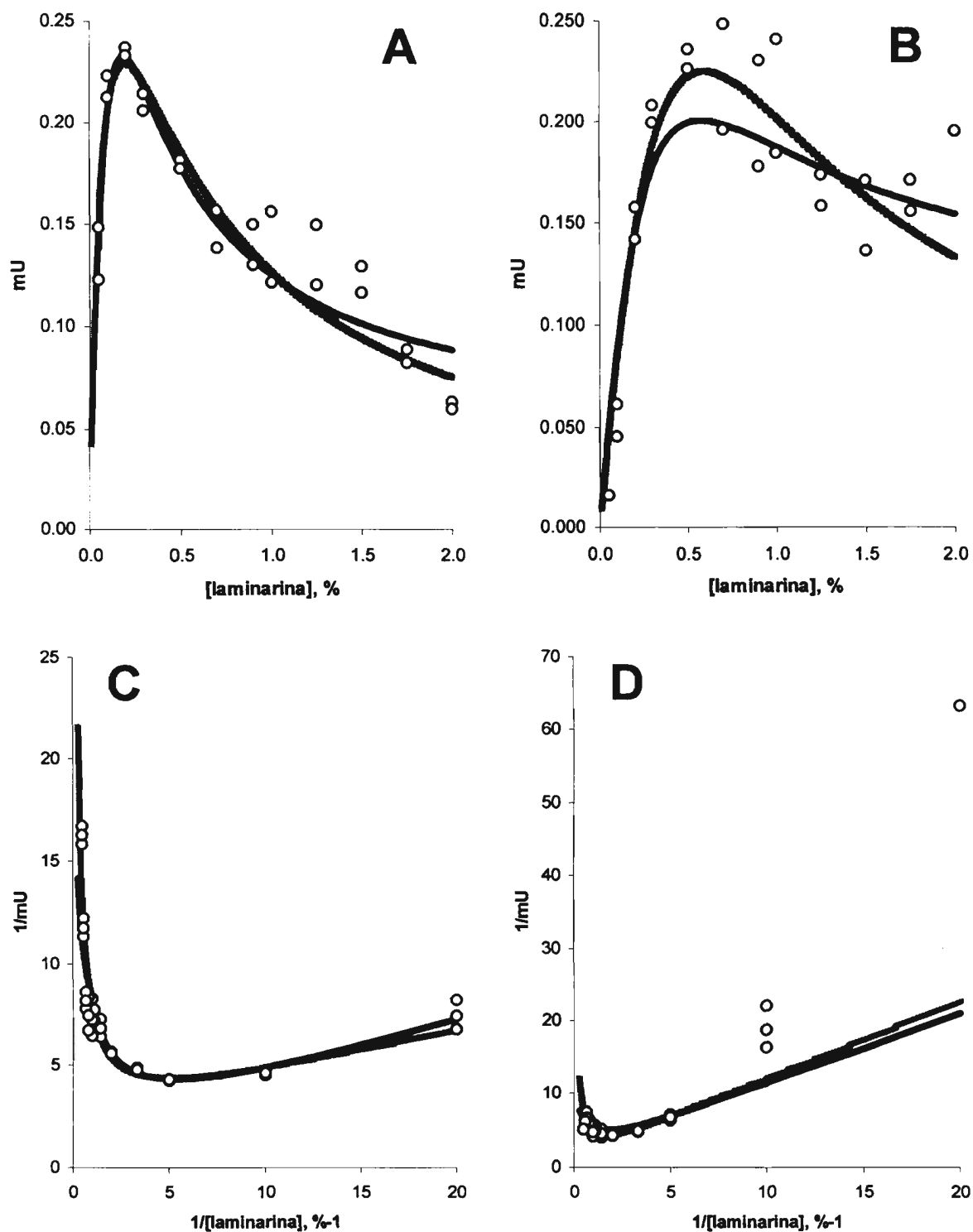


Figura 20 - Efeito da concentração de laminarina na velocidade de produção de glicose e laminaribiose por LAM_A. A) Plote de Michaelis para a formação de glicose. B) Plote de Michaelis para a formação de laminaribiose. C) Plote de Lineweaver-Burk para a formação de glicose. D) Plote de Lineweaver-Burk para a formação de laminaribiose. Os círculos são dados experimentais e as linhas contínuas são curvas teóricas traçadas de acordo com as constantes cinéticas calculadas pelo método dos mínimos quadrados segundo o modelo I (linha clara) ou o modelo II (linha escura).

Tabela 14 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_A estimados de acordo com os modelos da figura 10.

	Produção de Glicose		Produção de Laminaribiose	
	modelo I	modelo II	modelo I	modelo II
K_M (%)	0,096±0,015	0,47*	1,4±0,2	0,76*
K_i (%)	0,40±0,06	0,4±0,1	0,24±0,05	3,8±1,7
K_p (s ⁻¹)	6,1±0,5	22,3*	17,7±2,7	10,3*
α	-	0,025±0,004	-	0,9±0,3
β	-	0,027±0,006	-	0,12±0,04

* Valores de K_p e V_m determinados pela assíntota à curva. Os desvios dessas determinações não ultrapassaram 3% e 35%, respectivamente.

A inibição de LAM_A por laminarina foi estudada em mais detalhe. Para testar a hipótese de que essa inibição seja o resultado de transglicosilações realizadas pela enzima - situação compatível com o modelo cinético 1 da figura 11, grandes quantidades de laminariitol (laminarina reduzida com periodato e oxidada com borohidreto) foram produzidas com o objetivo de estudar em detalhe a cinética de hidrólise desse substrato por LAM_A. Imaginamos que, com a destruição das pontas não redutoras do polissacarídeo, a capacidade da molécula de laminarina de participar em uma possível reação de

transglicosilação catalisada por LAM_A, como aceptora de uma nova ligação glicosídica, seja afetada.

Como a inibição por altas concentrações de laminarina não é afetada após a destruição das pontas não-redutoras do substrato (figura 21), é improvável que essa inibição seja o resultado de reações de transglicosilação, sendo provavelmente o resultado da formação de complexos não-produtivos entre LAM_A e moléculas de laminarina.

A formação de glicose a partir de laminariitol indica que LAM_A possui processividade sobre esse substrato, sendo uma exo-glucanase com mecanismo de cadeia única, pois nesse caso a glicose tem que ser gerada a partir de porções internas da cadeia (ver Discussão).

A razão entre os dois produtos formados por LAM_A (glicose/laminaribiose) cai abruptamente nas altas concentrações de substrato aonde a enzima encontra-se inibida (figura 22). O mecanismo de inibição, dessa forma, parece estar relacionado a uma diminuição preferencial da produção de glicose.

A participação de grupos prototrópicos na catálise de LAM_A foi estudada através da obtenção de parâmetros cinéticos (de acordo com o modelo I da figura 11) em diferentes valores de pH. Os resultados obtidos estão expostos na figura 23. Podemos observar que LAM_A possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise. Os valores de pK calculados são de $4,34 \pm 0,03$ e $8,59 \pm 0,03$ na enzima livre e $3,45 \pm 0,05$ e $8,71 \pm 0,04$ no complexo enzima-substrato. Também podemos verificar que LAM_A possui dois grupos

prototrópicos envolvido no mecanismo de inibição pelo substrato - os valores de pKs obtidos são de $5,64 \pm 0,03$ e $8,55 \pm 0,03$.

Tentou-se verificar a natureza dos resíduos de aminoácidos de LAM_A envolvidos no reconhecimento do substrato e catálise através de modificação química com os reagentes específicos apresentados na tabela 4 (Item 2.14. de Material e Métodos). Os resultados obtidos nos experimentos de modificação química estão expostos nas figuras 24 (pHMB; p-hidroximercuribenzoato), 25 (EGTA; ácido N,N,N',N'-etileno-glicol-bis-(éter- β -amino-etílico)-tetraacético), 26 (DPC; dietilpirocarbonato), 27 (TNM; tetranitrometano). Os resultados obtidos em todas as modificações realizadas estão resumidos na tabela 15.

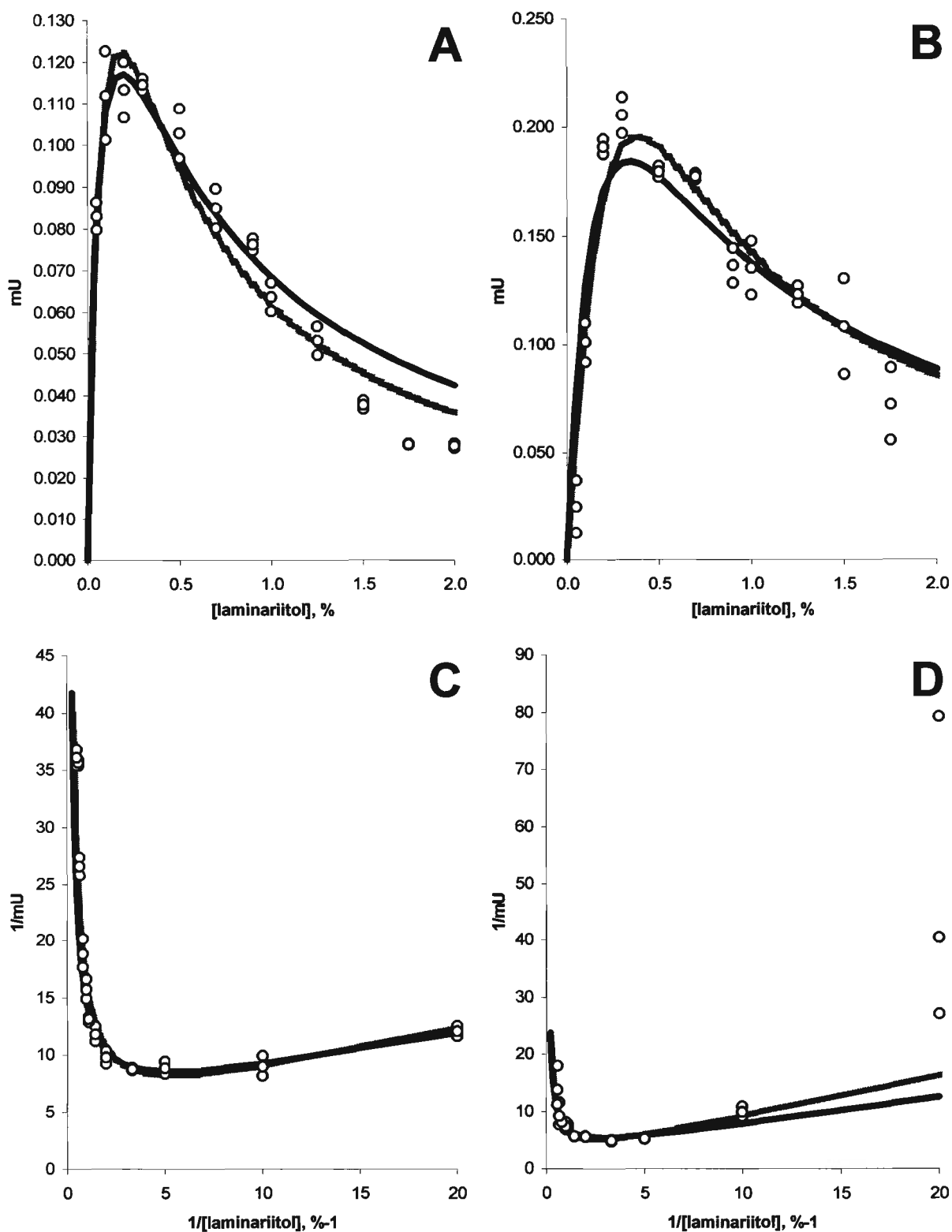


Figura 21 - Efeito da concentração de laminariitol na velocidade de produção de glicose e laminaribiose por LAM_A. A) Plote de Michaelis para a formação de glicose. B) Plote de Michaelis para a formação de laminaribiose. C) Plote de Lineweaver-Burk para a formação de glicose. D) Plote de Lineweaver-Burk para a formação de laminaribiose. Os círculos são dados experimentais e as linhas contínuas são curvas teóricas traçadas de acordo com as constantes cinéticas calculadas pelo método dos mínimos quadrados segundo o modelo I (linha clara) ou o modelo II (linha escura).

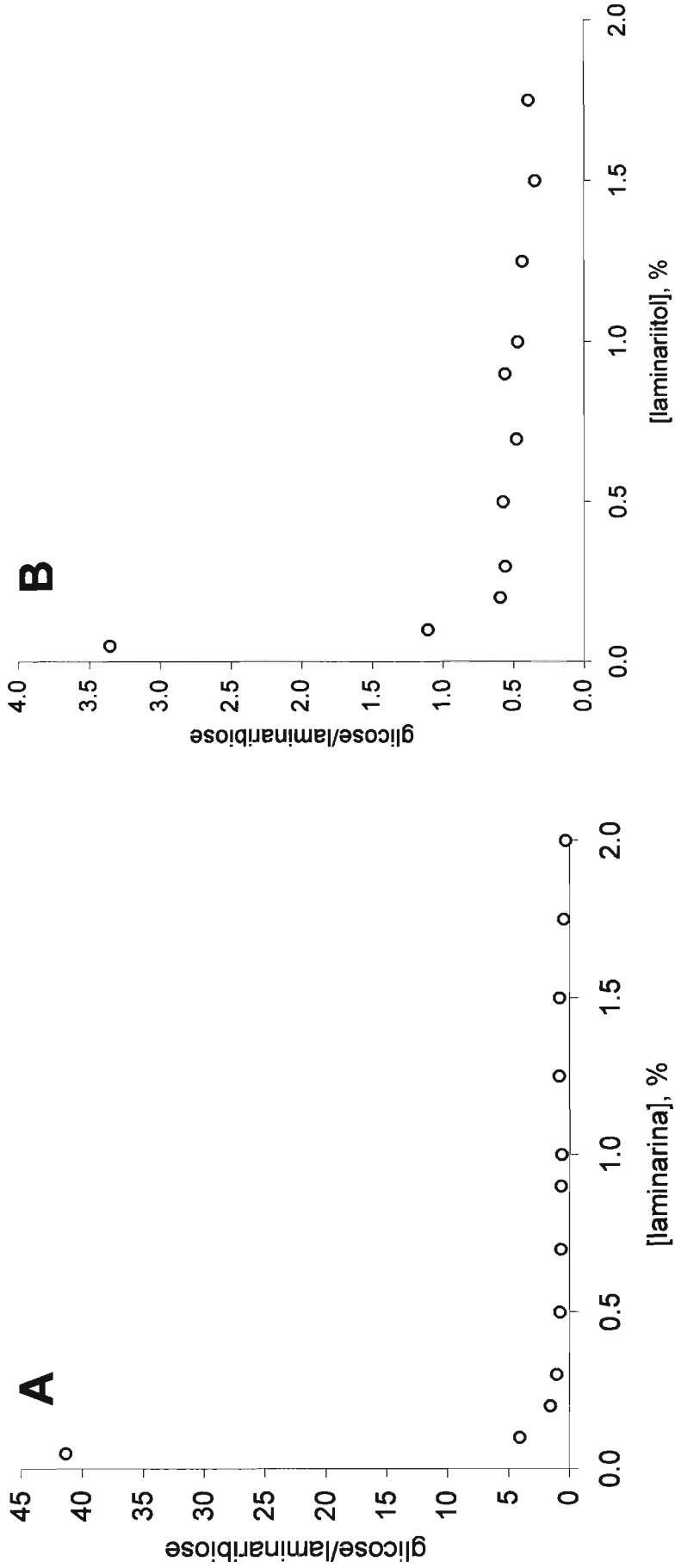


Figura 22 - Variação da razão entre as velocidades de produção de glicose e de laminaribiose por LAM_A em função da concentração de substrato. A) Ensaio sobre laminarina. B) Ensaio sobre laminariitol.

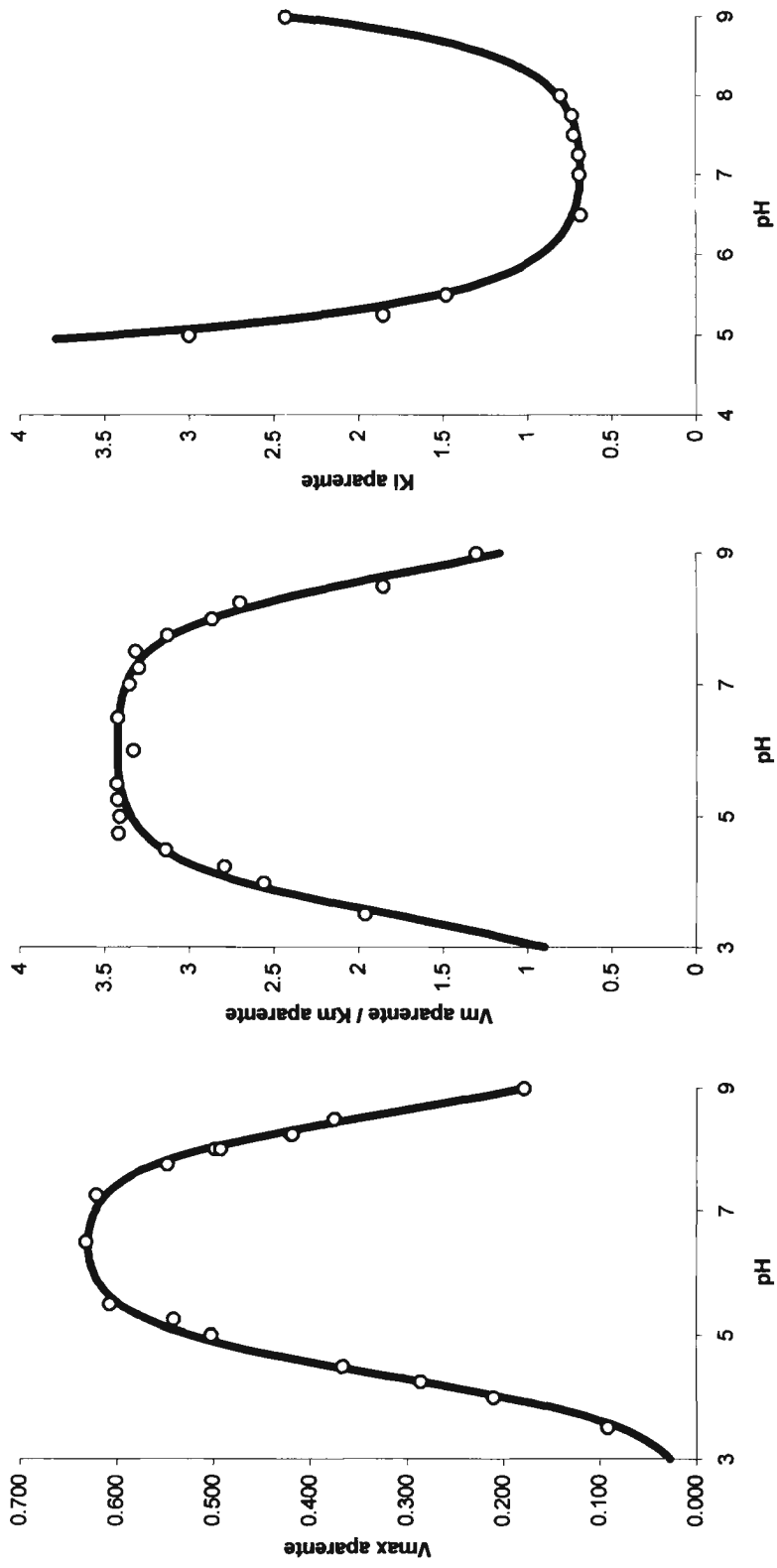


Figura 23 - Efeito do pH sobre os parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_A. A) Velocidade máxima aparente. B) Razão entre velocidade máxima aparente e constante de Michaelis aparente. C) Constante de inibição. Os círculos são dados experimentais e as linhas contínuas são curvas teóricas traçadas de acordo com as constantes cinéticas calculadas pelo método dos mínimos quadrados (ver Material e Métodos).

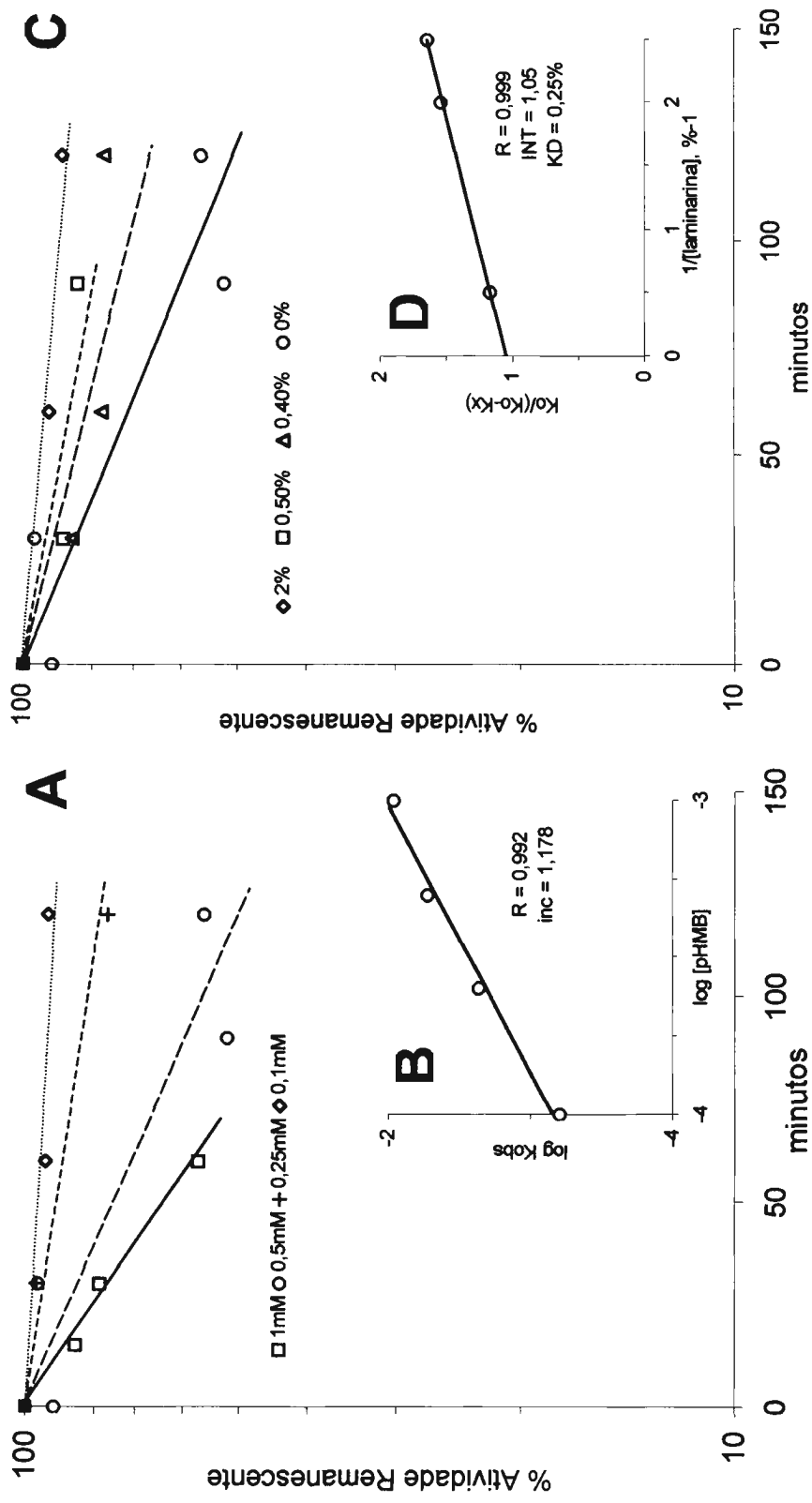


Figura 24 - Modificação química de LAM_A na presença de p-hidroxi-mercúrio-benzoato (pHMB). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de pHMB. B) Determinação da ordem de reação entre LAM_A e pHMB. C) Modificação na presença de pHMB 0,5mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Determinação da constante de dissociação (Kd) entre LAM_A e laminarina.

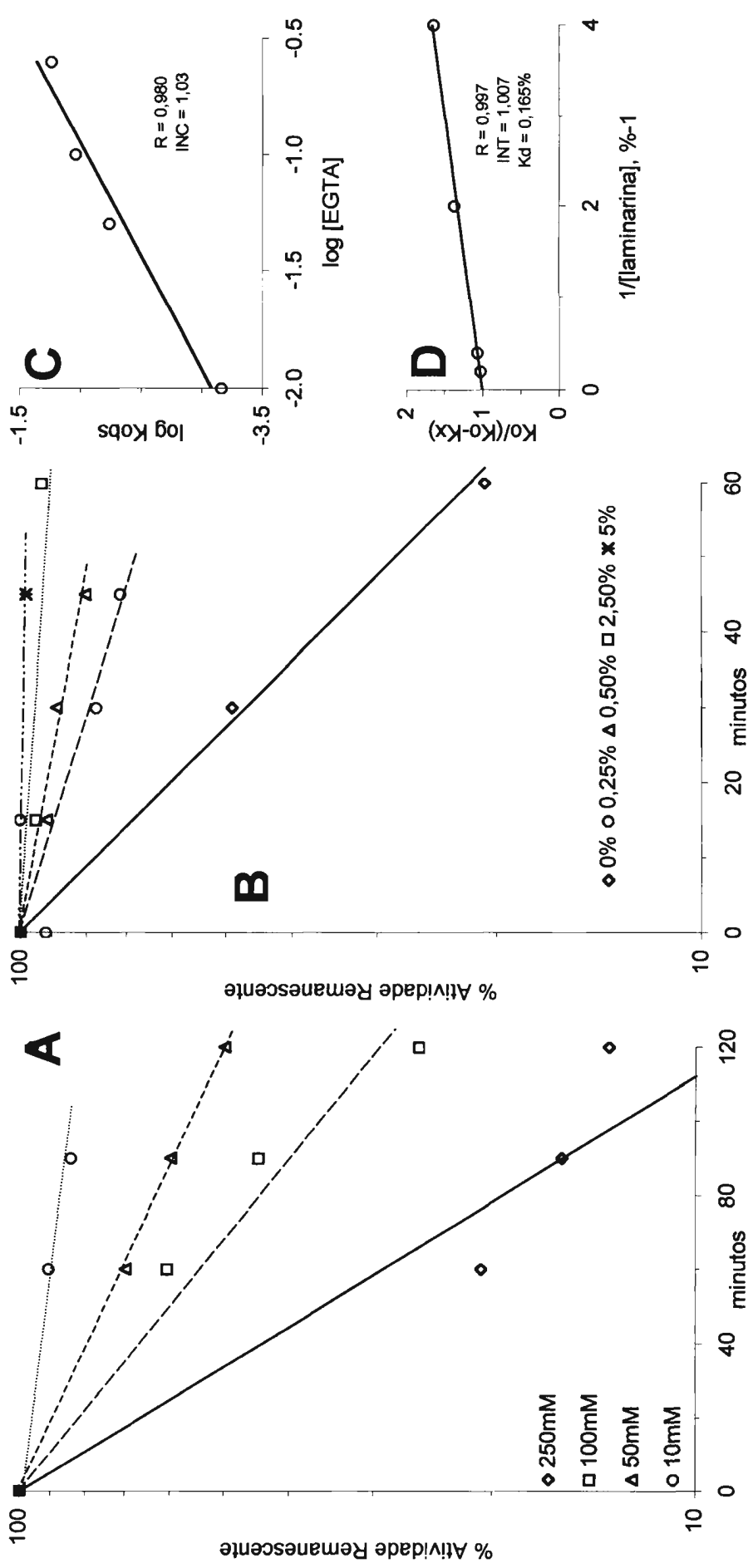


Figura 25 - Modificação química de LAM_A na presença de ácido N,N,N',N'-etileno-glicol-bis-(éter-β -amino-etílico)-tetraacé (EGTA). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de EGTA. B) Modificação na presença de EGTA 250mM e diferentes concentrações de laminarina. C) Determinação da ordem de reação entre LAM_A e EGTA. D) Determinação da constante de dissociação entre LAM_A e laminarina.

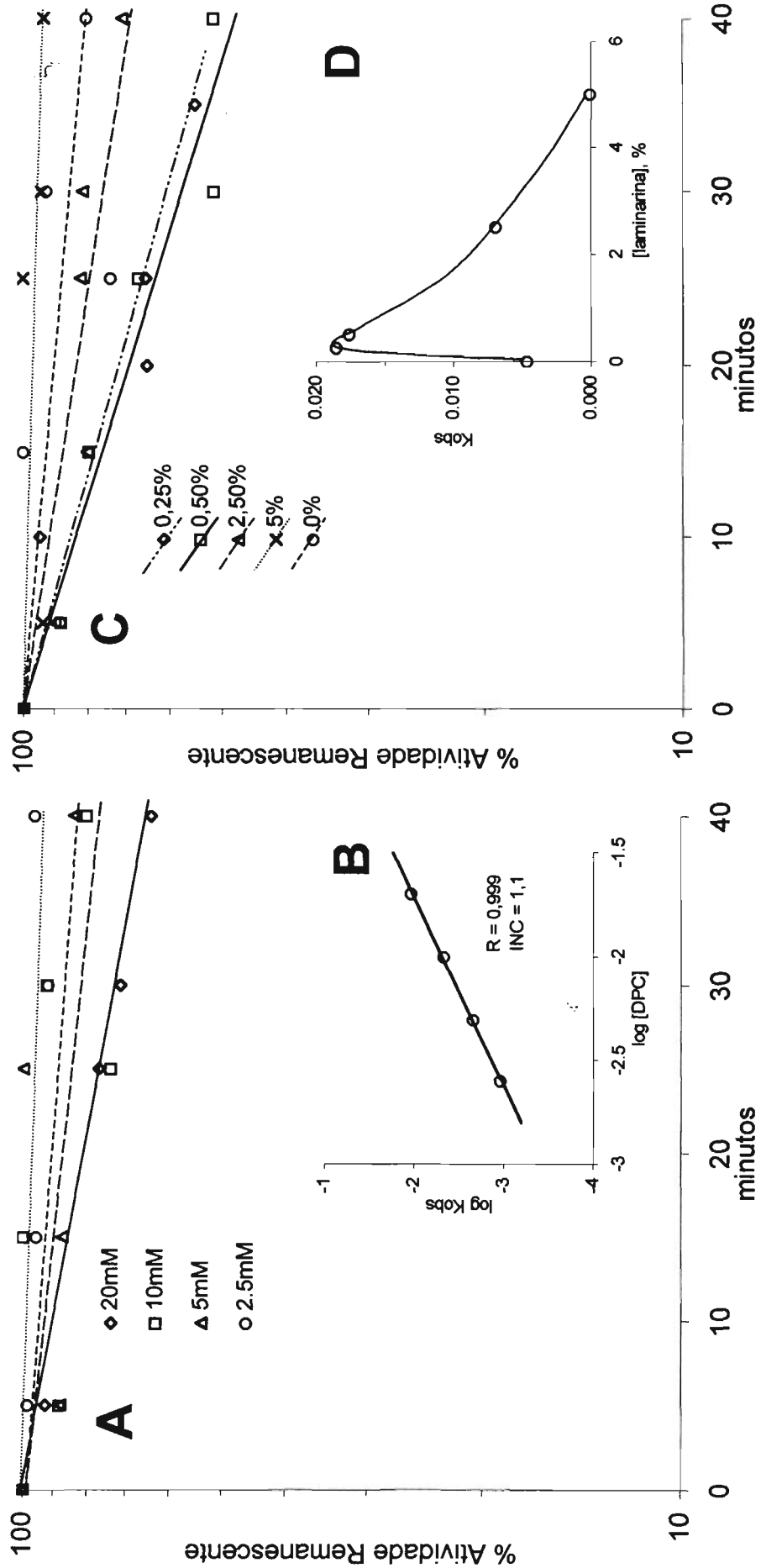


Figura 26 - Modificação química de LAM_A na presença de dietilpirocarbonato (DPC). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de DPC. B) Determinação da ordem de reação entre LAM_A e DPC. C) Modificação na presença de DPC 10mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Variação da constante de inativação em função da concentração de laminarina.

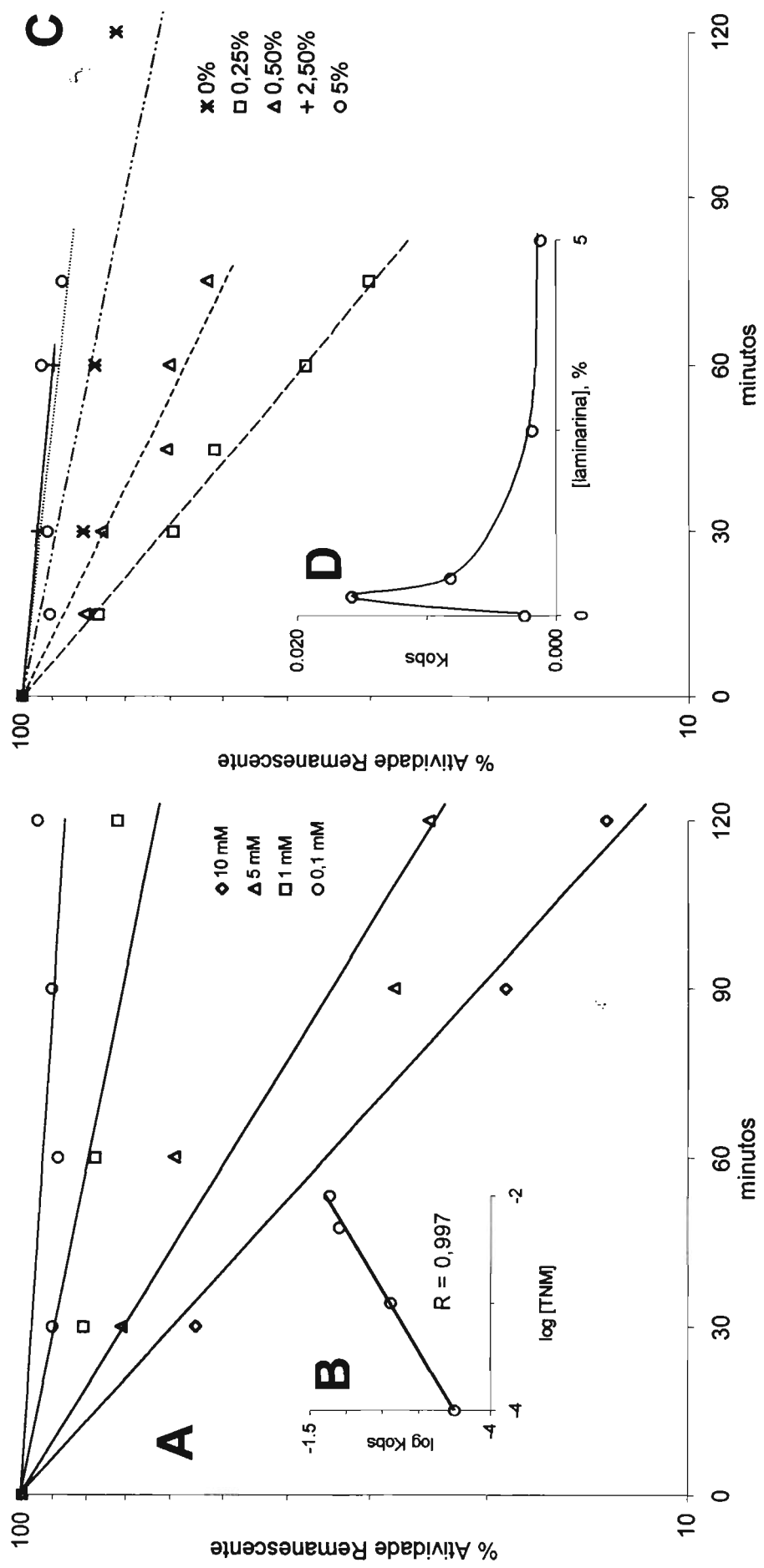


Figura 27 - Modificação química de LAM_A na presença de tetranitrometano (TNM). A) Modificação de LAM_A na presença de diferentes concentrações de TNM. B) Determinação da ordem de reação entre LAM_A e TNM. C) Modificação de LAM_A na presença de TNM 1mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Variação da constante de inativação (Kobs) em função da concentração de laminarina.

Tabela 15 - Parâmetros relativos à modificação química de LAM_A com reagentes específicos. K_D - constante de dissociação do complexo enzima-substrato quando esse protege a enzima da modificação.

modificador	Resíduo / grupo modificado	% Atividade Remanescente	Ordem de reação	K_D proteção (%)	K_M (%)
DPC	Histidina	60	1,1	***	
pHMB	Cisteína	40	1,18	0,25	0,25
EGTA	Cátions divalentes (Ca^{+2})	10	1,03	0,165	0,18
TNM	Tirosina	10	0,89	***	

LAM_A não possui resíduos de arginina ou triptofano envolvidos em catálise, pois não perde atividade com a exposição aos reagentes fenilgloxal e N-bromosuccinimida (dados não apresentados). A perda de atividade com a exposição aos reagentes dietilpirocarbonato, p-hidroximercuribenzoato, EGTA e tetranitrometano (tabela 15) indica que LAM_A possui resíduos de histidina, cisteína e tirosina, além de um íon divalente, envolvidos em catálise. Em todas essas reações de modificação observou-se uma ordem de modificação próxima a um - significando que a reação de apenas um desses grupos acima leva a inativação da enzima.

O resíduo de cisteína modificado por p-hidroximercuribenzoato e o íon divalente quelado por EGTA provavelmente se encontram nas imediações do sítio ativo da enzima, pois a molécula de laminarina é capaz de proteger a enzima completamente dessas inativações. Além disso, as constantes de dissociação estimadas entre a enzima e a molécula de laminarina quando essa se liga à enzima de maneira a protegê-la dessas inativações (K_D) são muito semelhantes às constantes de Michaelis de LAM_A para laminarina nas condições de inativação (tabela 15).

A inativação de LAM_A frente aos modificadores dietilpirocarbonato e tetranitrometano na presença de laminarina (figuras 26 e 27) sugere que os resíduos de histidina e tirosina modificados talvez se encontrem nas imediações do sítio ativo. Em concentrações menores de laminarina (até 0,25%), observa-se uma maior exposição desses resíduos aos modificadores, enquanto que em altas concentrações do substrato observamos uma proteção total desses resíduos. Esse comportamento sugere a existência de um segundo sítio de ligação do substrato diferente do sítio ativo.

3.7. Atividades β -glucanásicas no tubo digestivo de *Tenebrio molitor*.

O tubo digestivo de larvas de *T. molitor* possui atividades hidrolíticas sobre diferentes β -glucanas (tabela 16), com uma proeminente atividade sobre laminarina (β -1,3-glucana). A atividade de laminarinase encontrada no intestino do inseto dificilmente poderia ser originada do alimento ingerido, pois, para que isso ocorresse, o inseto teria que concentrar as enzimas presentes em uma massa de farelo de trigo muito maior do que a massa de seu tubo digestivo (ver tabela 16).

Tabela 16 - Atividades de hidrolases presentes em massa iguais (peso úmido) de farelo de trigo e tubos digestivos de *Tenebrio molitor*.

Substrato	Farelo de Trigo (mU/20mg)	<i>T. molitor</i> (mU/ animal)
CMC	0,6	1
Liquenana	1,4	19
Laminarina	2	52

As atividades de laminarinase, liquenase e carboximetilcelulase, à semelhança do que ocorre para a atividade de β -glicosidase, são solúveis e se concentram na porção anterior do ventrículo (ver tabela 17). Dessa maneira, é improvável que essas enzimas sejam originadas da flora intestinal presente no intestino posterior.

Contudo, o ventrículo de larvas de *T. molitor* possui uma flora intestinal bacteriana bastante populosa, além de um grande número de simbioses (protozoários do tipo gregarinas) associados ao epitélio intestinal. Com o objetivo de determinar se a flora intestinal é responsável pela secreção das enzimas encontradas no ventrículo do animal, foram criadas em condições estéreis larvas do inseto, a partir de ovos cuja superfície foi esterilizada com o oxidante e detergente hospitalar Virkon (Antecint, Reino Unido).

Como a dieta utilizada para a criação dos insetos teria de ser autoclavada duas vezes, e isso poderia levar à degradação de nutrientes essenciais, optamos por utilizar uma dieta mais rica do que a dieta normalmente usada nas nossas criações do inseto (farelo de trigo). Em condições normais (controles), os tenébrios criados nessa dieta, uma mistura composta de farelo de trigo, ração para frangos, farinha de trigo e farinha de aveia, desenvolveram-se muito mais rapidamente (2 meses) do que os criados apenas em farelo de trigo (6 meses). Contudo, os tenébrios criados em dieta esterilizada demoraram cerca de 3 meses para atingir o último ínstar.

Tabela 17 - β -glucanases, β -glicosidase e quantidade de proteína presente em diferentes partes do tubo digestivo (epitélio e conteúdo) de larvas de *T. molitor*.

Substrato	Intestino			
	Intestino Anterior	Ventrículo Anterior	Ventrículo Posterior Intestino Posterior	
CMC	6 (23)	66 (8)	22 (9)	6 (5)
Liquenana	3 (41)	79 (31)	17 (24)	2 (4)
Laminarina	3 (50)	80 (55)	16 (42)	1 (3)
Celobiose	1 (72)	83 (151)	15 (101)	1 (5)
Proteína (mg/animal)	0,02	0,67	0,18	0,13

Os resultados são a atividade relativa expressa como a porcentagem em relação à soma das atividades encontradas nas diferentes partes do tubo digestivo. As atividades específicas (entre parênteses) estão expressas em mU/mg proteína. Os dados são o resultado do ensaio de quatro preparações diferentes com 10 animais cada. O desvio padrão da média variou entre 5-20% da média.

O plaqueamento em meios de cultura sólido do homogeneizado do ventrículo de larvas criadas em condições estéreis permitiu constatar que essas larvas de fato não possuíam flora intestinal bacteriana ou fúngica (tabela 18). Em alguns tubos, acompanhou-se o desenvolvimento do inseto até a forma adulta, o que permitiu descartar um papel essencial da flora intestinal do inseto em seu desenvolvimento, pelo menos ao ser alimentado com uma dieta rica em nutrientes.

Tabela 18 - Números de Unidades Formadoras de Colônia relativos a bactérias e fungos presentes no intestino médio de larvas de *T. molitor* controles ou criadas em condições estéreis.

	bactérias	fungos
larvas controle	590.000±440.000	36±25
larvas criadas em ambiente estéril	0	0

As atividades de algumas enzimas digestivas no ventrículo de larvas estéreis são comparadas com as de insetos normais na tabela 19. Podemos verificar que, enquanto a atividade de amilase é muito semelhante entre os dois grupos de animais, as atividades de liquenase, carboximetilcelulase e lisozima diminuem nos insetos sem flora intestinal. Além disso, nos insetos experimentais as atividades de laminarinase, β -glicosidase e quitinase são

consideravelmente maiores do que as observadas nos insetos controles. Apesar das diferenças observadas nos níveis de expressão, a determinação das atividades enzimáticas acima nas larvas estéreis demonstra incontestavelmente que o epitélio do ventrículo de larvas de *T. molitor* é capaz de secretar ativamente essas enzimas.

Tabela 19 - Atividades enzimáticas (mU/animal) e proteína no ventrículo de larvas de *T. molitor* criadas em condições controles ou estéreis.

Substrato	Controles	Estéreis
CMC	0,35±0,05	0,29±0,04
pNφβGli	271±73	753±88
Liquenana	2,6±0,5	1,3±0,1
Laminarina	3,3±0,9	11,1±0,7
Amido Solúvel	141±34	147±31
M. lisodeikticus	3,9±0,8	1,1±0,2
Quitina Coloidal	1,3±0,5	5,8±0,4
proteína (mg/ animal)	7,6±0,3	7,9±0,7

O ensaio após eletroforese das proteínas do homogeneizado do ventrículo desses animais mostra (figura 28) que a amilase e as laminarinases encontradas nas larvas sem flora intestinal são idênticas às presentes nos

insetos controle. Nos insetos sem flora intestinal, pudemos observar uma maior expressão de β -glicosidases e liquenases com menor migração eletroforética (figura 28) do que as enzimas presentes nos insetos controle, e não foi possível detectar atividade sobre carboximetilcelulose após a eletroforese.

A composição proteica (analisada por SDS-PAGE) do ventrículo de larvas estéreis parece ser mais simples do que a composição proteica de larvas controle, com um menor número de proteínas expressas em grande quantidade (figura 28).

Não foi possível obter bons ensaios de atividade sobre CMC após a eletroforese dos homogeneizados de larvas controles ou estéreis. Isso ocorreu provavelmente porque a atividade inicial dos materiais era muito pequena. Para poder comparar as celulasas presentes em cada um desses materiais, determinamos os parâmetros cinéticos da hidrólise de liquenana e carboximetilcelulose por homogeneizados de larvas dos dois tipos de larvas. Obtiveram-se os resultados expostos na tabela 20. Podemos verificar que as celulasas presentes no ventrículo de larvas controle possuem uma preferência maior (V_{max}/K_m) sobre liquenana, e que as celulasas de insetos estéreis preferem carboximetilcelulose como substrato.

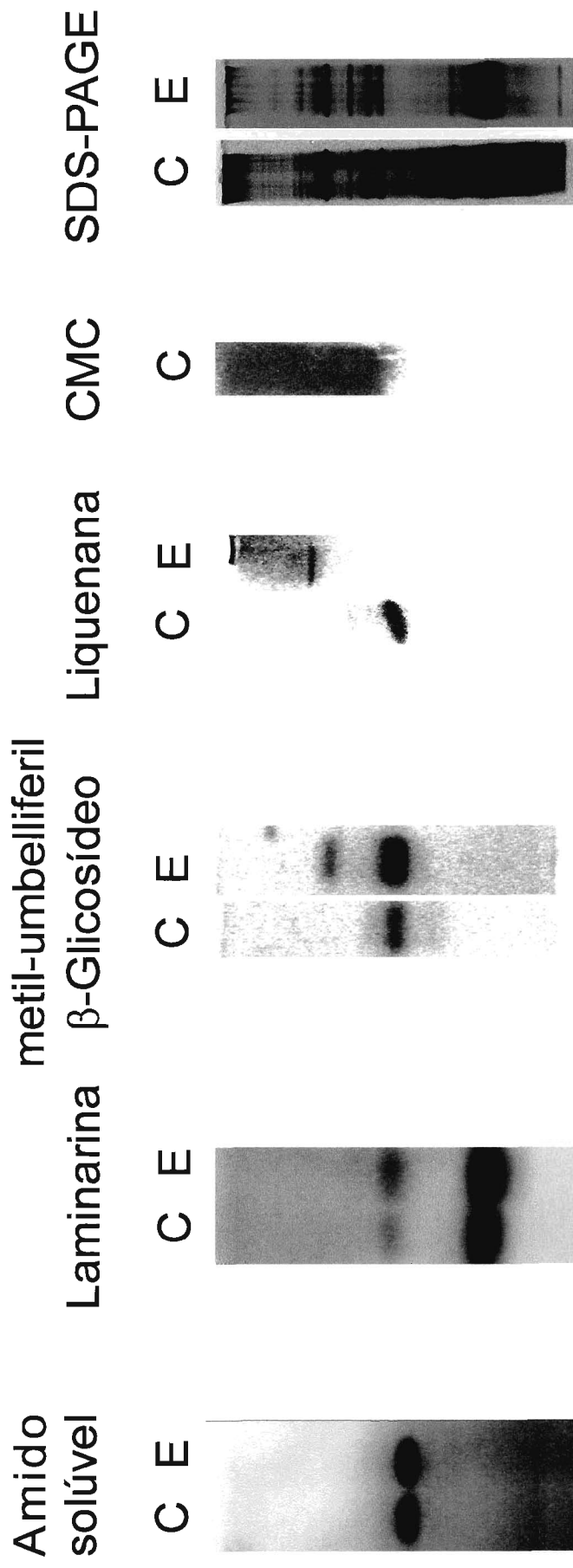


Figura 28 - Ensaio de atividade hidrolítica sobre diferentes substratos após eletroforese nativa em gel de poliacrilamida da fração solúvel do ventrículo de larvas de *T. molitor* criadas em condições controles ou estéreis. C-controles; E-estéreis. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (coloração com prata).

Tabela 20 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) e liquenana pela fração solúvel do ventrículo de larvas de *T. molitor* criadas em condições controle ou estéreis. E - eficiência catalítica (V_{max}/K_M). Os valores de Velocidade máxima estão expressos em mU/animal e os da constante de Michaelis em % (p/v).

	CMC		Liquenana		E_{CMC}/E_{LIQ}	
	V_{max}	K_M	V_{max}	K_M		
controles	4,3±2,2	2,1±1,1	16±1	2,0±0,2	8	0,25
estéreis	0,57±0,02	0,014±0,001	1,4±0,2	1,0±0,1	1,4	29

As atividades de quitinase presentes nesses dois tipos de animais foram comparadas através do ensaio de atividade sobre quitina coloidal após cromatografias de interação hidrofóbica (coluna Resource Phe) dos homogeneizados do ventrículo de larvas estéreis ou controle. Obtivemos os resultados expostos na figura 29. Aparentemente, o aumento da atividade quitinásica nas larvas sem flora intestinal se dá pela expressão preferencial de uma quitinase (3e) minoritária nos insetos controle (3). A diferença de migração observada pode ter sido causada pelas diferentes composições proteicas das duas amostras (figura 28), fator que pode alterar o comportamento de proteínas nesse tipo de cromatografia. Contudo, não é possível descartar a possibilidade de que a atividade 3e seja uma enzima completamente nova, não existente nos insetos controle.

Tentou-se também eliminar a flora intestinal de larvas de *T. molitor* através da alimentação dos insetos com uma dieta contendo antibióticos. Devido à necessidade de aspersão das dietas com a solução metanólica dos antibióticos, a dieta utilizada na criação das larvas em ambiente estéril não pôde ser utilizada, devido ao espalhamento e perda dos componentes menos floculados do alimento (farinhas). Assim sendo, esses insetos foram alimentados com farelo de trigo - como nesse caso o alimento não foi autoclavado, não se considerou necessária a suplementação com vitaminas ou outros elementos essenciais. Dessa forma pretendíamos contar com uma maneira alternativa, além de mais rápida e prática para obter larvas com uma flora intestinal reduzida ou ausente. Além disso, a análise desses insetos permitiria saber as alterações dos níveis de expressão de enzimas digestivas observadas nos insetos criados em condições estéreis ocorriam em curto prazo.

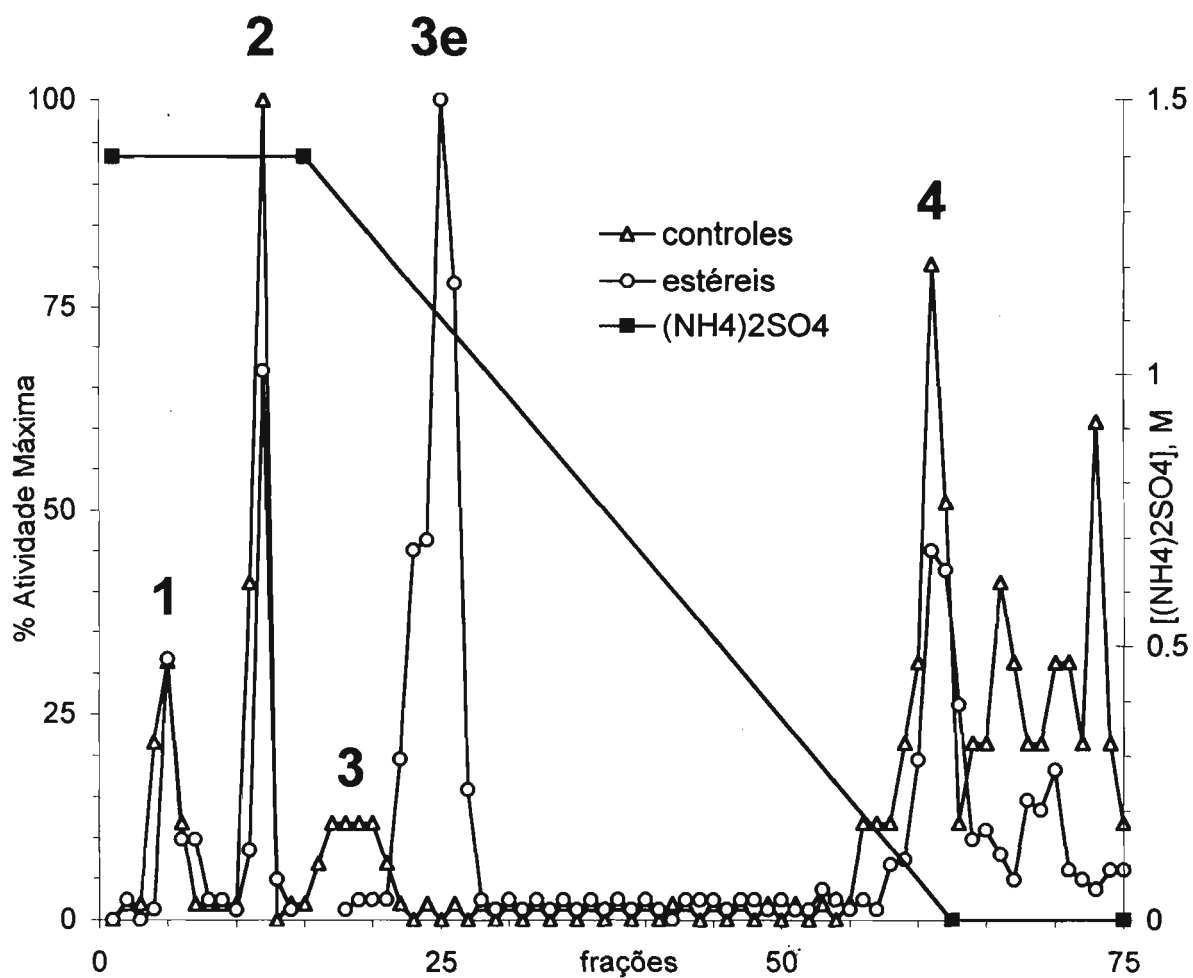


Figura 29 - Atividade sobre quitina coloidal após cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil Superose (FPLC, Pharmacia) da fração solúvel do ventrículo de larvas controle ou criadas em condições estéreis.

A alimentação das larvas com tetraciclina e nistatina não resultou na diminuição das contagens bacterianas do homogeneizado do ventrículo das larvas (dados não apresentados). A utilização dos antibióticos ampicilina e nistatina, entretanto, resultou em uma diminuição significativa das contagens de bactérias e fungos presentes no intestino médio dos animais (tabela 21). Os animais cuja flora intestinal foi diminuída através da alimentação com antibióticos foram denominados "depletados".

Tabela 21 - Números de Unidades Formadoras de Colônia relativos a bactérias e fungos presentes no intestino médio de larvas de *T. molitor* controles ou alimentadas com os antibióticos nistatina e ampicilina por dois dias.

	bactérias	fungos
larvas controle	540.000±190.000	32±15
larvas alimentadas com antibióticos	0	0

As atividades enzimáticas presentes no ventrículo das larvas depletadas foram analisadas à semelhança do trabalho realizado com as larvas estéreis. A comparação das atividades de algumas enzimas digestivas presentes nessas larvas com larvas controle encontra-se na tabela 22. Pode-se ver que o tratamento com antibióticos resultou, no caso das atividades de amilase, β -glicosidase, laminarinase e quitinase, em efeitos semelhantes aos observados

anteriormente nos animais estéreis. As atividades sobre liquenana, carboximetilcelulose e *M. lisodeikticus*, diferentemente do observado nos insetos estéreis, não sofreram variação significativa. O ensaio de eletroforeses realizadas com o homogeneizado do ventrículo desses animais revelou resultados similares aos obtidos com as larvas sem flora intestinal (figura 30).

Tabela 22 - Atividades enzimáticas (mU/animal) e proteína no ventrículo de larvas de *T. molitor* criadas em condições controles ou alimentadas com antibióticos (depletadas).

Substrato	Controles	Depletadas
CMC	0,38±0,06	0,69±0,30
pNφβGli	223±31	369±34
Liquenana	2,5±0,7	2,0±1,3
Laminarina	6,7±4,7	9,3±7,1
Amido Solúvel	115±51	104±38
<i>M. lisodeikticus</i>	0,73±0,45	0,74±0,41
Quitina Coloidal	1,67±0,40	3,67±0,68
proteína (mg/ animal)	2,1±0,5	2,6±0,6

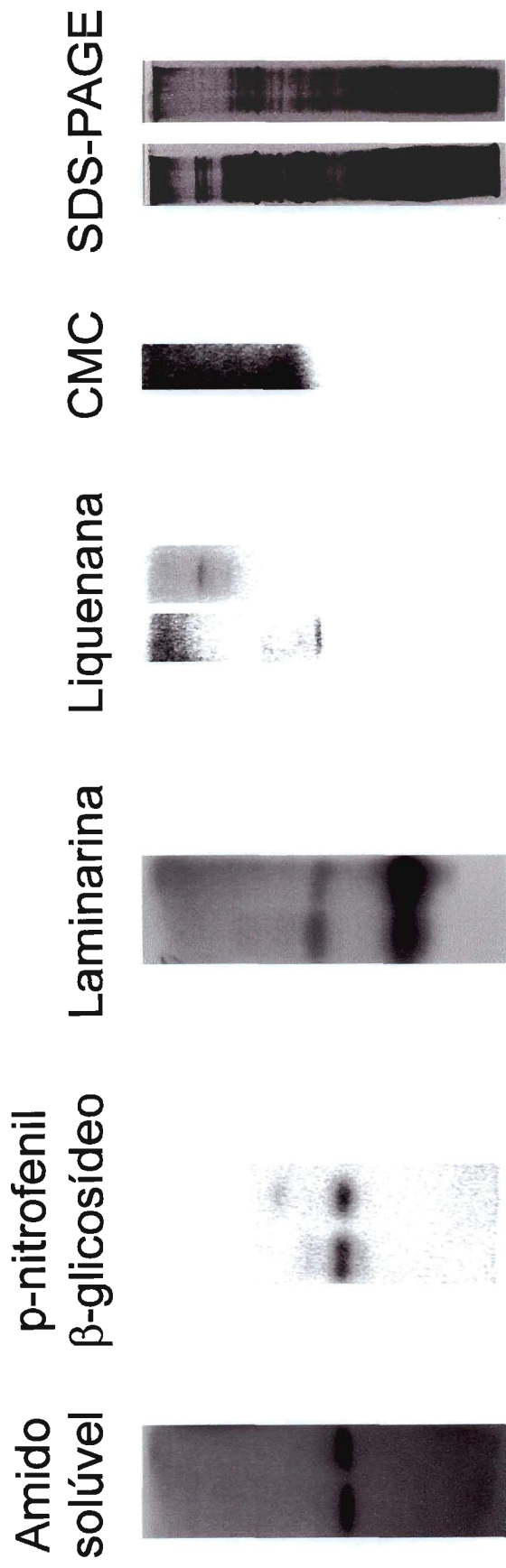


Figura 30 - Ensaio de atividade hidrolítica sobre diferentes substratos após eletroforese nativa em gel de poliacrilamida da fração solúvel do ventrículo de larvas de *T. molitor* criadas em condições controles ou alimentadas com antibióticos. C-controles; E-estéreis. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (coloração com prata).

3.8. Purificação da laminarinase digestiva majoritária de *Tenebrio molitor*.

Tentativas iniciais de purificação das β -1,3-glucanases de *Tenebrio molitor* a partir da fração solúvel de ventrículos de larvas homogeneizados em água bidestilada revelaram que esse tipo de material sofre precipitação e escurecimento após algumas horas no gelo, ou após congelamento e descongelamento. O escurecimento do material ocorre mesmo nas frações obtidas após uma cromatografia de troca iônica. Colunas cromatográficas utilizadas com esse material ficam impregnadas com o pigmento presente na fração solúvel, tornando-se escuras e não-funcionais após algumas cromatografias.

Esse problema foi contornado homogeneizando-se os ventrículos de larvas de *T. molitor* na presença de feniltiouréia (ou feniltiocarbamida, PTC), um potente inibidor da fenol-oxidase de insetos. A fração solúvel preparada em tampão (imidazol ou citrato) na presença de PTC mostrou-se estável durante incubação de algumas horas no gelo, podendo ser congelada e descongelada e aplicada em colunas cromatográficas sem danos aparentes para a resina.

Os perfis cromatográficos referentes à marcha de purificação da β -1,3-glucanase majoritária presente nessa fração solúvel estão apresentados na figura 31. A marcha de purificação consiste em uma cromatografia de troca aniônica em sistema cromatográfico de baixa pressão (figura 31A), seguida de cromatografias de troca aniônica, interação hidrofóbica e filtração em gel em sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC; figuras 31B, 31C e 31D, respectivamente). Na cromatografia de troca aniônica em sistema

cromatográfico de baixa pressão, a atividade sobre laminarina da fração solúvel do ventrículo é recuperada em um único pico (figura 31A). Entretanto, na cromatografia de troca aniônica em sistema de alta pressão (FPLC), observam-se três picos de atividade sobre laminarina (figura 31B). Apenas o pico majoritário (frações 37 a 43 da figura 31B) possui mais atividade sobre laminarina do que sobre p-nitrofenil- β -D-glicosídeo. Os outros dois picos observados (frações 47 a 62 e 66 a 72 da figura 31B) são β -glicosidases, pois sua atividade sobre o glicosídeo é muito maior do que sobre o polissacarídeo (dados não apresentados).

Dessa maneira, deu-se prosseguimento apenas à purificação do pico majoritário obtido na cromatografia de troca aniônica em sistema de alta pressão. A aplicação desse material em cromatografias de interação hidrofóbica e filtração em gel (respectivamente figuras 31C e 31D) resultou na obtenção de um único pico de atividade. Esse material ao ser aplicado em SDS-PAGE, revelou-se como um único polipeptídeo, com cerca de 50kDa (figura 31E). O ensaio de atividade sobre laminarina após a aplicação desse material em eletroforese nativa revelou apenas uma banda de atividade, coincidente com a banda de proteína do material e com a atividade majoritária presente na fração solúvel (figura 32).

As recuperações e enriquecimentos da atividade sobre laminarina ao longo da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva de *T. molitor* estão expostos na tabela 23. É importante levar em conta a divisão da atividade em três picos na segunda cromatografia ao interpretar os dados de recuperação. Além da partição da atividade estudada, efeitos como queda de atividade devido à perda de sinergismo entre enzimas não podem ser descartados.

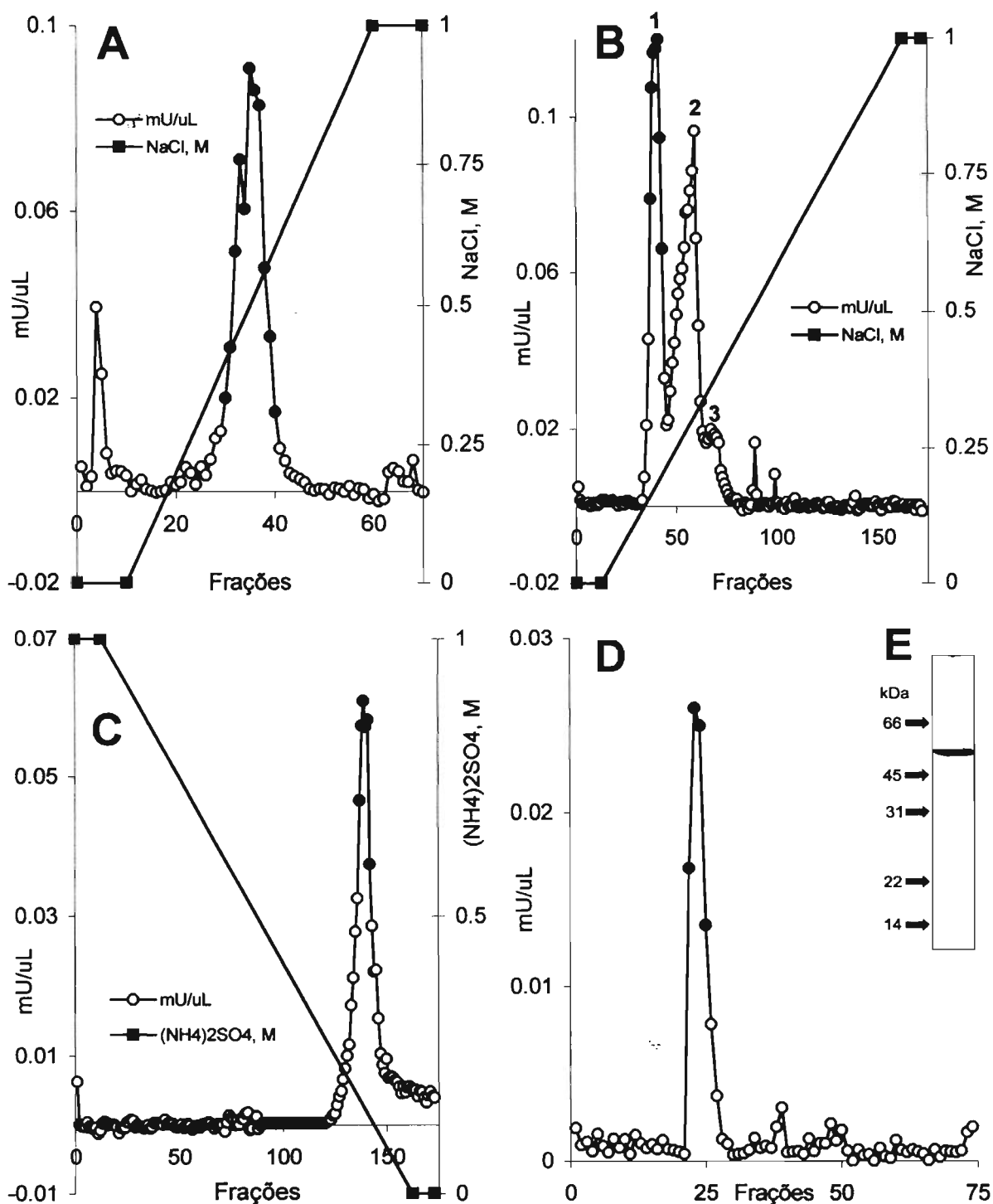


Figura 31 - Perfis de atividade sobre laminarina nos passos de purificação da β -1,3 glucanase digestiva majoritária de larvas de *T. molitor*. A) Cromatografia de troca iônica em coluna EconoPac HighQ da fração solúvel do ventrículo. Frações recolhidas: 30 a 40. B) Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q do material recolhido em A. Frações recolhidas: 37 a 43. C) Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Phenyl do material recolhido em B. Frações recolhidas: 137 a 142. D) Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75 do material recolhido em C. Frações recolhidas: 22 a 25. E) SDS-PAGE do material recolhido após a cromatografia em D. As setas indicam as migrações dos padrões de massa molecular. Os círculos escuros indicam as frações recolhidas após cada cromatografia.

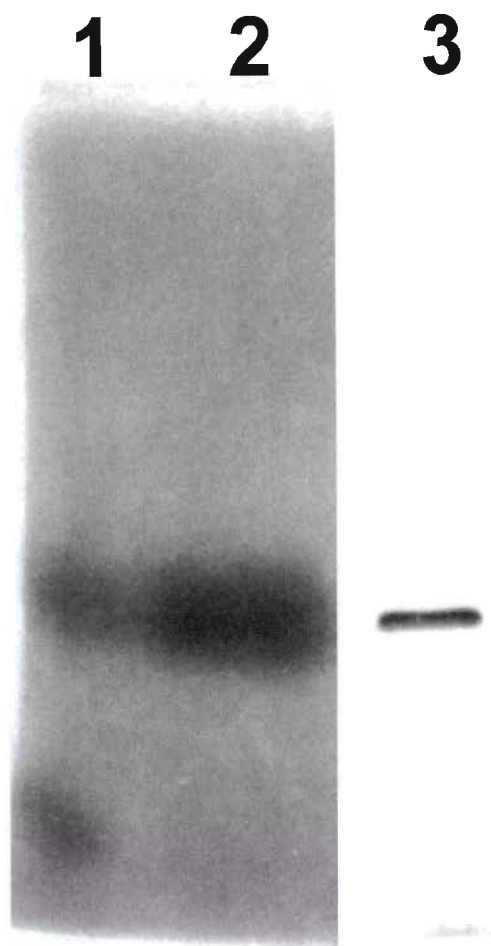


Figura 32 - Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida 7,5% (p/v) contendo laminarina 1% (p/v). Raia 1 - Fração solúvel do ventrículo de larvas de *T. molitor*. Raias 2 e 3 - material LAMT purificado. Raias 1 e 2 - coloração com TTC (grupos redutores) após incubação a 30°C por 3 horas. Raia 3 - coloração com prata (proteína).

Tabela 23 - Recuperação e enriquecimento das atividades sobre laminarina durante a purificação da β -1,3-glucanase digestiva majoritária de larvas de *T. molitor*.

Material	Atividade específica (mU/mg)	Recuperação (%)	Enriquecimento
Fração solúvel do ventrículo	39	100	1
Eluído da High Q	55	55	1,4
Eluído da Resource Q	57	14	1,5
Eluído da Resource Phenyl	1351	6	35
Eluído da Superdex 75	4400	6	110

3.9. Caracterização da laminarinase digestiva de *Tenebrio molitor*.

O pH ótimo da laminarinase digestiva de *T. molitor* ao atuar sobre laminarina é 6 (dados não apresentados). Essa enzima apresenta uma especificidade bastante estrita, sendo capaz de clivar, entre os substratos testados, apenas β -1,3-glucanas - laminarina e a β -1,3-glucana de *S. cerevisiae*, com eficiências catalíticas relativas de 100% e 27%, respectivamente. A enzima não apresentou atividade sobre liquenana, β -1,3-1,4-glucana de *H. vulgare*, carboximetilcelulose, xilana, laminaribiose, p-nitrofenil- β -D-glicosídeo, Avicel ou pachyman (dados não apresentados).

Após o tratamento das moléculas de laminarina com periodato e borohidreto (destruição das pontas redutora e não redutora), a enzima perde significativamente a atividade sobre esse substrato (atividade residual de 1%). Como o simples tratamento com borohidreto (destruição da ponta redutora) não afeta a atividade da enzima, podemos concluir que LAM_T é uma exo-glucanase cujo ataque se dá pela ponta não-redutora do substrato. A aplicação dos produtos de hidrólise de laminarina por LAM_T em cromatografia em camada delgada de sílica revela a formação preferencial de dois oligossacarídeos com um grau de polimerização relativamente elevado (ver figura 33). Um deles possui migração correspondente a laminarioctaose, enquanto que o outro não possui correspondente nos padrões lineares de laminarioligossacarídeos, podendo tratar-se de um oligossacarídeo ramificado (figura 33).



Figura 33 - Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos liberados por LAM_T a partir de laminarina. Raia 1 - produtos de LAM_T. Raia 2 - padrões de laminarioligosacarídeos (hidrolisado de pachyman).

Contudo, espectrofotometricamente verificou-se que moléculas de glicose correspondem a 25% dos produtos liberados por LAM_T (dados não apresentados). Apenas 50% dos produtos gerados por essa enzima são solúveis em etanol (dados não apresentados), o que pode ser explicado pela baixa solubilidade da laminarioctose nesse solvente.

Os parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de β -1,3-glucanas por LAM_T são apresentados na tabela 24. Essa enzima não apresentou inibição por altas concentrações de substrato. Os parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_T foram estimados em diferentes valores de pH, com o objetivo de verificar a participação de grupos prototrópicos na catálise. Os resultados obtidos são apresentados na figura 34. LAM_T possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise, com pKs de 5,34 e 6,64 na enzima livre e 5,25 e 7,57 no complexo enzima-substrato.

Para saber quais são os aminoácidos envolvidos em catálise presentes no sítio ativo de LAM_T, essa enzima foi submetida a experimentos de modificação química com os reagentes específicos apresentados no item 2.14 e na tabela 4. Os experimentos realizados estão apresentados nas figuras 35 (dietilpirocarbonato, DPC), 36 (EDC, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida e CHMC, meto-para-tolueno-sulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolino-etil)carbodiimida), 37 (pHMB, p-hidroximercuribenzoato), 38 (FG, fenilglioxal), 39 (EDTA, ácido etileno-diamino-tetra-acético) e 40 (TNM, tetranitrometano e NBS, N-bromosuccinimida). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 25. Podemos observar que resíduos de cisteína (1), tirosina (1), histidina (1) e arginina (2), além de um cátion divalente (1) e de um grupo carboxila (1), estão

Tabela 24 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de β -1,3-glucanas pela enzima LAM_T purificada.

Substrato	K_M (%)	K_{cat} (s^{-1})	Ciclo catalítico (s)	K_{cat}/K_M ($s^{-1}\%$)	K_{cat}/K_M relativo
laminarina	0,147 \pm 0,017	1,42 \pm 0,04	0,7	9,7	100
β -1,3-glucana de <i>S. cerevisiae</i>	0,240 \pm 0,035	0,30 \pm 0,01	3,4	1,2	13

envolvidos na catálise por essa enzima. Não há a participação de resíduos de triptofano na catálise.

Os resíduos de histidina, tirosina, arginina, o íon divalente e o grupo carboxila localizam-se no sítio ativo, pois a presença do substrato (laminarina) é capaz de proteger completamente a enzima da modificação. O mesmo não ocorre ao modificar-se o resíduo de cisteína na presença de laminarina - nesse caso, observamos um aumento da constante de inativação (figura 37), o que indica que o resíduo de cisteína não se encontra no sítio ativo da enzima. Contudo, o comportamento da constante de inativação frente ao pHMB em baixas concentrações de laminarina sugere que talvez essa cisteína esteja nas imediações do sítio ativo, dada a proteção parcial observada nessas condições (figura 37D). Esse fenômeno pode ser o resultado de mudanças conformacionais no sítio ativo com a ligação da molécula de laminarina ao sítio ativo - contudo, o comportamento bifásico da curva sugere fortemente, à semelhança do observado para a enzima LAM_A (ver item 3.3 e figuras 26 e 27), a existência de dois sítios para a ligação desse substrato.

Foi possível estimar, para as modificações com EDTA, fenilglioxal e carbodiimida, a constante de dissociação da ligação da laminarina quando a molécula desse substrato liga-se à enzima de forma a protegê-la da inativação (tabela 25). A coincidência com os valores da constante de Michaelis de LAM_T para esse substrato corrobora o fato de que o grupo carboxila, o íon divalente e os resíduos de arginina modificados se encontram no sítio ativo da enzima.

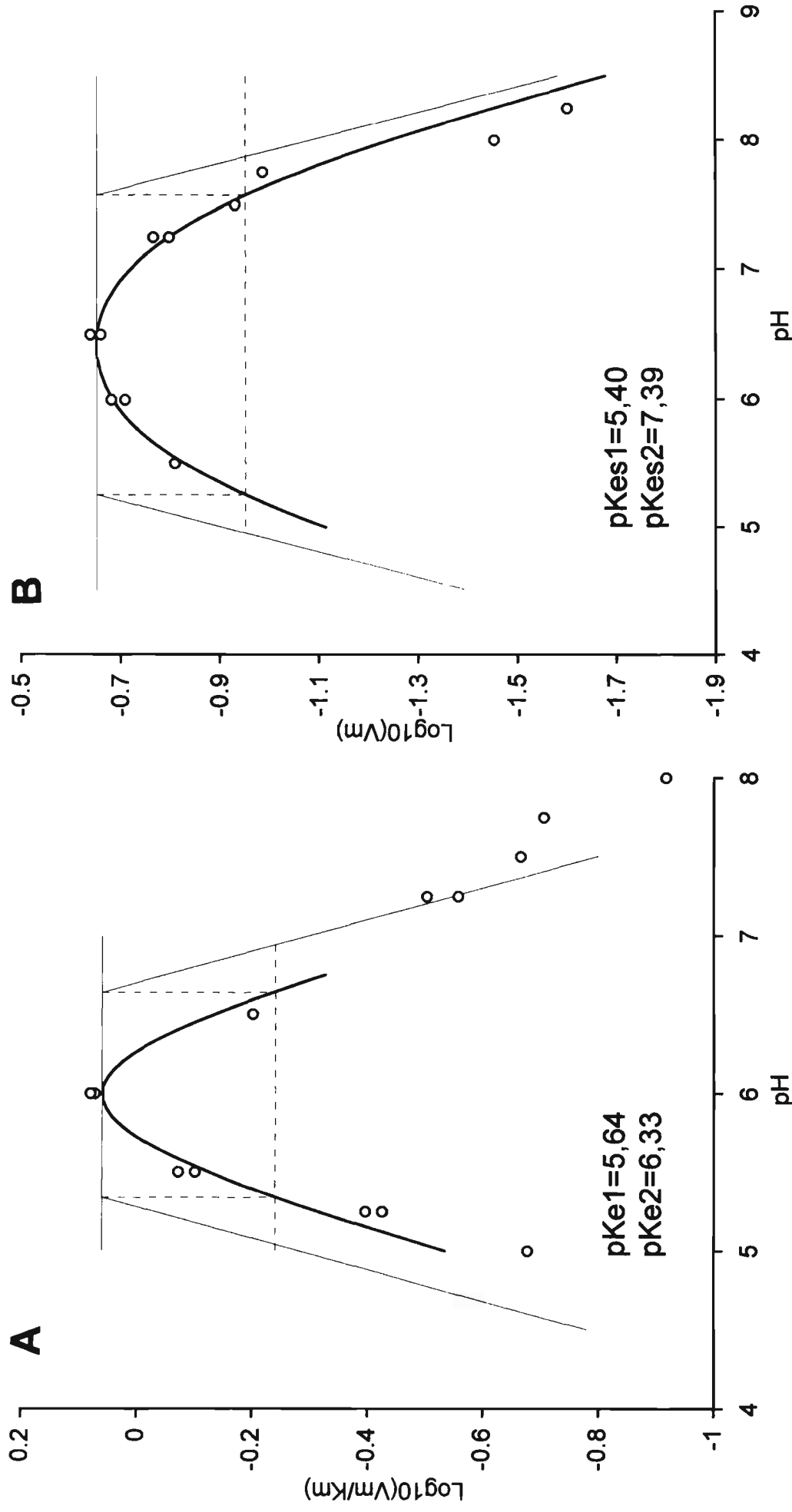


Figura 34 - Determinação das constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise em LAM_T. A) Plote de Dixon para a enzima nativa ($\text{Log } V_m/K_m \times \text{pH}$). B) Plote de Dixon para o complexo enzima-substrato ($\text{Log } V_m \times \text{pH}$). Os valores de pK indicados são os obtidos pelo ajuste dos dados a funções teóricas pelo método dos mínimos quadrados. As curvas foram traçadas de acordo com esses parâmetros.

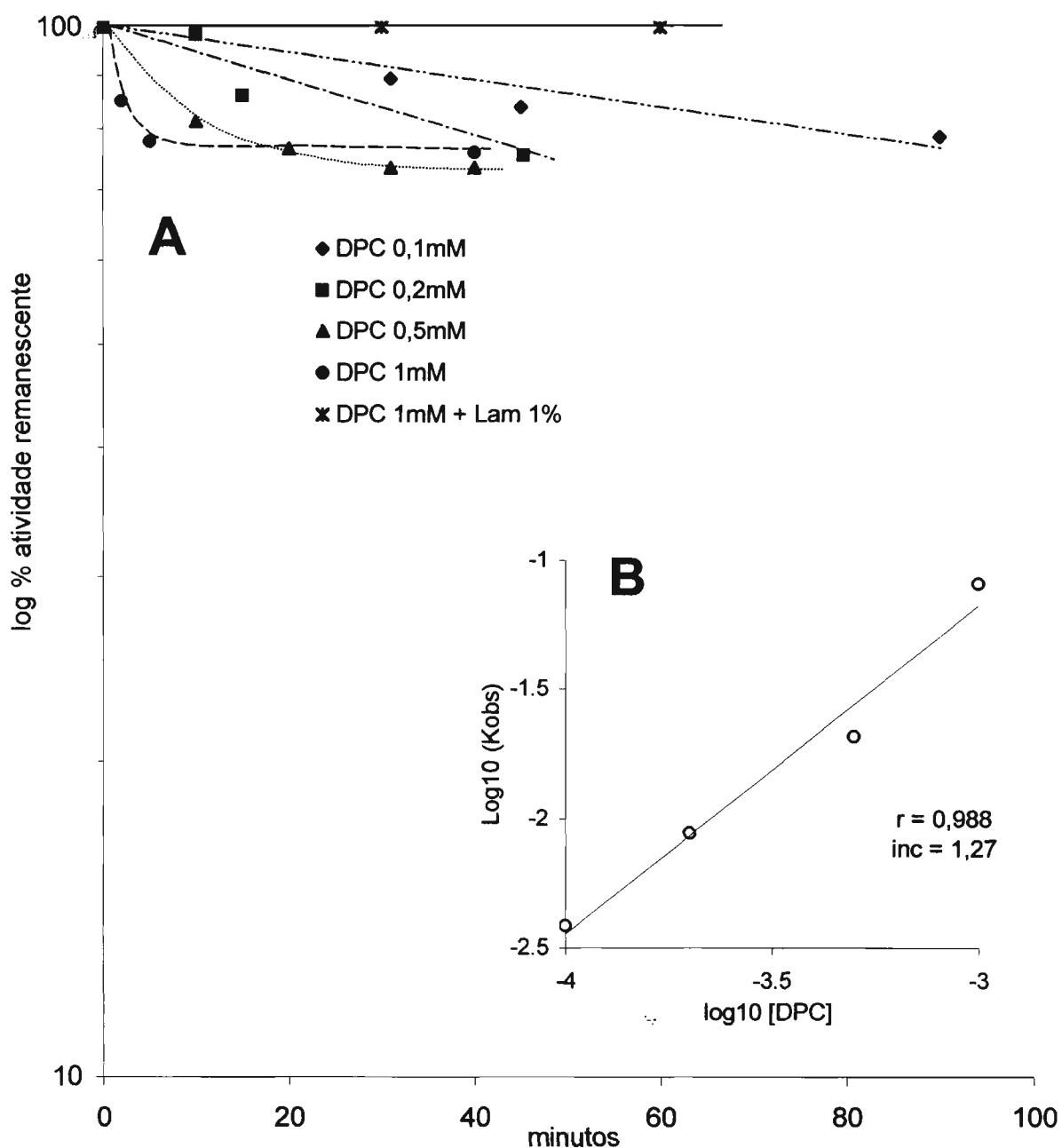


Figura 35 - Modificação de LAM_T na presença de dietilpirocarbonato (DPC). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de DPC e na presença de laminarina 1% B) Determinação da ordem da reação entre LAM_T e DPC em relação ao modificador.

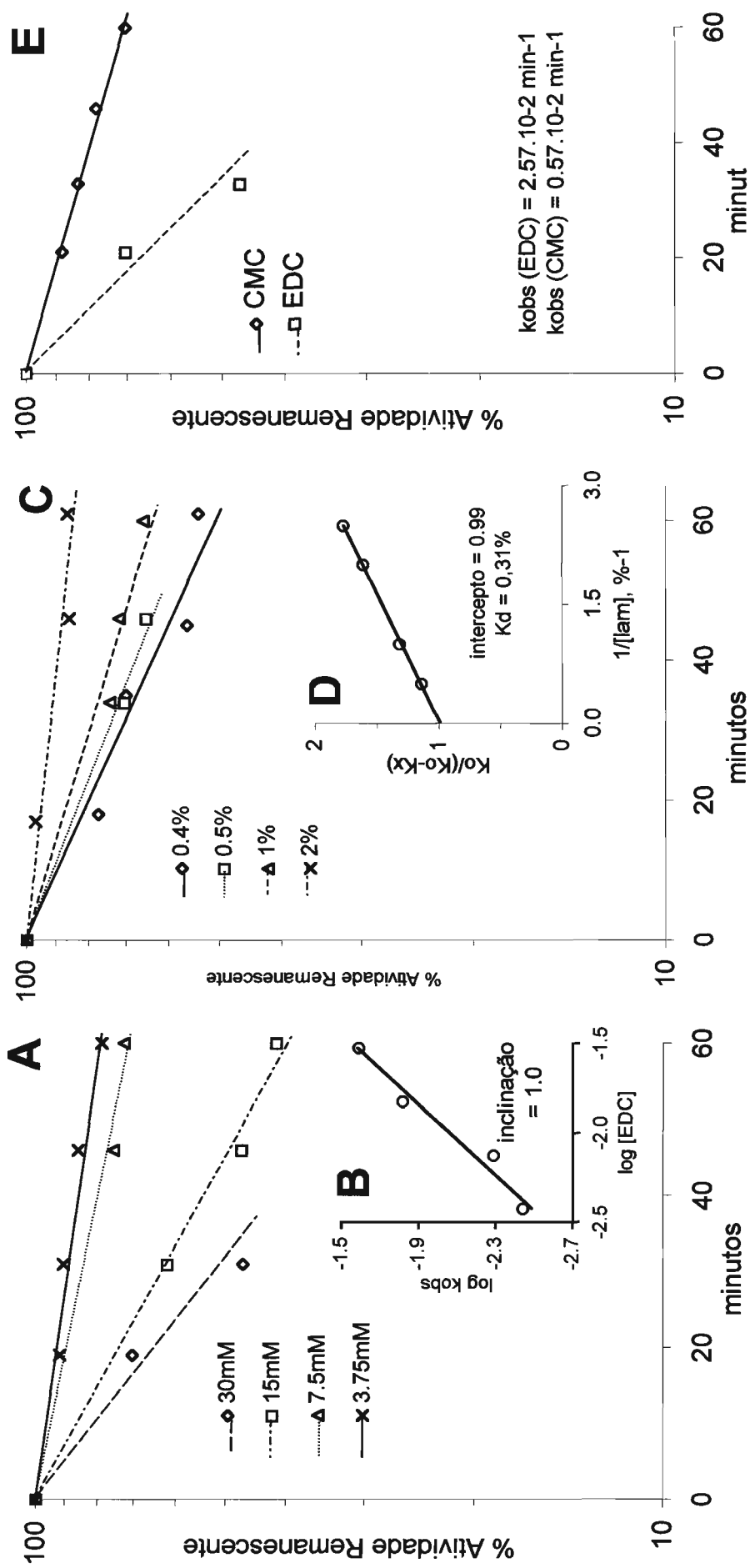


Figura 36 - Modificação química de LAM_T na presença de carbodiimidas, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) ou meto-para-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolino-etil)carbodiimida (CHMC). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de EDC. B) Determinação da ordem da reação entre LAM_T e EDC em relação ao modificador. C) Modificação na presença de EDC 30mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Determinação da constante de dissociação entre LAM_T e laminarina. E) Modificação na presença de CHMC ou EDC 30mM.

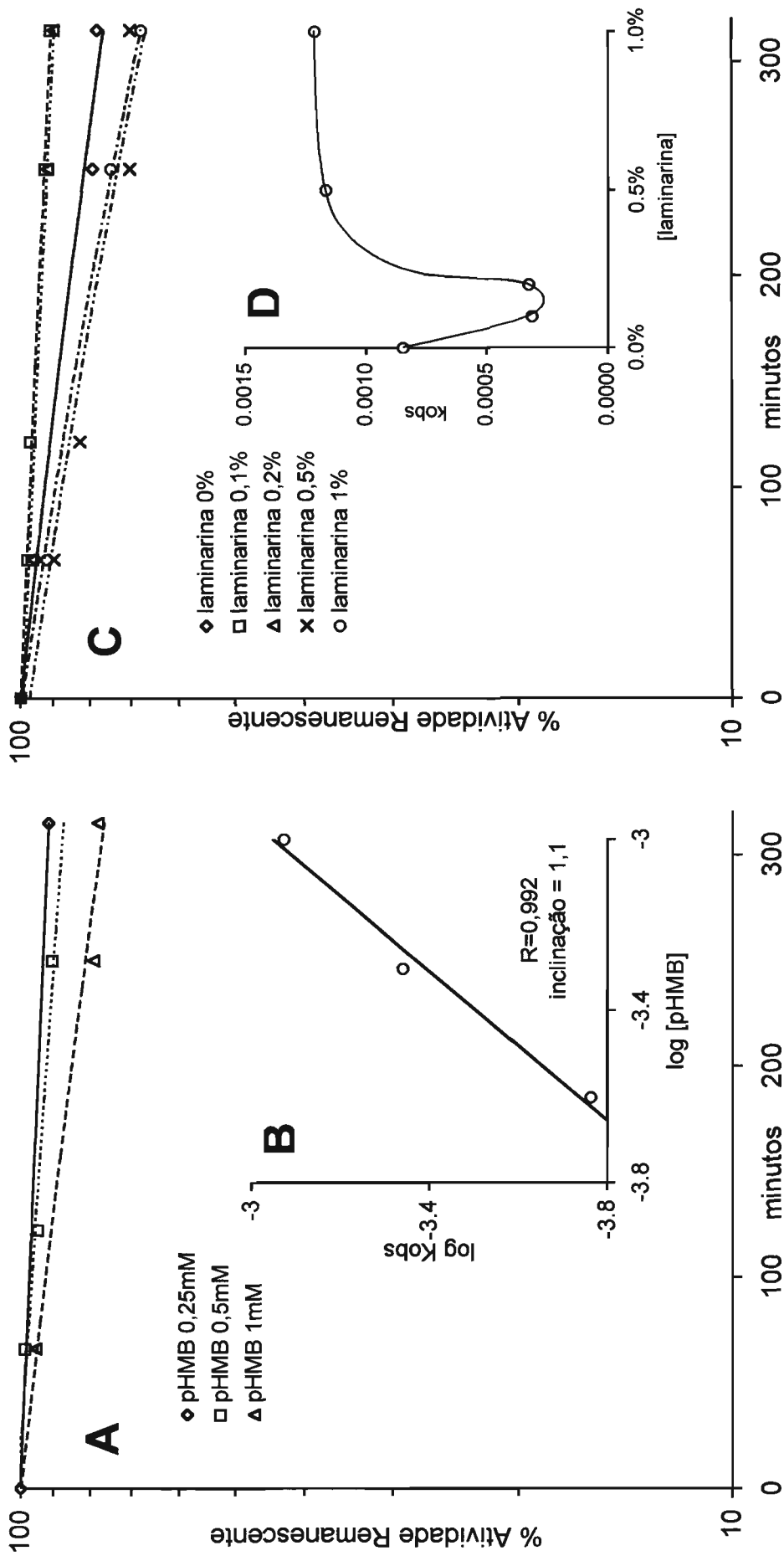


Figura 37 - Inativação por modificação química de LAM_T na presença de p-hidroxi-mercúrio-benzoato (pHMB). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de pHMB. B) Determinação da ordem da reação entre LAM_T e pHMB em relação ao modificador. C) Modificação na presença de pHMB 1mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Variação da constante de inativação em função da concentração de laminarina.

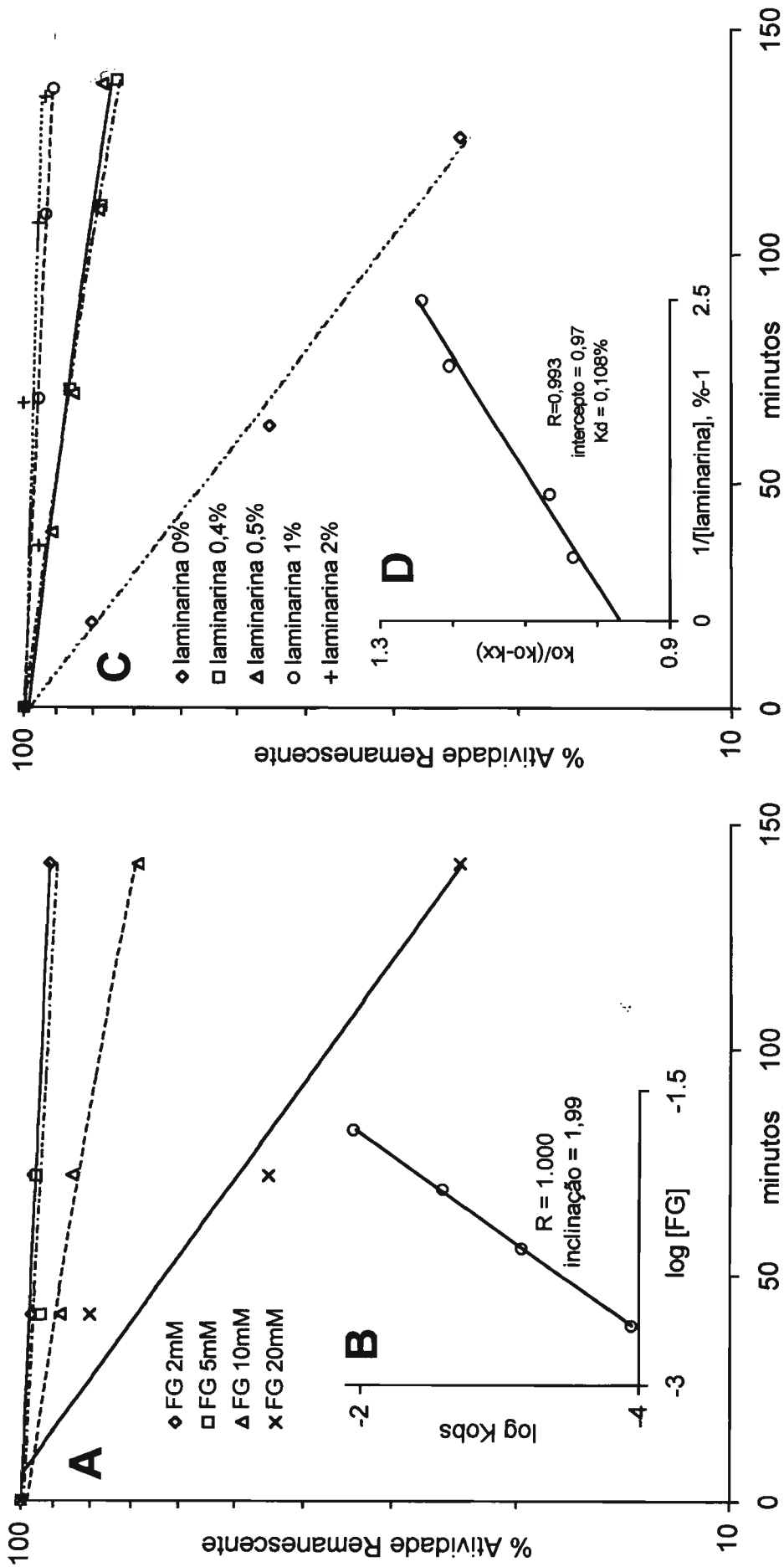


Figura 38 - Inativação por modificação química de LAM_T na presença de Fenilgloxal (FG). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de FG. B) Determinação da ordem da reação entre LAM_T e FG em relação ao modificador. C) Modificação na presença de FG 20mM e diferentes concentrações de laminarina D) Determinação da constante de dissociação entre LAM_T e laminarina.

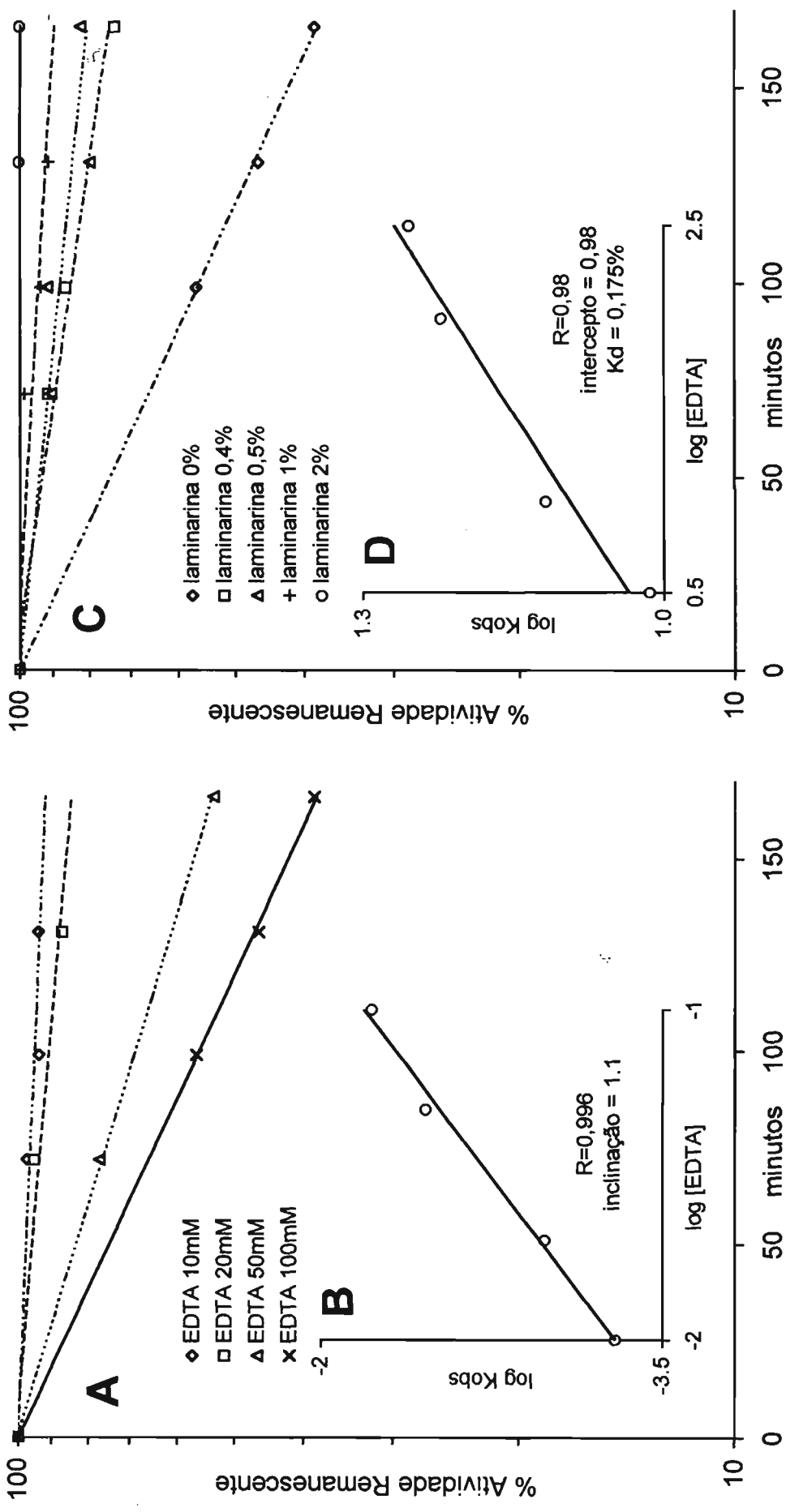


Figura 39 - Inativação por modificação química de LAM_T na presença de ácido-etileno-diamino-tetra-acético (EDTA). A) Modificação na presença de diferentes concentrações de EDTA. B) Determinação da ordem da reação entre LAM_T e EDTA com relação ao modificador. C) Modificação na presença de EDTA 100mM e diferentes concentrações de laminarina. D) Determinação da constante de dissociação entre LAM_T e laminarina.

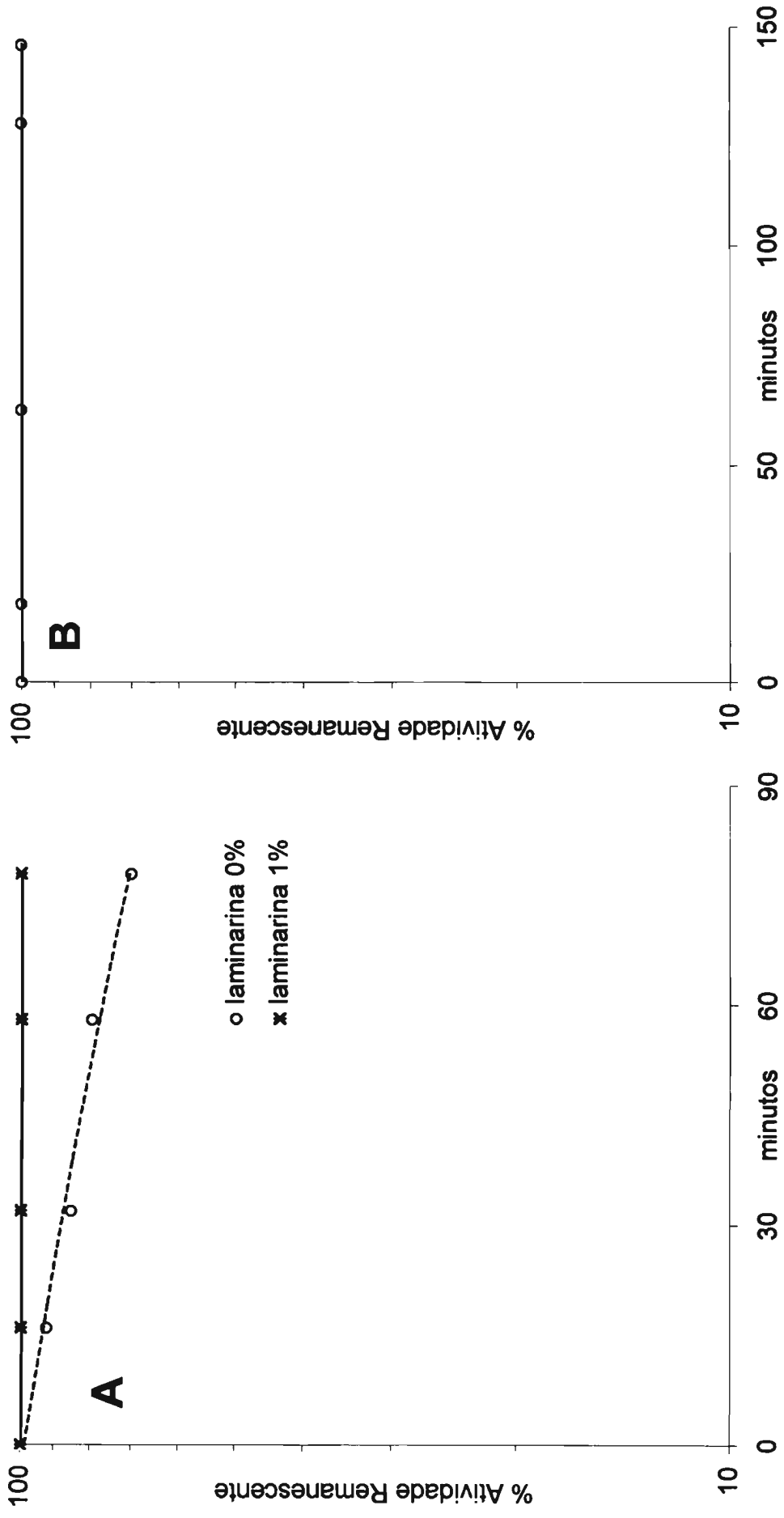


Figura 40 - Inativação por modificação química de LAM_T na presença de tetranitrometano (TNM) 5mM na ausência ou presença de laminarina 1%. B) Inativação por modificação química de LAM_T na presença de N_bromosuccinimida (NBS).

Tabela 25 - Inativação química de LAM_T por diferentes modificadores. A porcentagem de atividade remanescente refere-se ao máximo de modificação obtido nos experimentos. Valores de K_d são as constantes de dissociação entre a enzima e o substrato (laminarina), estimadas de acordo com a proteção da modificação proporcionada por este. Os valores da constante de Michaelis são os obtidos em experimentos realizados nas mesmas condições da reação de modificação. * - Proteção total com laminarina 1%. ** - A laminarina expõe o resíduo modificado, aumentando o valor de K_{obs} .

Reagente	Grupo ou aminoácido modificado	% Atividade Remanescente	Ordem de reação	Constante de Dissociação (K_D)	Constante de Michaelis (K_M)
DPC	Histidina	70	1,27	*	0,175%
EDC	Carboxila (Glu ou Asp)	40	1,00	0,308%	0,297%
FG	Arginina	0	1,99	0,108%	0,104%
EDTA	Cátions divalentes	40	1,1	0,180%	0,175%
TNM	Tirosina	70	N.D.	*	0,104%
pHMB	Cisteína	80	1,1	**	0,104%
NBS	Triptofano	100	-	-	0,175%

Realizou-se a modificação de LAM_T com EDC em diferentes valores de pH, com o objetivo de determinar a constante de ionização do grupo carboxila envolvido em catálise. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 41. A proximidade entre os valores da constante de ionização obtida nesse experimento ($6,40 \pm 0,03$) e da constantes de um dos grupos prototrópicos envolvidos em catálise nessa enzima ($6,33 \pm 0,40$, ver figura 34) indica fortemente que o grupo básico (doador de prótons) envolvido em catálise é uma carboxila.

O reagente dietilpirocarbonato não é capaz de inativar completamente LAM_T. A cinética de inativação sugere que a enzima modificada retém cerca de 70% da sua atividade original (ver figura 35). Isso indica que talvez a histidina presente no sítio ativo dessa enzima possui um papel acessório na catálise. Com o objetivo de saber se o papel dessa histidina está relacionado com a regulação dos estados de protonação e desprotonação dos grupos prototrópicos envolvidos na catálise, determinamos os parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_T após a modificação da enzima com dietilpirocarbonato.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 42. Podemos verificar que, após a modificação com dietilpirocarbonato, os pKs dos grupos prototrópicos envolvidos am catálise são de 5,48 e 7,82 na enzima livre e 3,64 e 7,70 no complexo enzima-substrato. Isso indica fortemente que o resíduo de histidina em questão é importante para a manutenção dos estados de protonação dos grupos prototrópicos envolvidos em catálise presentes no sítio ativo dessa enzima. Os dados referentes a esse experimento estão resumidos na tabela 26.

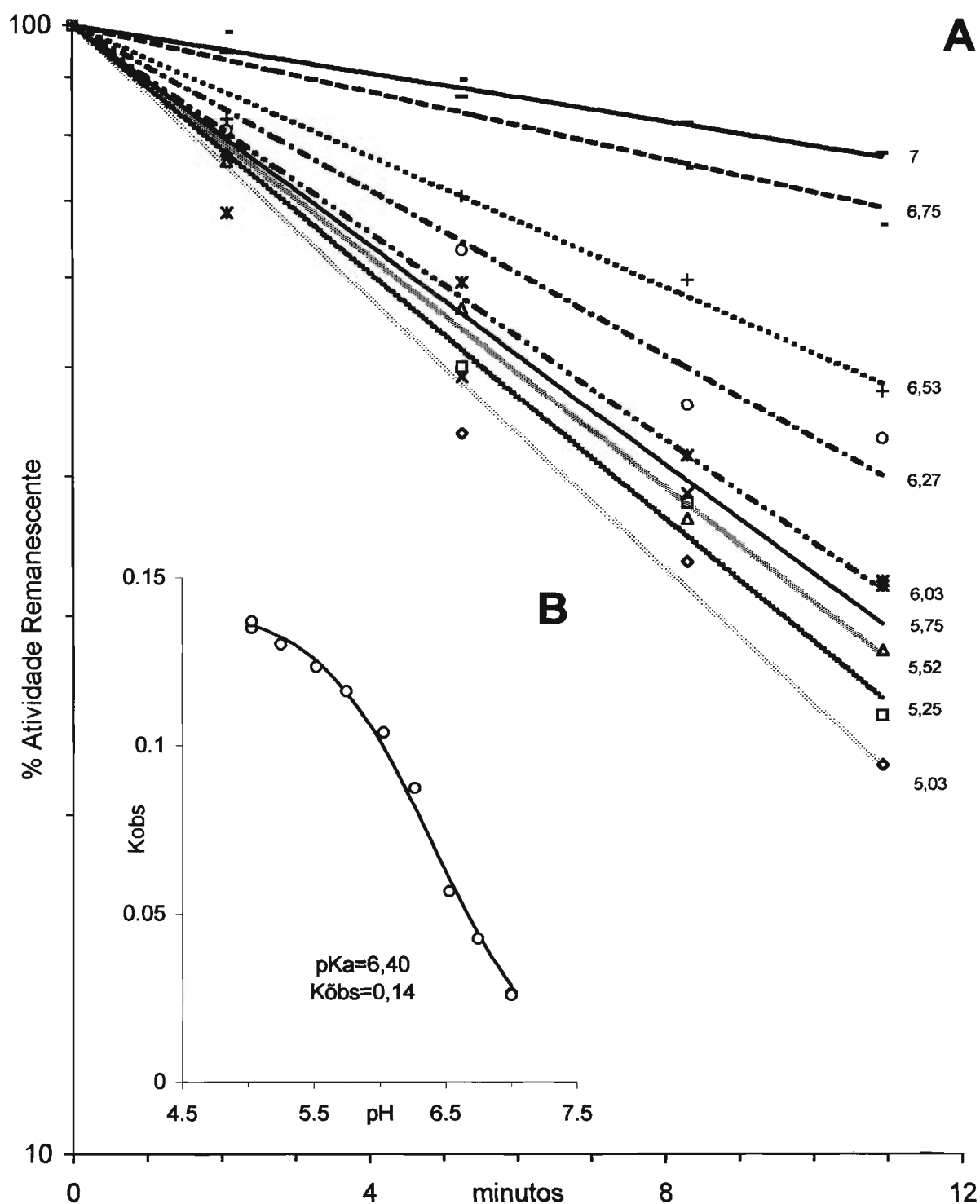


Figura 41 - Determinação da constante de ionização do grupo carboxila modificado com EDC em LAM_T. A) Modificação de LAM-T na presença de EDC 30mM em diferentes pHs. B) Variação da constante de inativação em função do pH de modificação. K_{obs} =constante absoluta de velocidade de reação (independente do pH).

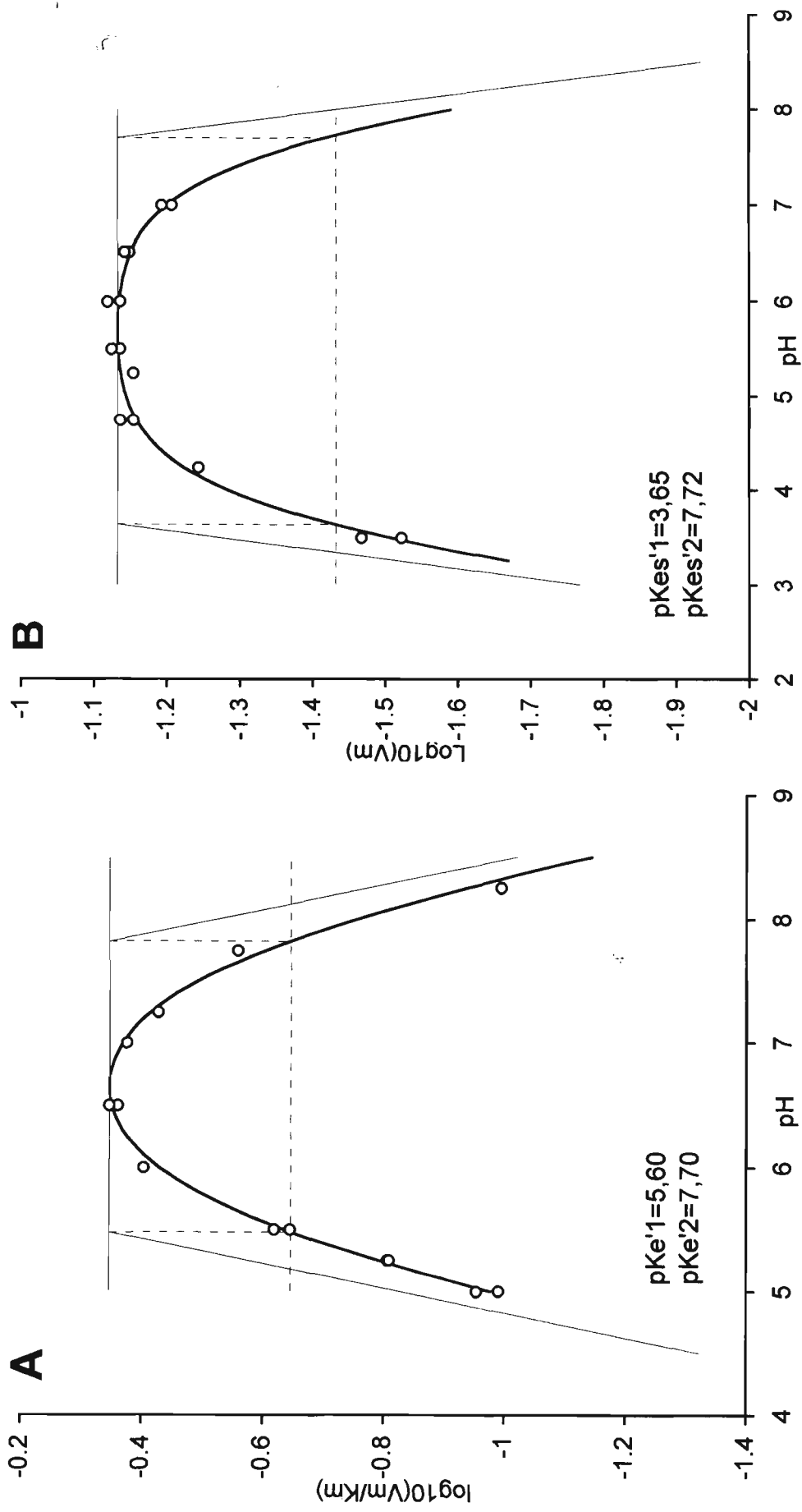


Figura 42 - Determinação de constantes de dissociação em grupos prototrópicos envolvidos em catálise na enzima LAM_T purificada após modificação química com dietilpirocarbonato (DPC). A) Plote de Dixon para a enzima nativa ($\log V_m/K_m \times \text{pH}$). B) Plote de Dixon para o complexo enzima-substrato ($\log V_m \times \text{pH}$). Os valores de pK indicados são os obtidos pelo ajuste dos dados a funções teóricas pelo método dos mínimos quadrados. As curvas foram traçadas de acordo com esses parâmetros.

Tabela 26 - Constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise na enzima LAM_T antes e após modificação com dietilpirocarbonato (DPC).

Parâmetro	Enzima Nativa	Enzima Modificada
pK_{E1}	$5,64 \pm 0,21$	$5,61 \pm 0,03$
pK_{E2}	$6,33 \pm 0,40$	$7,69 \pm 0,04$
pK_{ES1}	$5,40 \pm 0,15$	$3,65 \pm 0,04$
pK_{ES2}	$7,39 \pm 0,07$	$7,72 \pm 0,08$

A incubação de LAM_T com células de *S. cerevisiae* em meio hipotônico leva a uma rápida perda de viabilidade dessa levedura. Dessa maneira, a laminarinase digestiva de *T. molitor* parece ser capaz de atacar a parede celular desse fungo, majoritariamente constituída por β -1,3-glucanas. Contudo, o efeito lítico parece depender da relação entre as concentrações de enzima e de células usadas no ensaio, sendo mais proeminente quando essa relação é maior (figura 43). É possível perceber, nos ensaios em que se utilizou uma maior concentração de células, um curto período inicial no qual essas resistem à lise (figura 43, curvas com 40 ou 50UFCs/ μ L).

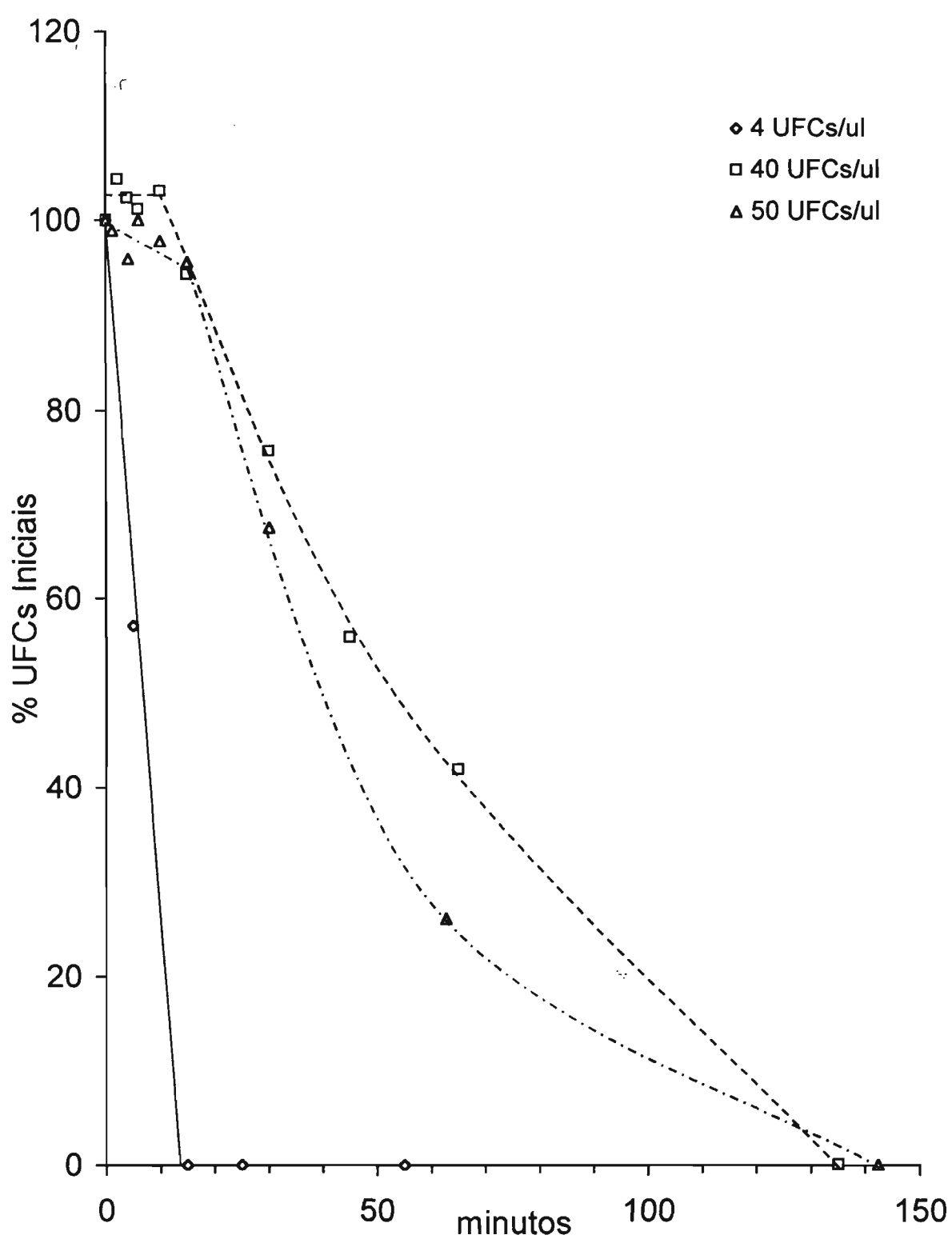


Figura 43 - Decréscimo no número de células de *S. cerevisiae* ao longo do tempo na presença de LAM-T (60 μM), em ensaios com diferentes concentrações iniciais de unidades formadoras de colônias (UFCs).

3.10. Purificação da quitinase digestiva de *Tenebrio molitor*.

O estudo das enzimas digestivas presentes em larvas de *Tenebrio molitor* criadas em condições estéreis ou alimentadas com antibióticos revelou que esse inseto é capaz de secretar ativamente em seu tubo digestivo laminarinase, β -glicosidase e quitinase. A secreção dessas três enzimas é aumentada na ausência da flora intestinal. Dessa forma, o inseto parece contar em seu tubo digestivo com um conjunto de enzimas voltado para a digestão de fungos, e esses três tipos enzimáticos parecem ser regulados em conjunto. Esses fatos despertaram nosso interesse para o estudo da quitinase digestiva desse inseto. Não se possui nenhum conhecimento sobre essa enzima. Em contraposição, as β -glicosidases de *T. molitor* são enzimas bastante conhecidas, já tendo sido purificadas e caracterizadas extensivamente.

Assim sendo, demos início a tentativas de purificação da quitinase presente na fração solúvel em água do ventrículo de larvas de *T. molitor*. A técnica de purificação inicial que mostrou os melhores resultados em termos de recuperação (100%) da atividade sobre quitina coloidal foi a precipitação com sulfato de amônio (1,4M) das proteínas presentes na fração solúvel. Nessa condição, a quitinase permanece solúvel. Contudo, o material solúvel obtido dessa maneira possui um pigmento marrom que, ao ser aplicado em colunas cromatográficas (de interação hidrofóbica ou troca iônica), adsorve-se irreversivelmente à resina, estragando a coluna. O escurecimento do homogeneizado e a presença desse pigmento foram minimizados com a homogeneização em tampão citrato na presença de feniltiocarbamida (PTC). A

fração solúvel obtida dessa maneira, após precipitação com sulfato de amônio, pôde ser aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica acoplada a um sistema cromatográfico de baixa pressão, obtendo-se um pico de atividade sobre quitina coloidal ao fim do gradiente salino (figura 44A).

As frações com maior atividade sobre quitina coloidal (frações 30 a 45 da figura 44A) foram então reunidas e, após diálise, submetidas a cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica em colunas acopladas a um sistema cromatográfico de alta pressão (FPLC; figuras 44B e 44C). O material reunido após a cromatografia de interação hidrofóbica em sistema de alta pressão (frações 63 a 66 da figura 44C), ao ser aplicado em SDS-PAGE, revelou-se como uma única banda de proteína, com cerca de 40kDa (figura 44D). Como não há técnicas disponíveis para detecção em gel da atividade sobre quitina coloidal após eletroforese, decidimos aplicar o material purificado em uma cromatografia de filtração em gel (coluna Superdex 75) acoplada a sistema cromatográfico de alta pressão para confirmar a massa molecular da quitinase purificada (figura 44E).

Obteve-se na cromatografia um pico de atividade sobre quitina coloidal com cerca de 40kDa. Aplicando-se as frações da cromatografia em SDS-PAGE podemos ver que a intensidade da banda de 40kDa acompanha a atividade quitinásica das frações (figuras 44E e 44F), confirmando que a proteína de 40kDa purificada até a homogeneidade é, de fato, uma quitinase e que essa proteína, nas condições de estudo, é monomérica. Não foram calculados recuperações ou enriquecimento ao longo da marcha de purificação.

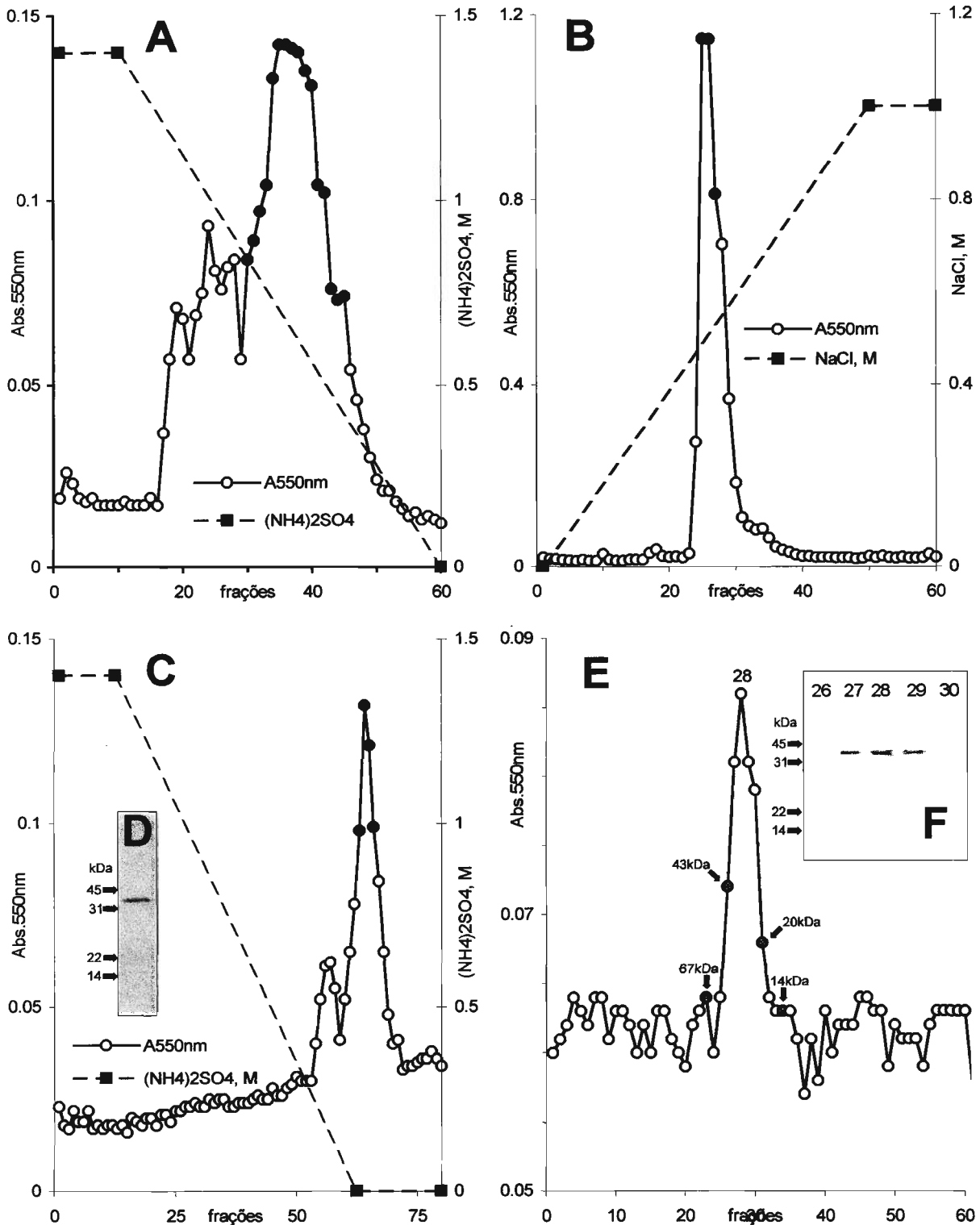


Figura 44 - Marcha de purificação da quitinase digestiva majoritária de *T. molitor*. A) Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Metil Sepharose do sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio 1,4M da fração solúvel do ventrículo de larvas de *T. molitor*. Frações reunidas 30 a 45. B) Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ do material recolhido em A após diálise. Frações recolhidas 25 a 27. C) Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil Superose do material recolhido em B. Frações recolhidas 63 a 66. D) SDS-PAGE do material recolhido em C. E) Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75 do material recolhido em C. F) SDS-PAGE das frações 26 a 30 da cromatografia em Superdex 75.

3.11. Caracterização da quitinase digestiva de *Tenebrio molitor*.

A quitinase digestiva de *T. molitor* ao atuar sobre quitina coloidal, apresenta um pH ótimo de 4,5 (dados não apresentados). 90% dos produtos gerados por essa enzima são solúveis em água (dados não apresentados). O tratamento da quitina coloidal com borohidreto, ou seja, a oxidação dos grupos N-acetil e da ponta redutora, leva à perda de 40% da atividade da enzima sobre esse substrato. O tratamento com periodato e borohidreto (destruição adicional do resíduo de N-acetil-glicosamina da ponta não redutora) leva à perda de 90% da atividade dessa enzima sobre a quitina coloidal. Esses dados em conjunto indicam que essa enzima é uma *exo*-quitinase, cujo ataque se dá pela ponta não redutora do substrato.

A cromatografia em camada delgada dos produtos de ação da quitinase sobre diferentes oligosacarídeos e sobre quitina coloidal está apresentada na figura 45. A enzima não tem atividade sobre quitobiose ou quitotriose, e cliva quitotetraose em duas moléculas de quitobiose. A enzima cliva quitopentaose gerando quitobiose e quitotriose, e produz exclusivamente quitobiose a partir de quitohexaose. Podemos verificar que o principal produto de ação dessa enzima sobre quitina coloidal é quitobiose.

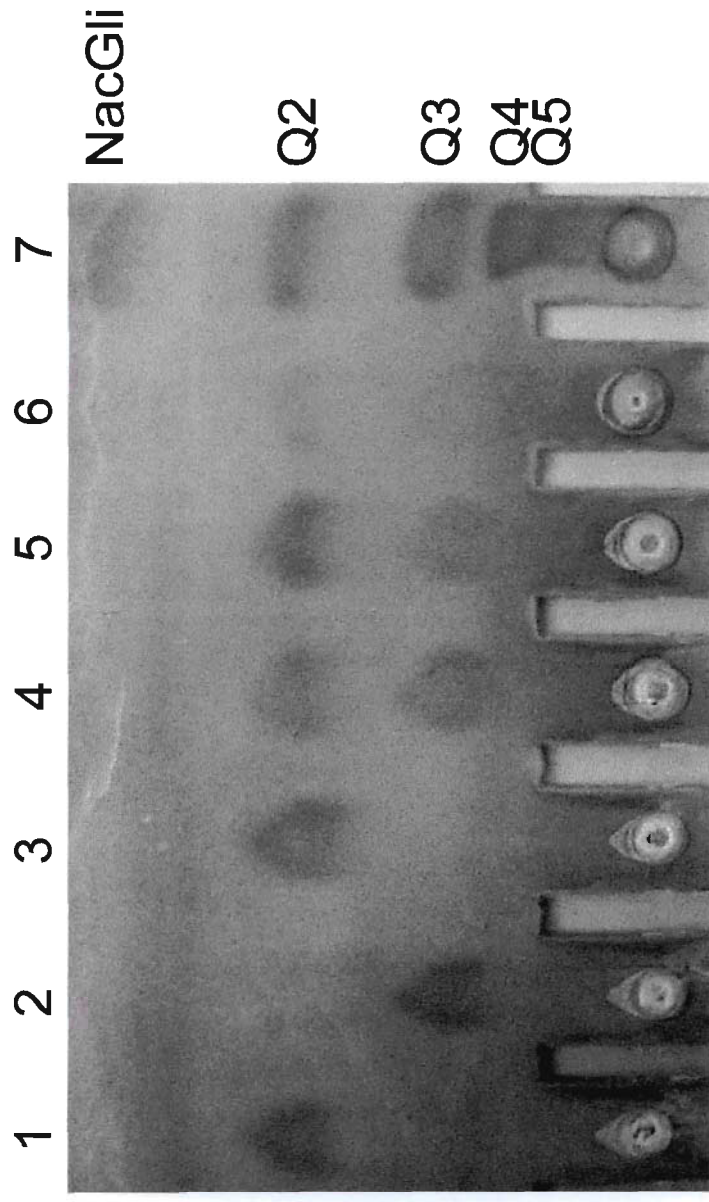


Figura 45 - Cromatografia em camada delgada dos produtos de ação da quitinase de *T. molitor* sobre diferentes substratos. 1) Ensaio sobre quibiose. 2) Ensaio sobre quitoxetose. 3) Ensaio sobre quitoxetose. 4) Ensaio sobre quitoxetose. 5) Ensaio sobre quitoxetose. 6) Ensaio sobre quitina coloidal. 7) Padrões. NacGli - N-acetilglicosamina; Q2 quibiose; Q3 - quitoxetose; Q4 - quitoxetose; Q5 - quitoxetose.

O sequenciamento amino-terminal da enzima purificada revelou a seqüência ATDKIICFFASW. Durante as tentativas de clonagem da cisteína proteinase intestinal de *T. molitor* a partir de uma biblioteca de cDNA sintetizada a partir de células do epitélio do ventrículo do inseto (Plínio Tadeu Cristofolletti Jr., comunicação pessoal), um clone com alta similaridade com quitinases de insetos foi sequenciado por acaso. Desenhou-se um oligonucleotídeo complementar à região 5' desse clone, usado como iniciador em uma reação de PCR, de tal maneira que pôde ser obtido e seqüenciado um clone contendo a região amino-terminal da porção codificante do gene da quitinase. A seqüência codificante completa desse gene é apresentada na figura 46. A seqüência apresenta grande similaridade com outras quitinases de insetos, contendo um grande número de resíduos conservados nesse grupo de proteínas (figura 47). A seqüência de aminoácidos N-terminal obtida a partir da proteína alinha-se com os resíduos 22 a 33 codificados pelo RNA mensageiro, o que indica a existência de um peptídeo sinal (resíduos 1 a 21, figuras 46 e 47). A quitinase de *T. molitor* não possui o domínio ligante de quitina presente na quitinase de outros insetos (posições 572 a 651 do alinhamento da figura 47, correspondendo aos resíduos 478 a 535 da quitinase de *Manduca sexta*).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CCGAAAATGTTGCTAAAAACTCTCCTCTTCTTCTCAGCCGATTGGCCACCGTCCACCACCCAACCGTGGCAGACATAAAATCATCTGC 90
    M L L K T L L F F S A V L A T V H H T N A A T D K I I C

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
91  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  TTCTTCGCCAGCTGGGCTGGTTACAGAAACGGTGACGGTTCCTTCAAGCCGACGAACATCGACCCCGTCTATGCACCCATGTCAACTAC 180
    F F A S W A G Y R N G D G S F K P T N I D P S L C T H V N Y

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
181  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GCCTTCTTGGGAGTAAATGCTGATGGTACTCTGAAAATTCGACTCTTGGAACGAGTTCGATTTGGGTGGTTGCAAACGTCGAAGCT 270
    A F L G V N A D G T L K I L D S W N E V D L G G L Q N V E A

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
271  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CTCAAATCACAAAATCCAGACTTGAAGGTTCTCGTCAGTATTGGAGGTTGGAACGCCGAAACGCCATCCTTAATGGAGTGGCTGCTTCG 360
    L K S Q N P D L K V L V S I G G W N A G N A I L N G V A A S

      370     380     390     400     410     42     430     440     450
361  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  TCGTACTTCGAACCAGCTTGATTGAGATTGCATTGCCTTCTTCAATCAGTGGGGTTACGATGGGATCGATATCGACTGGGAGTATCCC 450
    S V L R T S L I Q S C I A F F N Q W G Y D G I D I D W E Y P

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
451  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GTCAACAGCGACAAGGCCAACTTCGTTAACTCCTCCAAGAAATGCGAACCGCTTTCGACGCTAGCGGCTACCTGATCACCGTTACCACC 540
    V N S D K A N F V K L L Q E M R T A F D A S G Y L I T V T T

      550     560     570     580     590     60     610     620     630
541  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  TCCTCCACACCCCTCTCTTCTACGACGTACCAGCAATCTCAGACACAGTGGATTGATCAACTTGATGACTTACGACTTCCACACAGCT 630
    S S T P L S S Y D V P A I S D T V D L I N L M T Y D F H T A

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
601  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GGTGAAACAGTTACCGGTTTGAACCTCCCGCTCTACGGCTCGTCAAGTGTCAACACTTCTGTGTTGGCTGGTGGACGCCGGAGTTGAC 720
    G E T V T G L N S P L Y G S S S V N T S V V A W L D A G V D

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
721  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GCTTCAAACACTCACCATCAGCGTACCAGTCTACGGACATTCTACTCCCTCGCTCCGAAAGCAACCAGGTCGGAGCACCAGCCACT 810
    A S K L T I S V P F Y G H S Y S L A S E S N H E V G A P A T

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
811  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  ACCGGAATCGCGGTCCTTACACTCAAAGTCTGGAGTCTTGGGCTACAATGAAATTTGCGAATTCTACGATGACTGGACCAGAGTTGG 900
    T G I G G P Y T Q S P G V L G Y N E I C E F Y D D W T R V W

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
901  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GTAGATGACGCCAAAGTACCATACAAATATGATGGTAGCAACTGGGTCAGCTATGATGATGCTGAGTCCATTGGTTTGAAGACCAAGTTT 990
    V D D A Q V P Y K Y D G S N W V S Y D D A E S I G L K T K F

      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
991  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  GCTGTGATAATGGATTGGCTGGTGTGCTGTTGGTCCATTGACACTGACGATTTTCTTTCCACCTGCGGTGACACGATCCTCTACTT 1080
    A V D N G L A G V A V W S I D T D D F L S T C G V H D P L L

      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
1081  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
  CAAGCCATCAAAGACAACCTTTCGGCTTAGATAAGATGATTCTTAAAAATCTTGTAACCACGTTTCATTAAATGTTTAAATAAAAA 1170
    Q A I K D N L S A *

      ....|..
1171 AAAAAA 1177

```

Figura 46 – Seqüência de nucleotídeos dos clones obtidos a partir da biblioteca de cDNA de *T. molitor* codificantes da quitinase digestiva das larvas desse besouro. Na linha inferior, a seqüência de amino-ácidos correspondente.

	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600																								
Bombyx mori	TT-----	PTPEWARPPSTPSDPSGDP	---P	TTT	---TTVKP	TTTRTARPT	---TTTKVPH	---G	TTTEEDFDINVR	---PEVEEL	PTENEVDNADV	CNSE--	DDYV	PD	KK	KECSKY	WRCVNG--	EGV																					
Manduca sexta	TT-----	PTPEWARPPSTPSDPSGDP	---P	TTT	---TTVKP	TTTRTARPT	---TTTKVPH	---G	TTTEEDFDINVR	---FQVDEL	PTENEVDNADV	CNSE--	DDYV	PD	KK	KECSKY	WRCVNG--	EGV																					
Helicoverpa armigera	TT-----	PTPEWARPPSTPSDPSGDP	---P	TTT	---AKP	STTKTKTKTKTT	---TTAKPEO	---SV	IDEENDINVRPE	SKPE---	FOPE	REVEV	PTENEVDG	SH	ICNSD	---ODY	IP	DK	KGDKY	WRCVNG--	EAM																		
Spodoptera litura	TT-----	PTPEWARPPSTPSDPSGDP	---P	TTT	---TTK	PTAKPTTAKPA	QVVTTIP	DD	ENDIAVRPE	PKKPV7	PTFPV	PE	SAET	PTENEI	DH	DCNSE	---EDYV	PD	KK	KCKY	WRCVNG--	QGM																	
Hyphantria cunea	ST-----	PTPEWARPPSTPSDPSGDP	---P	TTT	---TTI	OP---PTTKV	TT---TS	---E	APEDPV	KDENDIEVR	PQPTK	---E	PE	FAVP	---A	EV	PE	HSI	DN	EDV	CNSE--	DDYV	PD	KK	KNQDKY	WRCVNG--	KGM												
Choristoneura fumiferana	TT-----	PTPEWARPPSTPSANPSEGAPI	---P	TTT	---PTT	IAKPKVAVKPV	TKVPSKPTTN	---AA	PTTKA	PEAEV	KEPEAP	IPV	VEIP	---D	V	---E	Q	PT	NE	DH	DCNSE	---EDYV	PD	KK	KCKY	WRCVNG--	EGV												
Aedes aegypti	TT-----	MP	PSVAP	TT	STVAP	TTT	PGANP	GTQPP	---T	SDAPN	---H	TT	STTT	---S	GD	PC	AG	GRY	---G	F	V	P	H	E	T	NC	ARY	YI	CL	TAD	YY								
Anopheles gambiae	IN-----	QL	FSN	PI	Q	TSVSP	---S	LR	---D	CP	---S	---D	GL	YAN	---E	PK	CS	R	F	Y	Q	CL	KG	---V	R	E													
Glossina morsitans	---	TL	ND	AV	IT	LD	EL	KE	NI	EG	NK	DK	DO	---N	K	P	S	PA	K	AP	T	L	S	C	F	S	L	I	A	L	C	L	S	A	S	M	K	L	
Chironomus tentans	---	TL	ND	AV	IT	LD	EL	KE	NI	EG	NK	DK	DO	---N	K	P	S	PA	K	AP	T	L	S	C	F	S	L	I	A	L	C	L	S	A	S	M	K	L	
Chironomus sp.	---	ET	K	R	N	N	V	P	D	D	O	P	A	P	R	S	F	A	E	D	S	A	P	A	P	E	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Tenebrio molitor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Phaedon cochleriae	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bombyx mori																																							
Manduca sexta																																							
Helicoverpa armigera																																							
Spodoptera litura																																							
Hyphantria cunea																																							
Choristoneura fumiferana																																							
Aedes aegypti																																							
Anopheles gambiae																																							
Glossina morsitans																																							
Chironomus tentans																																							
Chelonus sp.																																							
Tenebrio molitor																																							
Phaedon cochleriae																																							

Figura 47 - Alinhamento das seqüências de amino-ácidos das quitinases de insetos da família 18 das glicosil-hidrolases descritas até o momento. Resíduos invariantes em cinza. Resíduos catalíticos em fundo negro. O peptídeo sinal da quitinase de *Manduca sexta* encontra-se sublinhado (posições 10 a 24 do alinhamento). A seqüência amino-terminal obtida para a quitinase de *T. molitor* encontra-se em negrito (posições 33 a 44 do alinhamento). A seqüência correspondente ao conector rico em serinas e treoninas da quitinase de *M. sexta* encontra-se com sublinhado duplo (posições 439 a 571). O domínio ligante de quitina da quitinase de *M. sexta* encontra-se dentro do retângulo (posições 572 a 631). As seqüências são de *B. mori* (Lepidoptera, genebank nº AAA47538.1), *B. mandarina* (Lepidoptera, genebank nº AAG47800.1), *Manduca sexta* (Lepidoptera, genebank nº BAB12678.1), *Hypantria cunea* (Lepidoptera, genebank nº AAB47539.1), *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, genebank nº AAM43792.1), *Aedes aegypti* (Diptera, genebank nº AAB81849.1), *Anopheles gambiae* (Diptera, genebank, AAB87764.1), *Glossina morsitans* (Diptera, genebank nº CAA73686.1), *Chelonus sp.* (Hymenoptera, genebank nº AAA61639.1), *Tenebrio molitor* (Coleoptera, genebank nº AAP9218.1), *Phaedon cochleriae* (Coleoptera, genebank nº CAA77014.1)

3.12. Sistemas celulásicos de *Periplaneta americana*, *Abracris flavolineata* e *Tenebrio molitor*. Purificação de proteínas ligantes de papel.

As frações solúveis dos ventrículos de *P. americana*, *T. molitor* e o regurgitado de *A. flavolineata* possuem consideráveis atividades sobre carboximetilcelulose (ver tabela 27). Para saber se os sistemas digestivos desses insetos são capazes de hidrolisar eficientemente celulose cristalina, foram feitos ensaios sobre Avicel de longa duração com esses materiais. Mediu-se a liberação de açúcares redutores em solução.

Tabela 27 - Atividades hidrolíticas sobre carboximetilcelulose no tubo digestivo de diferentes insetos.

Inseto	mU/animal	mU/mg
<i>Periplaneta americana</i>	290	8
<i>Abracris flavolineata</i>	15	1,8
<i>Tenebrio molitor</i>	1	8

Os resultados são a média de 4 ensaios do homogeneizado total do tubo digestivo (*P. americana* e *T. molitor*) ou do regurgitado (*A. flavolineata*). O desvio das médias manteve-se abaixo de 20% da média.

P. americana possui em seu ventrículo um sistema celulásico incompleto, pois a fração solúvel do ventrículo do inseto é capaz de hidrolisar

apenas 3% das ligações glicosídicas presentes na Avicel, o que corresponde à porção amorfa do substrato (figura 48A). O regurgitado de *A. flavolineata* é capaz de hidrolisar em um curto espaço de tempo cerca de 9% das ligações presentes na Avicel (figura 48B). Embora esse valor corresponda à hidrólise de porções cristalinas do substrato, ele se mantém constante ao longo do tempo. Não é possível saber se as celulasas presentes nesse material são instáveis ou se há uma porção cristalina do substrato que é mais acessível às enzimas do inseto, sendo o resto inacessível.

O sistema celulásico presente na fração solúvel do ventrículo de *T. molitor* é capaz de digerir extensivamente a Avicel (figura 48C), o que indica a existência de um sistema celulásico completo.

Em seguida tentamos isolar proteínas com capacidade de ligação às fibras de celulose presentes em papel. Isso não só serviria como uma forma rápida de purificar essas proteínas, mas também ajudaria a compreender por que alguns insetos são capazes de hidrolisar eficientemente celulose cristalina e outros não. Após incubar as frações solúveis dos ventrículos de *P. americana* e *T. molitor*, e o regurgitado de *A. flavolineata* com papel Whatman, esse papel foi lavado sucessivas vezes com tampão. Não se observou o enriquecimento de nenhuma proteína nessas lavagens (dados não apresentados). Entretanto, lavando-se o papel com uma solução de detergente não iônico (Tween20), verificou-se a eluição de proteínas do papel (figura 49) com massa moleculares relativas (SDS_PAGE) de 12 e 15 kDa (*P. americana*), 12, 14 e 20 kDa (*A. flavolineata*) e 12, 15 e 30 kDa (*T. molitor*).

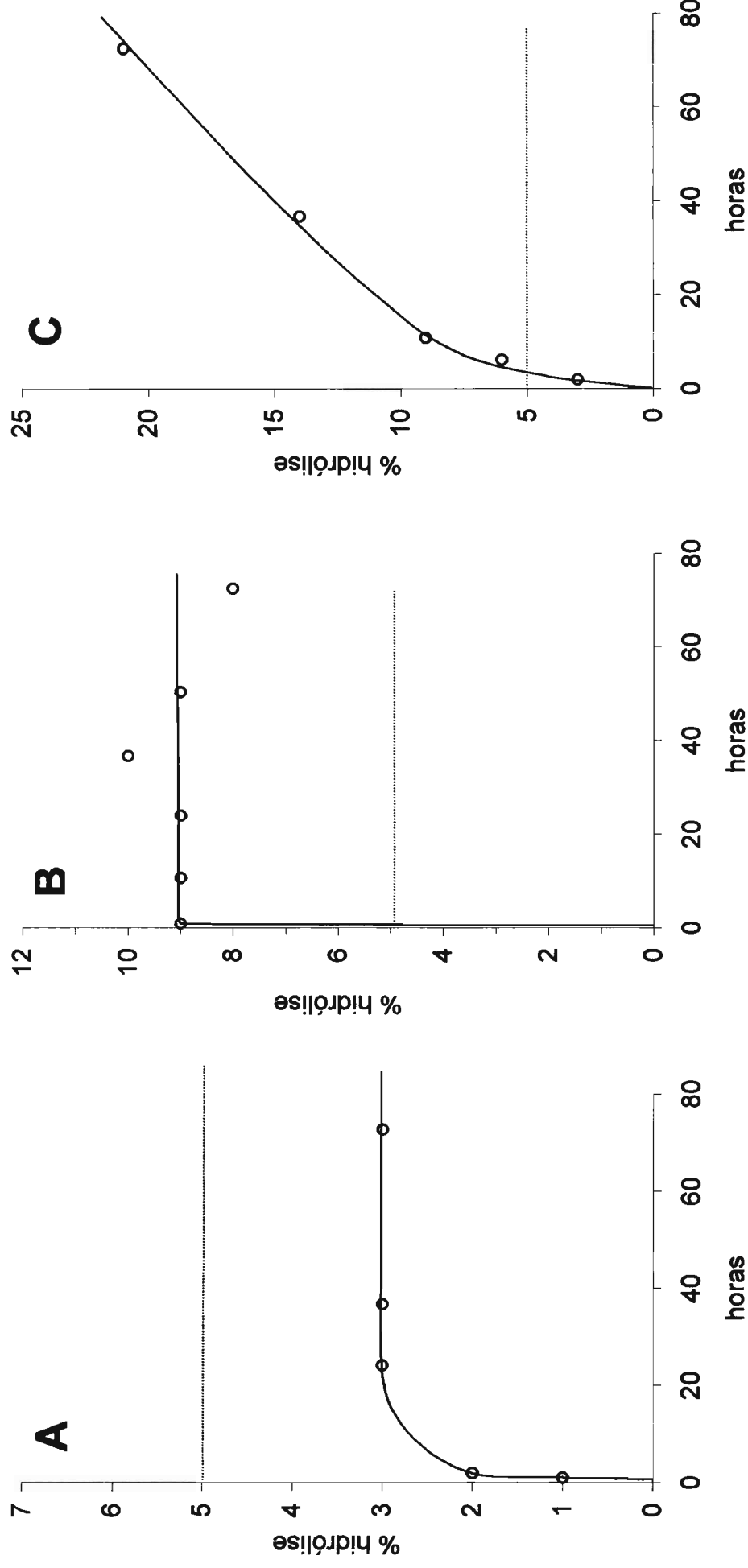


Figura 48 - Ensaio de hidrólise de celulose cristalina (Avicel). A) Ensaio da fração solúvel do ventrículo de *Periplaneta americana*. B) Ensaio da fração solúvel do regurgitado de *Abracris flavolineata*. C) Ensaio da fração solúvel do ventrículo de *Tenebrio molitor*. A linha pontilhada delimita o limite de digestão conhecido para sistemas celulásicos incompletos.

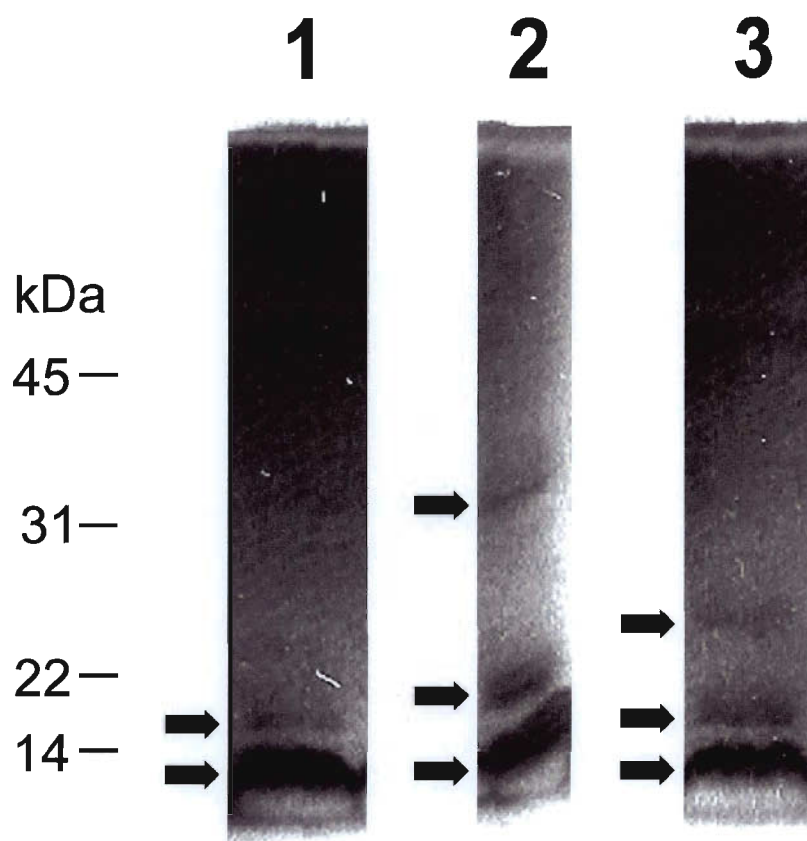


Figura 49 -SDS-PAGE do lavado com detergente (Tween 20) de papel Whatman com proteínas ligantes de papel. Raia 1 - Proteínas ligantes da fração solúvel do ventrículo de adultos de *Periplaneta americana*. Raia 2 - Proteínas ligantes da fração solúvel do regurgitado de adultos de *Abracris flavolineata*. Raia 3 - Proteínas ligantes da fração solúvel do ventrículo de larvas de *Tenebrio molitor*. As setas escuras indicam as bandas das proteínas ligantes. Os traços indicam a migração de padrões de massa molecular.

3.13. Purificação de proteínas ligantes de pachyman.

As frações solúveis dos ventrículos de *P. americana* e *T. molitor*, e o regurgitado de *A. flavolineata* foram incubados com pachyman (β -1,3-glucana linear insolúvel de *Poria cocos*). A lavagem do polisacarídeo com tampão após incubação não revelou o enriquecimento de nenhuma proteína particular (dados não apresentados). Entretanto, a lavagem desses precipitados com detergente não iônico (Tween 20) revelou que ao polisacarídeo estavam adsorvidas proteínas (figura 50) com massas moleculares relativas (SDS-PAGE) de 11, 21 e 38 kDa (*P. americana*), 11, 22 e 43 kDa (*A. flavolineata*) e 11, 23 e 37 kDa (*T. molitor*).

3.14. Atividades de polisacaridases no tubo digestivo de *Spodoptera frugiperda*.

Pudemos encontrar na fração solúvel do ventrículo de *S. frugiperda* diversas atividades de polisacaridases. O tubo digestivo desse inseto mostrou-se especialmente rico em β -1,3-glucanases (tabela 28), sendo a atividade sobre laminarina comparável à atividade de amilase. A determinação de pH ótimo das atividades sobre diferentes substratos presentes na fração solúvel (figura 50) revelou que nesse inseto apenas três enzimas possuem o pH ótimo deslocado para valores alcalinos, em conformidade com o pH fisiológico da digestão em Lepidoptera - são os casos de uma das pectinases, da laminarinase e da amilase do animal (figuras 51B, 51D e 51F).

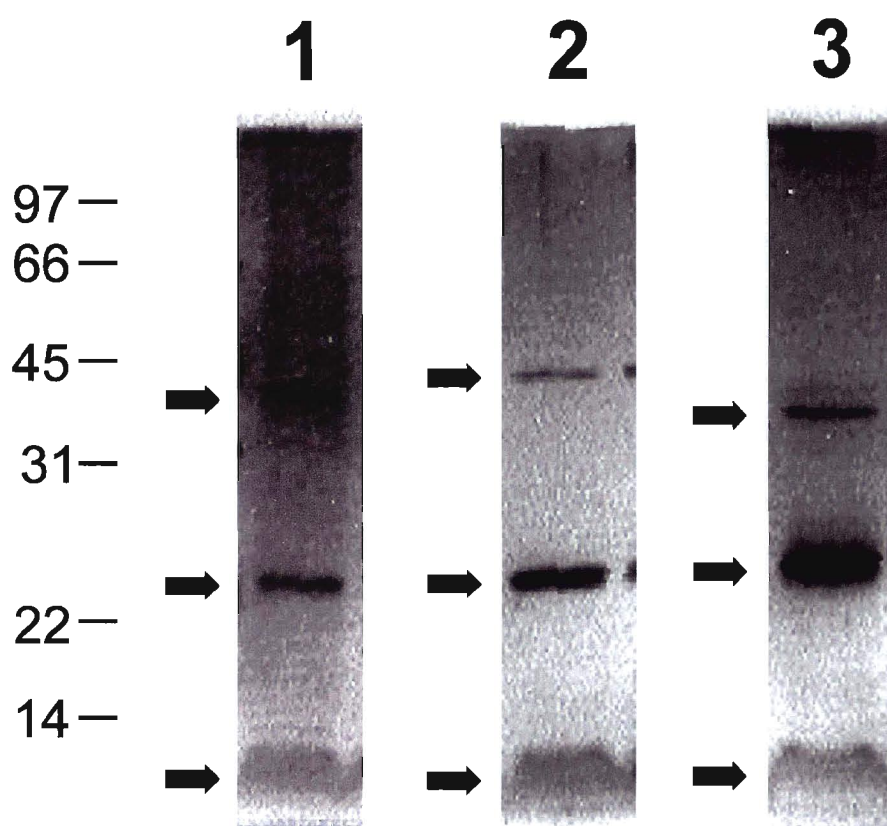


Figura 50 -SDS-PAGE do lavado com detergente (Tween 20) de pachyman contendo proteínas ligantes dessa β -1,3-glucana. Raia 1 - Proteínas ligantes da fração solúvel do ventrículo de adultos de *Periplaneta americana*. Raia 2 - Proteínas ligantes da fração solúvel do regurgitado de adultos de *Abracris flavolineata*. Raia 3 - Proteínas ligantes da fração solúvel do ventrículo de larvas de *Tenebrio molitor*. As setas escuras indicam as bandas das proteínas ligantes. Os traços indicam a migração de padrões de massa molecular.

Tabela 28 - Atividades por animal e atividades específicas de diferentes polissacaridasas na fração solúvel do ventrículo de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Substrato	mU/animal	mU/mg
amido solúvel	120	83
laminarina	28	20
liquenana	11	7
xilana	10	7
pectina	6	4
dextrana	0,7	0,5
CMC	0,5	0,4
quitina coloidal	0	0

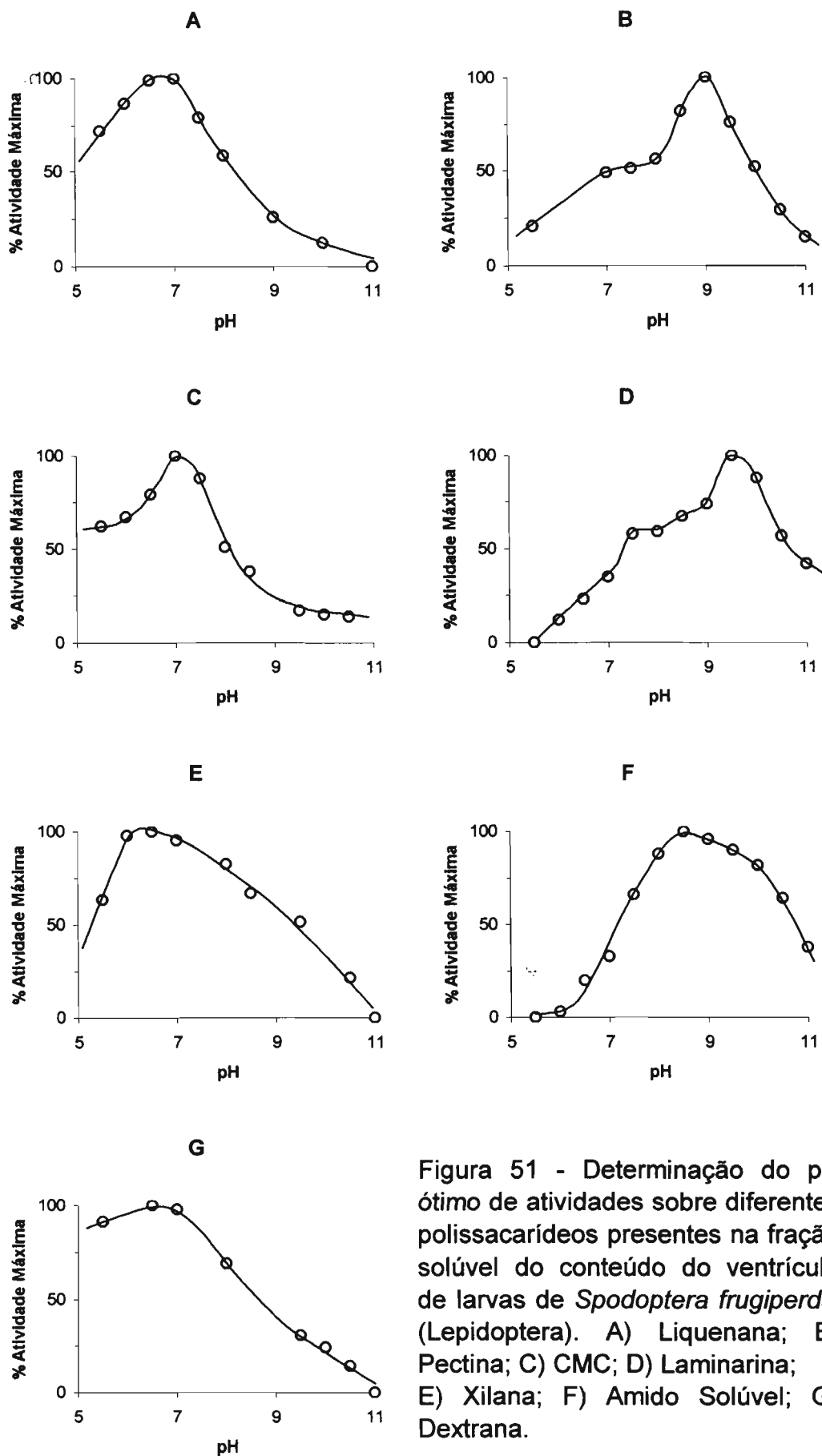


Figura 51 - Determinação do pH ótimo de atividades sobre diferentes polissacarídeos presentes na fração solúvel do conteúdo do ventrículo de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). A) Liquenana; B) Pectina; C) CMC; D) Laminarina; E) Xilana; F) Amido Solúvel; G) Dextrana.

4. Discussão

4.1. Secreção de β -1,3-glucanases pelas glândulas salivares de *Periplaneta americana*.

As enzimas digestivas presentes no intestino de insetos não são necessariamente sintetizadas pelo animal. Em inúmeros casos observou-se que o alimento ingerido pode ser uma importante fonte de enzimas digestivas. Em *Scaptotrygona bipunctata* (Hymenoptera), uma cisteína proteinase presente no tubo digestivo é proveniente do pólen ingerido (Schumaker *et al.*, 1993). Em *Tenebrio molitor*, verificou-se que boa parte das atividades de aminopeptidase e celulase encontradas no intestino médio é proveniente do farelo de trigo usado na alimentação das larvas do inseto (Terra *et al.*, 1985). Grande parte das atividades enzimáticas encontradas no tubo digestivo de adultos de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*) provém das células do fungo cultivado pelas colônias desses insetos (Silva *et al.*, 2003). Inúmeras espécies de cupins da família Termitidae têm o hábito de cultivar em seus ninhos colônias de fungos, que são a fonte de muitas das enzimas digestivas do inseto, como celulase, xilanase e amilase (Abo-Khatwa, 1978; Martin & Martin, 1978; Rouland *et al.*, 1988; Rouland *et al.*, 1991). A aquisição de enzimas digestivas do alimento já foi descrita para um grande número de organismos xilófagos como vespas, cupins, besouros cerambicídeos e formigas cortadeiras (Martin, 1987).

Em certos casos, algumas das enzimas digestivas do inseto podem ser secretadas por componentes da flora intestinal ou simbiotes. O exemplo mais conhecido é o da secreção de celulases por protozoários presentes no intestino posterior de cupins inferiores (Cleveland, 1924; Chapman, 1998; Martin, 1991). Assim sendo, antes de proceder ao estudo de uma enzima digestiva em insetos, é necessário determinar qual é o seu verdadeiro sítio de secreção.

Os dados obtidos a respeito das atividades de β -1,3-glucanases em *P. americana* indicam fortemente que essas enzimas são secretadas pelo inseto, não sendo provenientes do alimento ou da flora presente no intestino posterior. As 3 β -1,3-glucanases digestivas desse inseto são secretadas principalmente pelas glândulas salivares, o que exclui a possibilidade de que essas enzimas sejam secretadas por simbiotes presentes no intestino médio. É improvável que essas enzimas sejam secretadas pelo epitélio do ventrículo.

Não é possível excluir a possibilidade de que parte da atividade sobre outras β -glucanas como carboximetilcelulose ou β -1,3-1,4-glucanas possa ser secretada pelo epitélio do ventrículo ou por simbiotes, embora os dados obtidos indiquem que as glândulas salivares do inseto também secretam ativamente essas enzimas.

O único inseto aonde a secreção de β -1,3-glucanases foi estudada até o momento trata-se do besouro *Rhagium inquisitor* (Chipoulet & Chararas, 1984). Os autores propuseram que a síntese da enzima é realizada pelo epitélio do ventrículo. Contudo, a única evidência apontada é a atividade específica do epitélio, e seriam necessários estudos mais detalhados para elucidar esse fato. A secreção salivar de β -1,3-glucanases em *P. americana* é o

primeiro exemplo de localização inequívoca da secreção desse tipo de enzima em insetos.

A secreção salivar de enzimas é comum em insetos, embora haja grande variação nas enzimas secretadas por essa glândula. A secreção salivar de celulase por cupins inferiores (*Reticulitermes speratus*, Watanabe *et al.*, 1997; *Neotermes koshunensis*, *Hodotermopsis japonica* e *Mastotermes darwiniensis*, Lo *et al.*, 2000) e baratas (*Panesthia cribrata*, *P. americana*; Lo *et al.*, 2000) já foi bem caracterizada e, em um caso (*Neotermes koshunensis*, Tokuda *et al.*, 2002), observou-se também a secreção de β -glicosidase. Em *P. americana*, são conhecidas evidências da existência de uma amilase salivar diferente da encontrada no intestino médio (Bell & Adiyodi, 1982). A secreção salivar de β -1,3-glucanases e celulases nesse inseto é coerente com o papel que essas enzimas teriam na digestão inicial do alimento.

4.2. Secreção de enzimas no ventrículo de larvas de *Tenebrio molitor*.

É improvável, à semelhança do observado em *P. americana*, que a atividade de laminarinase de *T. molitor* seja proveniente do alimento. Considerando que nesse inseto ocorre uma taxa de excreção de enzimas insignificante (Terra *et al.*, 1985), o organismo teria que concentrar as enzimas presentes em uma massa de farelo 26 vezes maior do que a a massa de seu tubo digestivo.

No caso de *T. molitor* é improvável que as glândulas salivares do inseto participem ativamente na secreção de enzimas, pois nesse inseto essas

glândulas são vestigiais. Entretanto, até o presente momento não era possível saber se enzimas como laminarinase, liquenase, celulase, quitinase e lisozima eram secretadas pelo inseto ou por sua flora intestinal. Como a secreção de algumas dessas enzimas é muito comum em bactérias e fungos, foi necessário descartar essa possibilidade antes de estudar algumas das enzimas digestivas do inseto em detalhe.

A secreção de amilase e β -glicosidase pelas células colunares do epitélio do ventrículo de *T. molitor* já foi comprovada através de técnicas de imunocitocalização (Cristofolletti *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002). A presença dessas atividades nos insetos sem flora intestinal confirma os resultados obtidos nesses trabalhos. A presença das atividades de lisozima, celulase, liquenase, quitinase e laminarinase nos insetos sem flora intestinal confirma que o inseto é capaz de secretar ativamente essas proteínas para o lúmen do ventrículo. Trata-se da primeira confirmação da secreção de laminarinases por células do epitélio do ventrículo de insetos.

Foram observadas, entretanto, mudanças nos níveis de secreção de algumas das enzimas estudadas. Três padrões de resposta puderam ser identificados na ausência de flora intestinal - enzimas que não tiveram o seu nível de expressão alterado (amilase), enzimas que tiveram o nível de expressão diminuído (lisozima, liquenase e celulase) e enzimas que tiveram o seu nível de expressão aumentado (β -glicosidase, laminarinase e quitinase). Algumas dessas mudanças nos níveis de expressão acontecem rapidamente, pois respostas similares foram observadas após dois dias em insetos

alimentados com antibióticos - foram os casos da laminarinase, quitinase e da β -glicosidase do inseto.

As quedas observadas nas atividades específicas de lisozima, celulase e liquenase nos insetos criados em condições estéreis podem ter duas razões. Podemos imaginar uma resposta do epitélio intestinal do inseto a níveis reduzidos do substrato da enzima ou simplesmente supor que boa parte da atividade encontrada no ventrículo do inseto é, de fato, secretada pela flora intestinal. Para o caso da atividade de lisozima, a primeira suposição parece razoável, pois bactérias, anteriormente presentes em grande número no tubo digestivo do inseto, foram retiradas da dieta. Entretanto, não é possível descartar a segunda hipótese. No caso das atividades de celulase e liquenase, a segunda hipótese parece ser verdadeira, pois não houve aparentemente mudança no conteúdo de celulose e de hemiceluloses da dieta dos animais.

É interessante observar que a celulase que é aparentemente secretada pela flora intestinal é bastante diferente da celulase que o inseto é capaz de secretar. A celulase do inseto possui uma grande afinidade pelo substrato (carboximetilcelulose), mas é expressa em quantidades muito pequenas ou é muito pouco ativa. Já a celulase proveniente da flora possui uma menor afinidade pelo substrato, mas é expressa em maior quantidade ou é mais ativa. A liquenase possivelmente secretada pela flora não possui uma afinidade muito diferente da enzima do inseto, mas sua atividade no ventrículo é bem maior (10x) do que a enzima que o inseto consegue secretar.

As três enzimas que têm a atividade aumentada nos insetos estéreis (β -glicosidase, laminarinase e quitinase) sofrem diferentes tipos de mudança na

expressão. No caso da laminarinase, observamos apenas uma maior expressão das laminarinases já existentes. Nos casos da β -glicosidase e da quitinase, verificamos a expressão diferencial de uma forma enzimática ausente ou minoritária nos insetos controle. Essas três enzimas podem estar envolvidas na digestão de fungos ingeridos pelo animal. O aumento nessas atividades, porém, é contraditório com a mudança na quantidade do possível substrato dessas enzimas (paredes celulares de fungos) na dieta, que foi suprimida. Esse tipo de resposta fisiológica seria semelhante à observada durante a inibição de algumas tripsinas de insetos, aonde se verifica uma superexpressão da enzima inibida ou a expressão de formas resistentes, diferentes da enzima expressa em condições normais (Terra & Ferreira, 2004). Não é possível saber, até o presente momento, qual seria o sinal para essa ativação da expressão. De qualquer forma, essas três enzimas (β -glicosidase, laminarinase e quitinase) parecem formar um grupo de enzimas cuja expressão é regulada conjuntamente.

4.3. Mecanismo de ação de LIQ1. Características do sítio ativo dessa enzima.

A preferência de LIQ1 pela clivagem de ligações glicosídicas do tipo β -1,3 em β -1,3-glucanas e β -1,3-1,4-glucanas (liquenana), aliada ao reconhecimento de porções internas do polissacarídeo (padrão endo) permite a classificação inicial dessa enzima no E.C. 3.2.1.6 (endo- β -1,3(4)-glucanase). Contudo, a descrição desse tipo de atividade enzimática não coincide

exatamente com a atividade observada para LIQ1. As enzimas contidas no E.C. 3.2.1.6. são caracterizadas pela hidrólise interna de ligações 1-3 ou 1-4 em β -glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é ligado à unidade glicosídica anterior pelo carbono 3. LIQ1 é capaz de clivar ligações glicosídicas β -1,3 aonde a glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é substituída no carbono 4, pois a liquenana não possui ligações β -1,3 vizinhas ao longo da cadeia.

A formação de oligossacarídeos nos estágios iniciais da clivagem de laminarina e liquenana indica que essa enzima possui processividade sobre esses substratos. Os produtos gerados por LIQ1 em seus ciclos de ataque múltiplo permitem inferir algumas características do sítio ativo. A formação preferencial de glicose e laminaripentaose a partir de laminarina indica que essa enzima reconhece resíduos de glicose formadores de ligações glicosídicas β -1,3 nos subsítios -1 e -5 ou +1 e +5, dependendo da direção do ataque múltiplo (figura 52A).

A não formação de laminaribiose, laminaritriose ou laminaritetraose indica que os subsítios -2,-3 e -4 (ou +2,+3 e +4) não reconhecem a ligação β -1,3 (figura 52A). A formação de celotetraose e celopentaose a partir de liquenana indica que esses subsítios reconhecem preferencialmente a ligação β -1,4, pois essas seqüências de ligações β -1,4 (3 ligações na celotetraose e 4 na celopentaose) são minoritárias na estrutura desse substrato, correspondendo a 4% e 9% dos celo-oligossacarídeos nessa molécula (Wood *et al.*, 1994). Dessa maneira, o sítio ativo de LIQ1 parece estar desenhado para o reconhecimento e clivagem de β -1,3-1,4-glucanas provenientes de cereais,

dado que nesses polisacarídeos as repetições de 4 e 5 ligações sucessivas β -1,4 são muito mais freqüentes (Wood *et al.*, 1994).

É importante verificar que, ao atuar sobre laminarina, LIQ1 apresenta um grau de ataque múltiplo moderado (4), que praticamente desaparece quando esta enzima tem por substrato a liquenana (0,3, ver tabela 10). Este fato por si só indica que a alternância de ligações β -1,3 e β -1,4 existente na molécula de liquenana não permite um encaixe adequado ao sítio ativo dessa enzima.

O sítio ativo de LIQ1 teria dessa maneira, pelo menos seis subsítios de interação, cinco deles relacionados com o reconhecimento de glicoses ligadas através de ligações β -1,3 e β -1,4 alternadas de acordo com o exposto na figura 52. O oligosacarídeo produzido a partir de liquenana deve ser composto por duas celotrioses ligadas através de uma ligação β -1,3 (figura 52B). Como esse é o tipo de estrutura mais freqüente nesse polisacarídeo (78%), o fato de que esse não seja o produto mais abundante indica uma ligação fraca a esse tipo de estrutura. É interessante ressaltar que a simples ocupação dos subsítios +2 e +3 (ou -2 e -3) com glicoses ligadas por ligações β -1,4 não permite a realização de uma segunda clivagem da molécula de liquenana, o que indica que as interações entre o substrato e os subsítios +4 e +5 (ou -4 e -5) são fundamentais para a continuidade dos ciclos de ataque múltiplo, apesar do fato desses subsítios interagirem com ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. Esse fato indica que o sítio ativo é estendido, ideal para o reconhecimento e hidrólise de substratos longos.

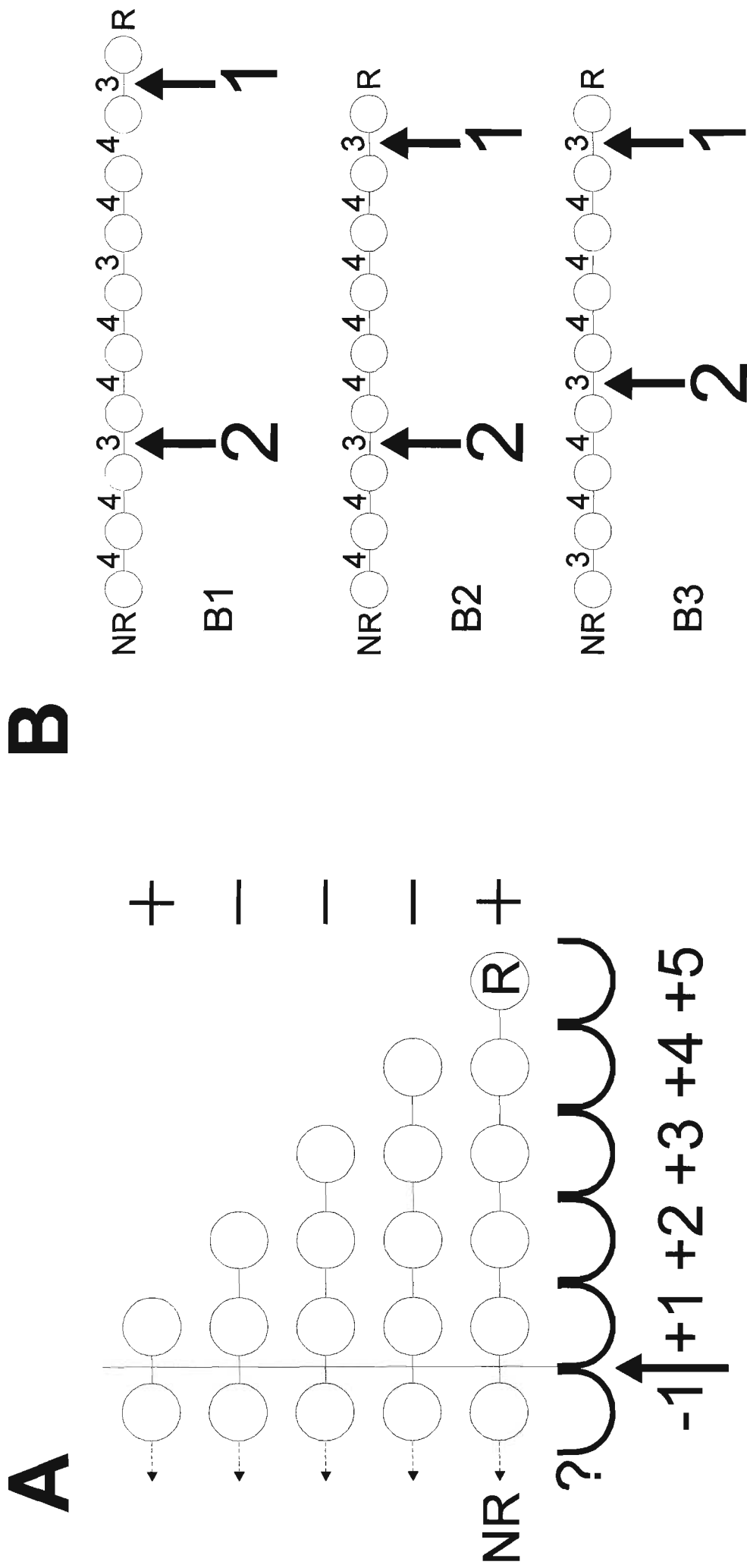


Figura 52 - Modelos para o sítio ativo e padrão de ação de LIQ1. A) Modelo para o sítio ativo de LIQ1, com a formação preferencial de glicose e laminaripentaose a partir de laminarina, adotando-se o ataque múltiplo em direção à ponta não redutora do substrato. B) Modelo para o ataque múltiplo de LIQ1 sobre liquenana. NR - ponta não redutora R - ponta redutora. (-) complexo enzima-substrato não-produtivo. (+) complexo enzima-substrato produtivo.

LIQ1 promove a lise de células de *S. cerevisiae*, o que indica que essa enzima é capaz de reconhecer a β -1,3-1,6-glucana que é um dos principais componentes da parede celular dessa levedura (Johnston, 1994). Talvez a atividade lítica dessa enzima seja limitada pelas abundantes ramificações presentes nesse polisacarídeo.

LIQ 1 possui em seu sítio ativo dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise. Um deles parece estar envolvido na formação do complexo enzima-substrato, dado que a enzima duplamente protonada não é capaz de ligar-se à moléculas de laminarina. Provavelmente o nucleófilo dessa enzima é capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com a glicose ligada ao subsítio -1 da enzima. Como o nucleófilo, em glucanases, é tipicamente um grupo carboxila da cadeia lateral de um resíduo de aspartato ou glutamato (Davies & Henrissat, 1995), é possível que esse grupo faça uma ligação de hidrogênio com a hidroxila do carbono 2 da glicose ligada ao subsítio -1, adicional ao ataque nucleofílico do carbono 1. Essa interação já foi observada no sítio ativo de algumas glicosidases (Notemboom *et al.*, 1998; Cutfield *et al.*, 1999; Sidhu *et al.*, 1999; Hrmova *et al.*, 2002). O caso de LIQ1 não deixa de ser particular, pois essa interação parece ser essencial para a ligação do substrato no sítio ativo.

Uma interação direta entre o nucleófilo e o resíduo glicosil do substrato ligado ao subsítio -1 aponta para um mecanismo com a retenção da configuração anomérica β nos produtos de reação. Nesse tipo de mecanismo, o nucleófilo interage diretamente com o carbono 1 da ligação a ser hidrolisada,

enquanto que no outro tipo de glicosil-hidrolases conhecido, o nucleófilo interage com uma molécula de água (Davies & Henrissat, 1995).

É importante ressaltar que LIQ1 não se encaixa em modelos cinéticos de equilíbrio rápido. Esse fato, aliado à observação de que as constantes de dissociação dos grupos prototrópicos envolvidos em catálise sofrem grandes alterações com a ligação do substrato, indica que essa enzima não segue as condições de equilíbrio rápido, sendo a primeira glucanase descrita a exibir essa característica. Contudo, LIQ1 não apresenta uma constante de catálise maior (1050 s^{-1}) do que as observadas em outras liquenases ($500\text{-}2250 \text{ s}^{-1}$, calculado com os dados de Planas, 2000). A utilização de modelos de estado estacionário em glicosil-hidrolases geralmente está associada ao estudo da cinética de pré-estado estacionário com substratos sintéticos (MacLeod *et al.*, 1996; Abel *et al.*, 2003), e não a um comportamento singular da enzima frente ao seu substrato natural. Seria interessante estudar as razões que levam essa enzima a possuir esse comportamento.

As características moleculares e a especificidade de LIQ1 tornam bastante provável que essa enzima seja um membro da família 16 das glicosil-hidrolases. Nessa família de enzimas, observam-se massas moleculares em torno de 25-30kDa, pH ótimo entre 6-7,5, Km para liquenana entre 0,08-0,2% (p/v), liberação de produtos com a retenção da configuração β e uma estrutura composta majoritariamente por folhas pregueadas β ("jellyroll β -sandwich", Coutinho & Henrissat, 1999; Planas, 2000). Os membros mais bem estudados dessa família são as β -1,3-1,4-glucanases bacterianas do gênero *Bacillus* (liquenases, E.C. 3.2.1.73; Planas, 2000). Essas enzimas possuem uma

especificidade bastante estrita, não sendo capazes de clivar β -1,3-glucanas e clivando apenas, em glucanas mistas, ligações β -1,4 aonde o resíduo glicosil na direção da ponta não redutora do substrato (subsítio -1) encontra-se substituído na hidroxila 3. Entretanto, muitos membros dessa família, de origem bacteriana ou fúngica, possuem uma especificidade semelhante à de LIQ1, sendo classificados como β -1,3-(4)-glucanases (Planas, 2000).

É interessante observar que o sítio ativo nas liquenases do gênero *Bacillus* possui seis subsítios de interação com resíduos de glicose, quatro (-4 a -1) em direção à ponta não redutora do substrato e dois (+1 e +2) em direção à ponta redutora (Planas, 2000). Se LIQ1 realmente for um membro dessa família de enzimas, pode-se concluir que o ataque múltiplo se dá a partir da ponta não redutora da molécula de substrato remanescente, após a primeira hidrólise, o que poderia ser generalizado para essa família de glicosil-hidrolases.

4.4. Mecanismo de ação de LAM_P. Características do sítio ativo dessa enzima.

Como LAM_P reconhece a ligação β -1,3 apenas em β -1,3-glucanas (não cliva β -1,3-1,4-glucanas) e hidrolisa preferencialmente ligações internas da cadeia polisacarídica, podemos classificar essa enzima no E.C. 3.2.1.39 (glucan-endo-(1-3)- β -D-glucosidase).

A produção de oligossacarídeos nas fases iniciais da hidrólise por LAM_P indica que essa enzima tem processividade, à semelhança do

observado para LIQ1. LAM_P possui um grande grau de ataque múltiplo, tendo a glicose como seu produto principal. A grande processividade de LAM_P indica que essa enzima muito possivelmente é capaz de passar a ramificação presente na molécula de laminarina, sendo capaz de hidrolisar a molécula até o seu final (figura 53A).

O conjunto de oligossacarídeos gerado por LAM_P ao atuar sobre laminarina permite duas interpretações quanto ao sítio ativo dessa enzima. Podemos imaginar que a glicose e a laminaribiose são geradas durante os ciclos de ataque múltiplo, e que os oligossacarídeos maiores (laminaritetraose a laminaripentaose) são liberados quando a enzima desliga-se do substrato, como parte não hidrolisada do polissacarídeo. Nesse caso, a não formação de laminaritriose seria decorrência da necessidade da ocupação de quatro subsítios de ligação no lado do sítio ativo aonde a cadeia da laminarina permanece ligada após a hidrólise (figura 53B). Nesse caso, o sítio ativo seria constituído por seis subsítios de ligação para resíduos de glicose, na forma 2+4 (figura 53B).

Alternativamente, podemos imaginar que a série completa dos oligossacarídeos produzidos por LAM_P são produtos de modos alternativos de ligação durante o ataque múltiplo. Nesse caso, o sítio possuiria sete subsítios de ligação na porção responsável pela liberação dos produtos do ataque múltiplo, sendo que no terceiro subsítio a ligação de um resíduo de glicose β -1,3 ligado é extremamente desfavorável. Nessa situação, o sítio ativo teria pelo menos oito subsítios de ligação (figura 53C). Entretanto, a primeira hipótese é a única coerente com o alto grau de ataque múltiplo exibido pela enzima, sendo dessa forma a mais provável.

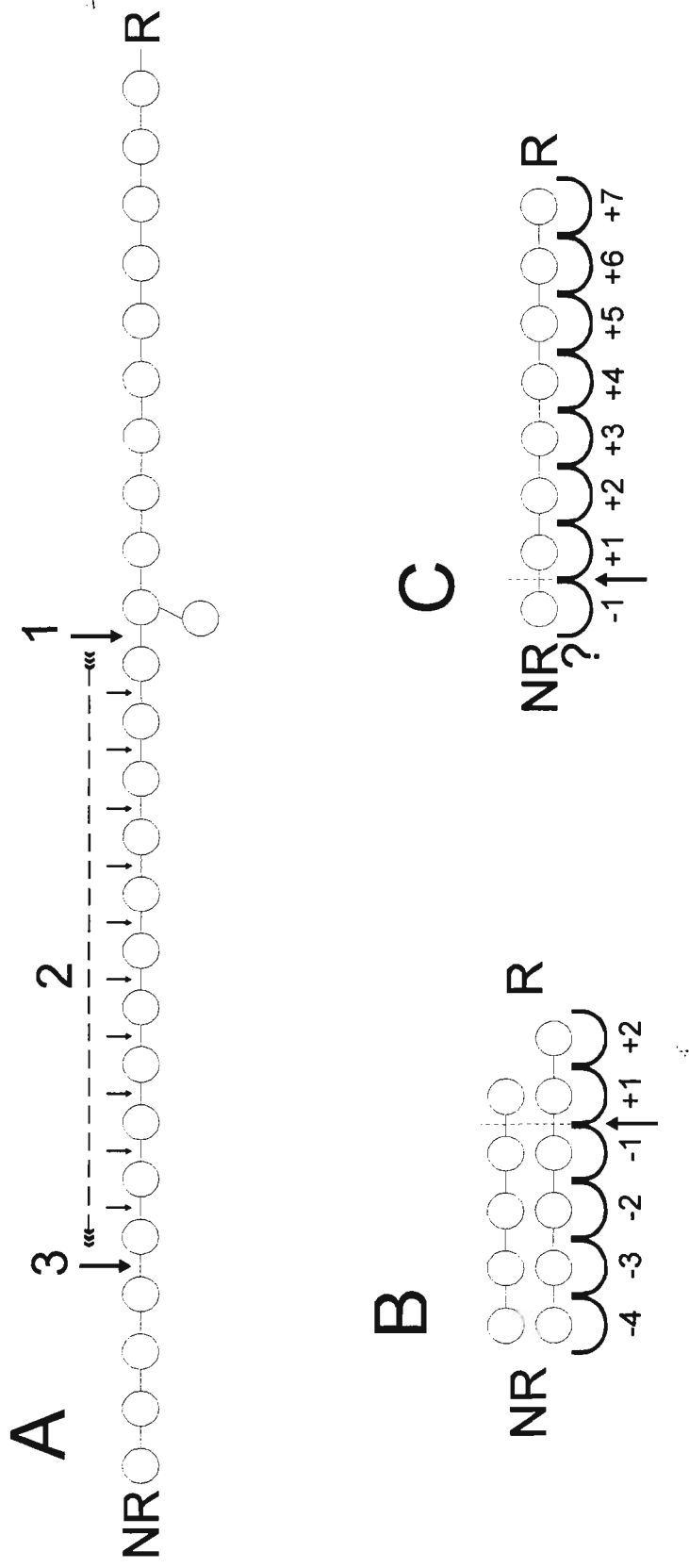


Figura 53 - Padrão de ação de LAM_P e modelos de sítio ativo propostos para essa enzima. A) Ataque múltiplo sobre uma cadeia de laminarina. 1 - clivagem inicial de porção interna da cadeia; 2 - cortes sucessivos ao longo da cadeia; 3 - corte final, com dissociação do complexo enzima-substrato e liberação de um oligossacarídeo com pelo menos 4 glicoses. B) Modelo de sítio ativo com formação de glicose e laminaribiose nos ciclos de ataque múltiplo. C) Modelo de sítio ativo com formação da série de oligossacarídeos completa nos ciclos de ataque múltiplo. R - ponta redutora; NR - ponta não redutora do substrato.

LAM_P possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise no seu sítio ativo. Como as constantes de dissociação desses grupos não se alteram com a ligação do substrato, é provável que LAM_P siga condições de equilíbrio rápido, diferentemente de LIQ1. Coerente com essa hipótese, o valor de k_{cat} observado para essa enzima (81 s^{-1}) é muito inferior ao medido para LIQ1 (1050 s^{-1}). Também é improvável que os grupos prototrópicos estejam envolvidos diretamente na formação do complexo enzima-substrato, como observado para LIQ1.

A presença de LAM_P propicia a lise hipotônica de células de *S. cerevisiae*, o que indica que essa enzima consegue clivar a β -glucana da parede celular dessa levedura. Contudo, a lise é limitada a uma parte da população das células. Talvez a presença de muitas ramificações nessa glucana torne-a um mau substrato para a enzima. Apesar de LAM_P poder aparentemente passar pela ramificação presente na laminarina, é necessário ter em mente que na glucana de *S. cerevisiae*, além de serem muito mais freqüentes, as ramificações se estendem como uma nova cadeia de β -1,3-glucana, sendo muito mais volumosas do que as ramificações da laminarina, compostas por apenas uma glicose.

Outro aspecto digno de nota é a inibição que LAM_P sofre em altas concentrações de laminarina. Duas hipóteses foram levantadas para explicar esse fenômeno - transglicosilações por parte da enzima, em alta concentração de grupos aceptores, ou a formação de complexos enzima-substratos não-produtivos, devido a modos alternativos de ligação do substrato no sítio ativo da enzima (figura 54). Essas alternativas foram estudadas em mais detalhe tomando como modelo outra das enzimas estudadas, LAM_A (ver abaixo).

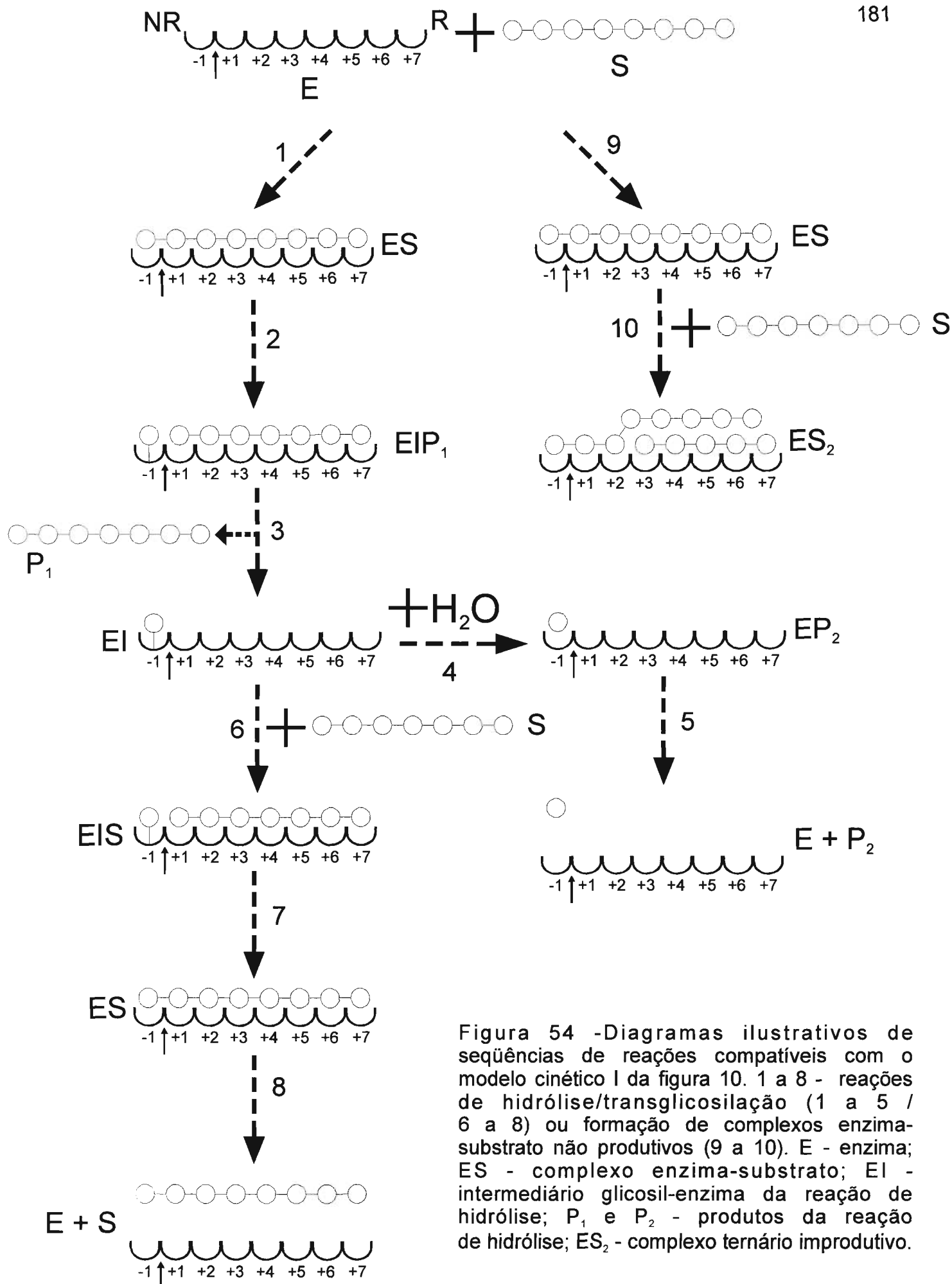


Figura 54 - Diagramas ilustrativos de seqüências de reações compatíveis com o modelo cinético I da figura 10. 1 a 8 - reações de hidrólise/transglicosilação (1 a 5 / 6 a 8) ou formação de complexos enzima-substrato não produtivos (9 a 10). E - enzima; ES - complexo enzima-substrato; EI - intermediário glicosil-enzima da reação de hidrólise; P_1 e P_2 - produtos da reação de hidrólise; ES_2 - complexo ternário improdutivo.

4.5. Mecanismo de ação de LAM_A. Características do sítio ativo dessa enzima.

O pH ótimo (6) e os principais produtos da hidrólise de laminarina (glicose 2:1 laminaribiose) por LAM_A já eram conhecidos (Genta, Marana, Terra e Ferreira, dados não publicados). Também já se sabia que essa enzima é capaz de clivar β -1,3-1,4-glucanas, embora com menor eficiência.

O simples tratamento da laminarina com borohidreto (destruição da ponta redutora) não causa a redução na atividade da enzima sobre esse substrato, o que indica que LAM_A não reconhece a ponta redutora do polisacarídeo. A menor atividade de LAM_A após o tratamento desse substrato com periodato, com a destruição adicional da ponta não redutora, indica que essa enzima é uma exo-glucanase que atua pela ponta não redutora do polissacarídeo. A semelhança de valores entre a queda de atividade (64%) e a porcentagem de glicose entre os produtos gerados pela enzima (61%) sugere que essa queda de atividade se dá apenas pela incapacidade de clivagem da primeira ligação glicosídica da cadeia. A enzima seria capaz de realizar a hidrólise da segunda ligação glicosídica, o que corresponderia à formação original de laminaribiose a partir do substrato não-modificado (figura 19). Isso indicaria que a eficiência da hidrólise da segunda ligação não foi afetada, o que implica na inexistência de um subsítio -2 (afinidade de ligação para glicose no subsítio ausente ou pequena) no sítio ativo dessa enzima.

Dadas a especificidade e o padrão de ação dessa enzima (exo- β -1,3-glucanase) o E.C. que melhor descreve LAM_A é o E.C. 3.2.1.58 (glucan-(1-3)-

β -glucosidase). Entretanto, esse E.C. não faz menção à hidrólise de β -1,3-1,4-glucanas como liquenana.

Das enzimas estudadas, LAM_A é a que sofre a inibição mais intensa por altas concentrações de laminarina. Os dados cinéticos obtidos puderam ser ajustados a dois modelos cinéticos (figura 11).

O modelo 1 pode ser interpretado como resultado da capacidade de LAM_A de realizar transglicosilações com grande eficiência. Também pode ser o resultado da ligação seqüencial de duas moléculas de laminarina no sítio ativo da enzima, formando um complexo não-produtivo (figuras 11 e 54).

O modelo 2 (figura 11) indica a existência de dois sítios de ligação para o substrato, cuja ligação a moléculas de laminarina é até certo ponto independente. É interessante observar que em nenhum dos casos o valor obtido para o parâmetro α mostrou-se maior do que 1, indicando sítios de ligação independentes ou até cooperativos. Entretanto, a formação de um complexo ternário, com os dois sítios de ligação para o substrato ocupados, levaria a uma forma da enzima menos ativa ($\beta < 1$).

O estudo da cinética da hidrólise de laminariitol (laminarina reduzida com periodato e oxidada com borohidreto, com as pontas não-redutora e redutora modificadas) por LAM_A permitiu testar esses modelos. Partindo-se do princípio de que o laminariitol seja um acceptor em reações de transglicosilação pior do que a laminarina - o que parece razoável, dado que o resíduo glicosil da ponta não redutora foi destruído - espera-se que a inibição por altas concentrações de substrato seja reduzida ou ausente para o laminariitol, se a principal causa da inibição forem transglicosilações. Como a

inibição pelo substrato não sofreu nenhuma alteração, é improvável que essas seja a causa desse fenômeno.

A produção de glicose a partir do laminariitol indica que LAM_A possui processividade, pois moléculas de glicose nunca poderiam ser geradas diretamente pela hidrólise da ponta não redutora desse substrato. Assim sendo, LAM_A consegue, após a hidrólise inicial da ponta do polissacarídeo, permanecer ligada à porção remanescente da cadeia, efetuando quebras no que correspondia inicialmente a porções internas do polissacarídeo. Esse fato caracteriza LAM_A como uma $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanase com padrão de ação de cadeia única, aonde uma molécula do substrato pode ser extensivamente hidrolisada (Bochkov *et al.*, 1972).

A inibição de LAM_A por altas concentrações de laminariitol indica que essa inibição é fruto na verdade de modos não produtivos de ligação entre enzima e substrato. Restaria saber se essa inibição se dá pela ligação de duas moléculas de laminarina ao sítio ativo da enzima, pela ligação de uma segunda molécula de laminarina a uma porção do sítio ativo inicialmente inacessível (modelo 1 da figura 11), ou pela ligação de moléculas de laminarina a um sítio acessório (inibitório) de ligação ao substrato (modelo 2 da figura 11).

O sítio ativo em glucanases é caracterizado pela presença de um número elevado (>4) de subsítios de ligação para glicose, o que poderia explicar uma ligação sequencial de uma segunda molécula de laminarina ao sítio ativo, formando um complexo ternário (figura 54). Contudo, não é possível explicar por que esse complexo ternário sequencial seria improdutivo ou, além disso, por que uma ligação não produtiva inicial não poderia ocorrer (figura 54).

É possível imaginar, entretanto, que a ligação inicial de um complexo não-produtivo ocorra, mas que essa molécula de substrato seja passível de hidrólise devido à processividade da enzima. A ocorrência de um modo não-produtivo durante ou após um ciclo de hidrólise poderia resultar em uma enzima não-produtiva devido a razões conformacionais.

Apesar de existirem na literatura relatos da permanência de produtos no sítio ativo de glucanases, é pouco provável que o substrato não seja capaz de deslocá-los, pois geralmente a constante de dissociação desses produtos é bem maior do que a constante de Michaelis para o polissacarídeo (Sulzenbacher *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1998). Também não existem evidências de que a inibição por um produto nessas enzimas leve à existência de um modo conformacional inativo. A ocorrência de processividade em glucanases é um fato extensamente documentado (Sakon *et al.*, 1997; Varrot *et al.*, 1999; von Ossowski *et al.*, 2003), e não há evidências de mudanças de conformação no sítio ativo da enzima relacionadas com esse fenômeno (von Ossowski *et al.*, 2003). Além disso, é pouco provável que um mesmo sítio ativo da enzima possa acomodar duas moléculas de laminarina, dado o tamanho desse substrato. Embora tanto a inibição por moléculas do substrato como a processividade sejam fenômenos muito pouco estudados, existem inúmeros relatos da existência em enzimas de sítios acessórios, sem atividade hidrolítica, para a ligação de glucanas solúveis ou insolúveis (CBDs, Carbohydrate Binding Domains; Coutinho & Henrissat, 1999). Dessa maneira, a ocorrência de dois sítios de ligação ao substrato nessa enzima parece ser a hipótese mais provável.

A provável existência de um sítio acessório de ligação ao substrato permitiu a elaboração de uma hipótese na qual esse sítio estaria envolvido no mecanismo de processividade da enzima (figura 55). Dessa maneira, a processividade seria o resultado da ligação alternada do substrato aos dois sítios de ligação, e a inibição observada seria o resultado da ocupação simultânea dos dois sítios da enzima, levando a uma enzima não processiva. Em um ciclo normal de catálise, a ligação de uma molécula de laminarina (ou de um produto de hidrólise) se daria inicialmente no sítio ativo, dado que o valor da constante de Michaelis é menor que o valor da constante de dissociação do complexo "inibitório". O produto de cadeia longa, após a catálise, liga-se então ao sítio inibitório, permanecendo nas proximidades do sítio ativo. A transformação do complexo "inibitório" em um complexo ativo não afeta a interpretação dos dados cinéticos, sendo possível construir um modelo cinético (de estado estacionário) mais completo (modelo 3, figura 56).

A relação entre processividade e inibição pelo substrato pode ser testada. De acordo com esse modelo, a enzima inibida (ES_2) não tem processividade, possuindo então um mecanismo conhecido como ataque de cadeia múltipla (figura 57, Bochkov *et al.*, 1971). Se admitirmos que a razão entre as quantidades de glicose e laminaribiose produzidas pela enzima está relacionada à processividade, é possível verificar se essa razão sofre alteração em altas concentrações de substrato. Essa aproximação parece razoável pelo menos para o laminariitol, aonde toda a glicose produzida provém de partes internas da cadeia. A razão entre celobiose e outros produtos (geralmente glicose e celotriose) é utilizada como um índice de processividade em celobiohidrolases, dado que essas enzimas têm a celobiose como único produto nos ciclos de ataque múltiplo ao substrato (von Ossowski *et al.*, 2003).

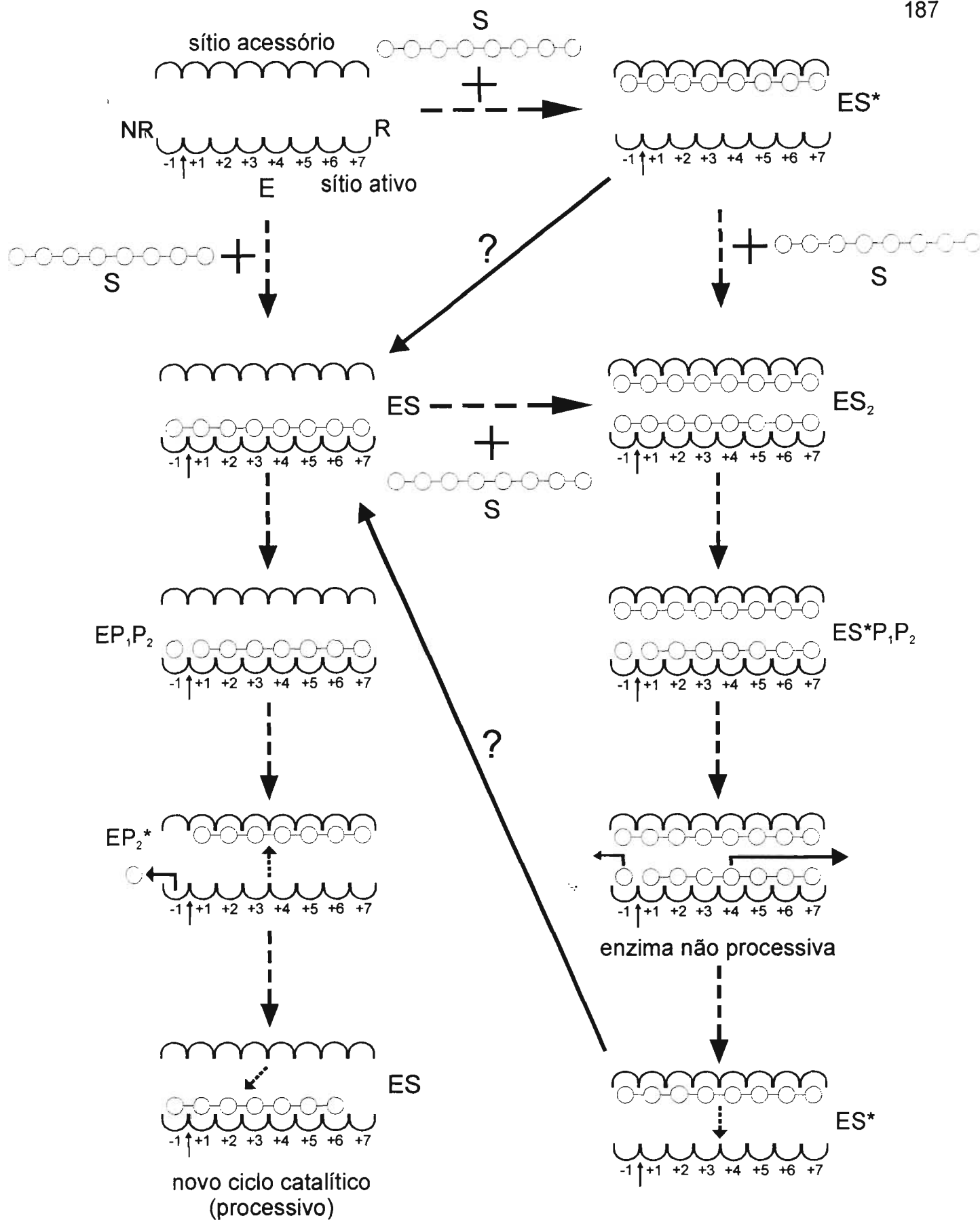


Figura 55 -Diagramas ilustrativos de seqüências de reações compatíveis com o modelo cinético II da figura 10. E - enzima; ES - complexo enzima-substrato; ES* - complexo enzima substrato não produtivo; P₁ e P₂ - produtos da reação de hidrólise; ES₂ - complexo ternário não processivo; EP₂* - Intermediário dos ciclos de processividade.

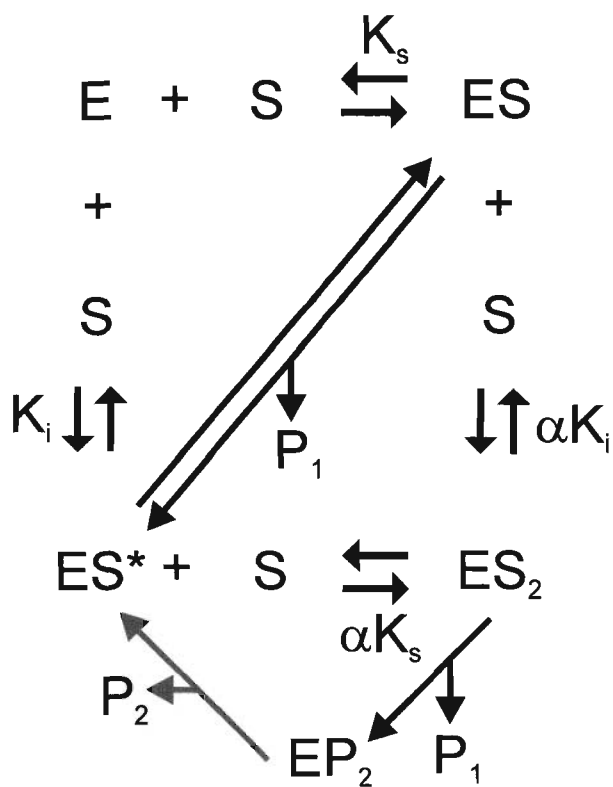
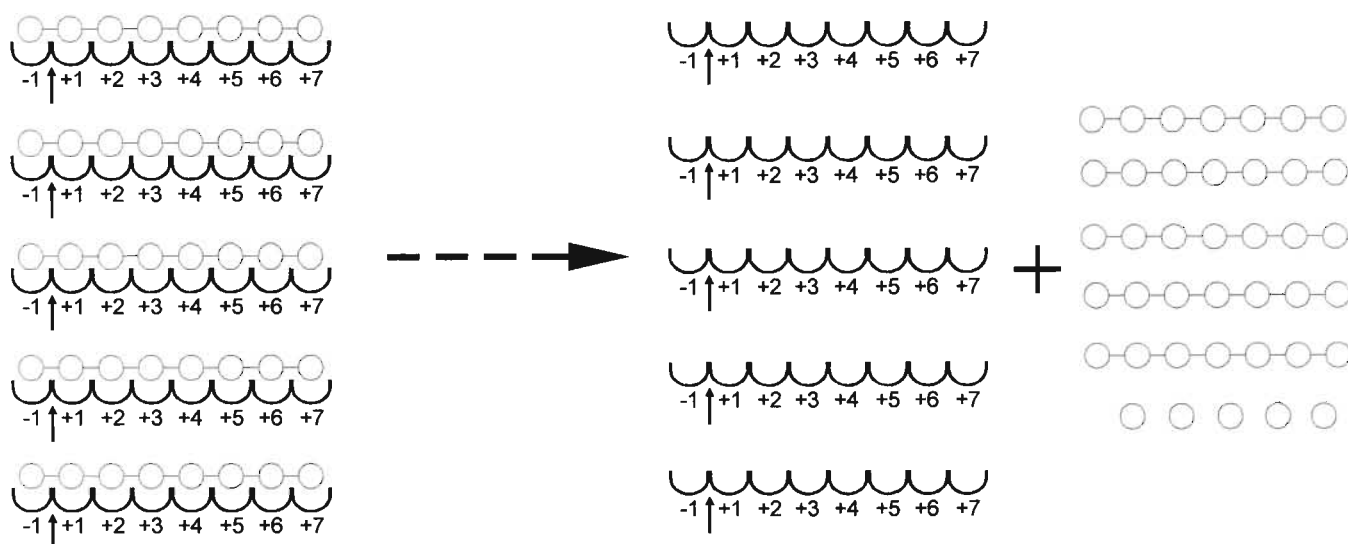


Figura 56 - Variação do modelo cinético II assumindo processividade. A seta cinza indica a saída do segundo produto do sítio ativo, determinante do modo não processivo (reação lenta). Ver figura 55 para maiores detalhes.

Mecanismo de Cadeias Múltiplas (não processivo)



Mecanismo de Cadeia Simples (Processivo)

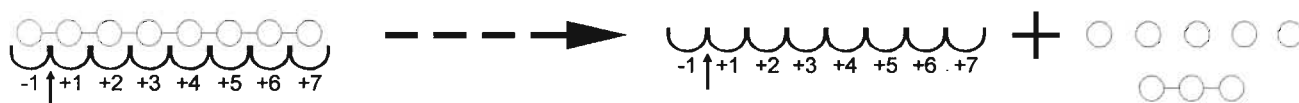


Figura 57 - Diagrama de exemplo de Comparação entre mecanismos de catálise de cadeias múltiplas ou de cadeia simples, mostrando a formação de cinco moléculas de glicose por exoglucanases sem processividade e com processividade (ataque múltiplo).

De fato, a razão entre as quantidades de glicose e de laminaribiose produzidas pela enzima a partir de laminariitol sofre uma queda brusca em altas concentrações de substrato, acompanhando a inibição. Um comportamento análogo é observado para o substrato não-tratado. A queda na razão glicose/laminaribiose poderia ser o resultado da saturação do subsítio -2 da enzima, com uma conseqüente modificação na população de complexos enzima-substrato (figura 58). Contudo, nesse caso os dois modos de ligação do substrato são competitivos, o que nunca poderia gerar a inibição observada. Tampouco há razões para se imaginar que o complexo formador de laminaribiose possa ser menos produtivo do que o formador de glicose (ou seja, com uma constante de catálise menor, o que justificaria o valor do parâmetro $\beta < 1$).

Dessa maneira, parece plausível imaginar que a inibição pelo substrato é causada pela saturação de um sítio acessório de ligação ao substrato, relacionado com processividade dessa enzima frente ao substrato laminarina. A processividade dessa forma poderia ser o resultado da ligação alternada entre dois sítios de ligação ao substrato. Essa seria a primeira explicação molecular e cinética desse fenômeno, o qual é muito comum em despolimerases e polimerases. Seria interessante verificar se esse modelo se aplica a outras enzimas que possuem essa propriedade..

Os resultados obtidos com a modificação química de LAM_A indicam que essa enzima parece ter em seu sítio ativo, além dos dois grupos carboxila (presentes em todas as glucanases descritas até o momento; Davies & Henrissat, 1995), um íon cálcio e um resíduo de cisteína essenciais para a catálise.

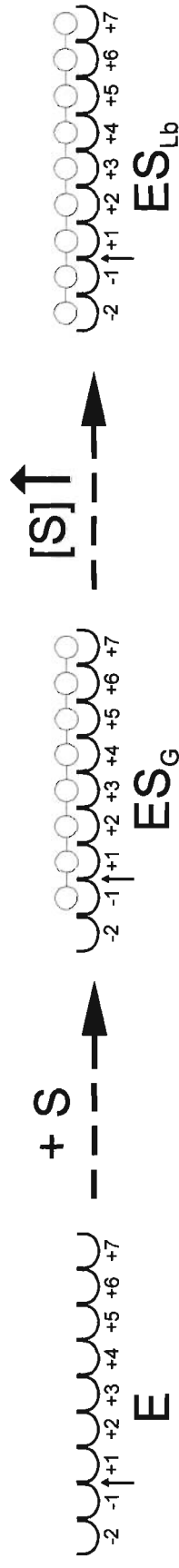


Figura 58 - Diagrama mostrando a saturação de um subsítio -2 com baixa afinidade de ligação no sítio ativo de uma exoglucanase em altas concentrações de substrato. E - Enzima; S - substrato (laminarina); ES_G - Complexo Enzima-Substrato gerador de glicose; ES_{Lb} - Complexo Enzima-Substrato gerador de laminaribiose. [S]↑ - aumento da concentração de substrato a valores elevados.

A modificação química de resíduos de histidina e tirosina na presença de laminarina sugere a existência de dois sítios de ligação desse substrato. Considerando os dados cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM_A, em baixas concentrações o substrato parece ligar-se ao sítio ativo ($K_m=0,33\%$), expondo os resíduos de histidina e tirosina modificados (elevação nos valores de k_{obs}). Em maiores concentrações, a laminarina protege os resíduos de histidina e tirosina da modificação. Dessa maneira, esses dois resíduos parecem estar situados no sítio inibitório (ou sítio de processividade), o qual é exposto após a ligação da primeira molécula de laminarina e protegido após a ligação da segunda molécula desse substrato. A exposição de prováveis resíduos do sítio inibitório com a ligação da molécula de substrato ao sítio ativo sugere um mecanismo análogo ao descrito pelo modelo cinético 1 de inibição, aonde o sítio inibitório surge apenas após a ligação do substrato ao sítio ativo.

Dessa forma, os dados obtidos indicam claramente a existência de mudanças conformacionais com a formação do complexo enzima-substrato, e que a ligação de uma molécula de laminarina ao sítio ativo leva a alterações estruturais na região de ligação da segunda molécula de laminarina.

É possível que LAM_A seja um membro da família 16 das glicosil-hidrolases. Das sete famílias que têm membros com atividade sobre β -1,3-glucanas (3,5,16,17,55,64,81), uma delas (64) é constituída por enzimas que invertem a configuração anomérica do carbono 1, produzindo α -glicose. Duas famílias são compostas por proteínas com massas moleculares muito diferentes da de LAM_A - família 55 (84-100kDa) e 81 (71-114kDa). Das quatro famílias remanescentes, apenas proteínas da família 16 possuem um átomo de

cálcio em sua estrutura (Keitel *et al.*, 1993). A família 16 também é a única com proteínas de invertebrados (Coutinho & Henrissat, 1999) - as outras são compostas apenas por seqüências de plantas (3 e 17) ou fungos (5). Até o presente momento fazem parte da família 16 das glicosil-hidrolases liquenases e laminarinases bacterianas (predominantemente do gênero *Bacillus*), laminarinases de fungo (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) e molusco (*Pseudocardium sachalinensis*) e fatores de reconhecimento de β -1,3-glucanas purificados a partir da hemolinfa de crustáceos e insetos. As massas moleculares das laminarinases da família 16 são tipicamente maiores (50kDa) que as de liquenases (25-30kDa) dessa família. Isso se dá pela inserção de domínios de ligação a polissacarídeos na porção amino-terminal da enzima (Planas, 2000). A presença de domínios adicionais de ligação ao substrato nas enzimas dessa família é coerente com a observação de dois sítios de ligação de laminarina em LAM_A.

As β -1,3-glucanases da família 16 possuem resíduos de histidina e tirosina conservados (figura 59), típicos de β -1,3-glucanases, em posições correspondentes a resíduos de liquenases que fazem interações com o substrato (Planas, 2000). Dessa forma, os dados de modificação química são coerentes com essa classificação. Não foi possível encontrar um resíduo de cisteína conservado (figura 59). Contudo, sabe-se que β -1,3-glucanases da família 16 possuem tipicamente inserções no sítio ativo, que não são completamente conservadas (Planas, 2000). A cisteína presente no sítio ativo de LAM_A pode encaixar-se nessa situação.

A presença de 4 resíduos conservados de triptofano nessa família (W653, W657, W 668 e W755 na figura 59) a princípio seria contraditória com o fato de que LAM_A não sofre modificação por N-bromosuccinimida. Todavia, esses resíduos podem estar inacessíveis ao solvente na estrutura nativa da enzima livre.

O alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de β -1,3-glucanases e dos fatores de reconhecimento de β -1,3-glucanas indicam que possivelmente os fatores de reconhecimento de crustáceos têm atividade catalítica, devendo ser classificados como laminarinases (figura 60). Os fatores de inseto possuem substituições pontuais dos resíduos catalíticos e, portanto, não devem possuir atividade catalítica (figura 60). Confirmando-se as tendências acima, esta seria a primeira classificação de uma β -1,3-glucanase de insetos. Contudo, são necessários dados estruturais para corroborar essas hipóteses.

	550	558
Bombyx mori	S	I
Manduca sexta 1	S	I
Plodia interpuctella	S	I
Manduca sexta 2	S	I
Penaeus monodon	S	I
Homarus gammarus	S	I
Bacillus circulans 2	S	I
Bacillus circulans 1	S	I
Tenebrio molitor	S	I
Pseudocardium sachalinensis	S	I
Oerskovia xanthineolytica	S	I
Tachypleus tridentatus	S	I
Thermotoga neapolitana	C	I
Pseudomonas sp.	S	I
Xanthophyllomyces dendrorhous	-	I

* .

Figura 60 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos de fatores ligantes de β -1,3-glucanas de hemolinfa e β -1,3-glucanases, com destaque para os resíduos envolvidos em catálise. Resíduos invariantes em cinza. Os resíduos de glutamato nucleófilo (E552, numeração de acordo com a seqüência B. circulans 1) e doador de prótons (E557) destacados em negro. Fatores ligantes de β -1,3-glucanas: B. mori (Hexapoda: Lepidoptera, Genebank nº AB026441), M. sexta 1 (Hexapoda: Lepidoptera, Genebank nº AF177982), P. interpuctella (Hexapoda: Lepidoptera, Genebank nº AF532603), M. sexta 2 (Hexapoda: Lepidoptera, Genebank nº AY135522), T. molitor (Hexapoda: Coleoptera, Genebank nº AB108841), P. monodon (Crustacea, Genebank nº AF368168), H. gammarus (Crustacea, Genebank nº AJ583519), T. tridentatus (Crustacea, SwissProt nº D16622). β -1,3-glucanases: B. circulans 1 (Eubacteria, SwissProt nº M34503), B. circulans 2 (Eubacteria, SwissProt nº S67033), P. sachalinensis (Molusca, Genebank nº AY308829), O. xanthineolytica (Eubacteria, Genebank nº AF 052745), T. neapolitana (Eubacteria, SwissProt nº Z47974), Pseudomonas sp. (Eubacteria, Genebank nº AB081727), X. dendrorhous (Fungi, Genebank nº AF064870).

4.6. Mecanismo de ação de LAM_T. Características do sítio ativo dessa enzima.

A clivagem específica de β -1,3-glucanas e o reconhecimento da ponta não redutora do substrato permitem classificar a laminarinase digestiva majoritária de *T. molitor* (LAM_T) no E.C.3.2.1.58 (glucan-1,3- β -glucosidase). Contudo, o principal produto liberado pela enzima é laminariotase. As enzimas que compõem essa classe enzimática (exo- β -1,3-glucanases) liberam tipicamente glicose como produto principal da hidrólise de laminarina (IUBMB-NC, 2004). LAM_T dessa maneira, parece possuir um sítio ativo mais estendido que o das outras exo- β -1,3-glucanases - embora a glicose seja o segundo produto mais abundante formado por essa enzima.

A caracterização cinética de LAM_T não revelou em nenhum momento inibição por altas concentrações de substrato. Dessa maneira, essa enzima parece possuir um mecanismo de ação diferente do exibido por LAM_A. LAM_T pode não ter processividade ou não possuir um sítio acessório de ligação ao substrato. Entretanto, a grande diversidade estrutural observada em domínios de ligação a polissacarídeos e nas famílias de glicosil-hidrolases permitem imaginar que LAM_T possa ter um sítio acessório com uma especificidade ou com uma posição relativa ao sítio ativo diferentes do de LAM_A.

Das enzimas caracterizadas, LAM_T foi a que exibiu o maior poder lítico sobre células de *S. cerevisiae*. A capacidade lítica em exo- β -1,3-glucanases geralmente está associada a grande processividade (Rombouts &

Phaff, 1976) - entretanto, as enzimas desse tipo caracterizadas até o momento produzem apenas glicose. Um sítio ativo maior e a produção majoritária de laminariooctose podem ter relação com uma maior capacidade de hidrólise da β -1,3-1,6-glucana presente na parede celular de fungos, evitando as ramificações presentes nesse polissacarídeo.

Como a grande maioria das glicosil-hidrolases, LAM_T possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise. O estudo do mecanismo de catálise dessas enzimas (Davies & Henrissat, 1995) revelou que um desses grupos atua como um nucleófilo e que o outro atua como um doador de prótons. Em todas as glucanases descritas, esses dois grupos são ácidos carboxílicos, correspondendo a cadeias laterais de resíduos de aspartato ou glutamato (Davies & Hanrissat, 1995). A modificação química com carbodiimida permitiu confirmar que em LAM_T o grupo prototrópico de maior pK (doador de prótons) é de fato uma carboxila.

A formação do complexo enzima-substrato não afeta o pK do grupo nucleófilo, enquanto eleva o pK do doador de prótons em cerca de uma unidade. Essa estabilização do estado protonado do doador de prótons pode ser o resultado da formação de uma ligação de hidrogênio entre esse grupo e o substrato ou fruto de mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima.

A modificação da enzima com dietilpirocarbonato leva a um efeito semelhante. O resíduo de histidina modificado, dessa forma, atua estabilizando o estado desprotonado do grupo doador de prótons. Como esse grupo assume esse caráter durante a hidrólise, no intermediário de reação e no primeiro

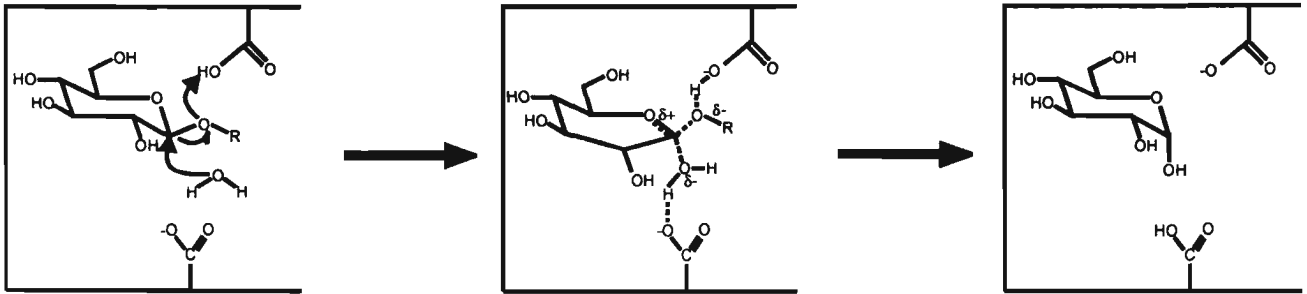
estado de transição, é possível que a presença dessa histidina no sítio ativo favoreça a catálise.

Além disso, a modificação do resíduo de histidina leva a uma grande queda no pK do grupo nucleófilo no complexo enzima-substrato. A histidina modificada atua estabilizando, portanto, o estado protonado do nucleófilo. O nucleófilo assume esse caráter apenas em enzimas que promovem a inversão da configuração anomérica do carbono 1, após a hidrólise da ligação glicosídica (figura 61). A estabilização do estado protonado do nucleófilo no complexo enzima-substrato dessa forma também favorece a catálise. O resíduo de histidina modificado está envolvido, portanto, na regulação da protonação e desprotonação tanto do nucleófilo como do doador de prótons durante a catálise. É também provável que LAM_T atue invertendo a configuração anomérica da ligação glicosídica.

A modificação química de outros resíduos em LAM_T revelou que o sítio ativo dessa enzima, além de um íon divalente, possui resíduos de cisteína, arginina (2) e tirosina envolvidos em catálise. Os dois resíduos de arginina são especialmente acessíveis à modificação e reativos.

A presença de um íon divalente (provavelmente cálcio) no sítio ativo de LAM_T indica, à semelhança do observado para LAM_A, que essa enzima pode ser um membro da família 16. O maior número de resíduos acessíveis à modificação química está em conformidade com a hipótese de um sítio ativo maior ou mais aberto - isso pode estar relacionado com a produção de laminarioctose por LAM_T. Membros da família 16 possuem resíduos de tirosina e histidina conservados, nas proximidades do sítio ativo, o que estaria em conformidade com alguns dos dados obtidos para LAM_T (figura 59 e

A



B

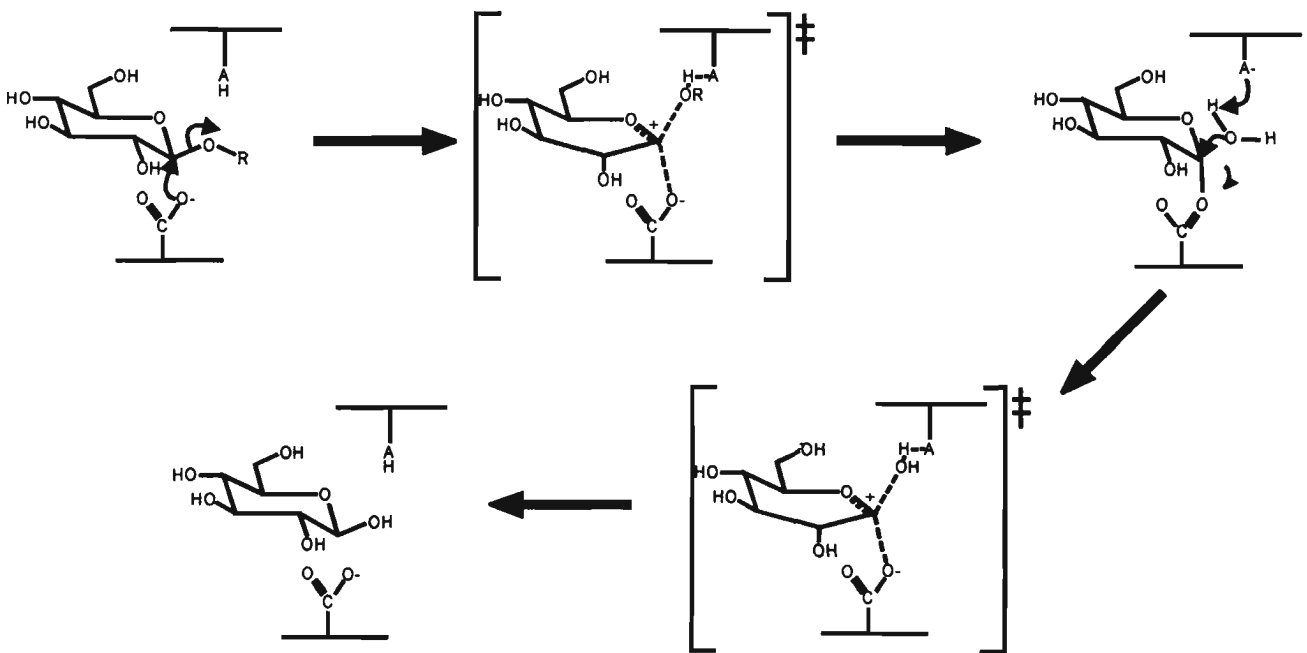


Figura 61 - Mecanismos de catálise em glicosil-hidrolases. A) Inversão da configuração anomérica do substrato. B) Retenção da configuração anomérica do substrato.

Planas, 2000). Contudo, não se observam resíduos de arginina ou de cisteína conservados nessa família (figura 59).

É sabido, entretanto, que enzimas inversoras possuem um sítio ativo mais aberto que o de enzimas retentoras (Davies & Henrissat, 1995) - em se confirmando a hipótese de LAM_T ser inversora, essa pode ser a explicação para as maiores reatividades encontradas. Nesse caso, porém, LAM_T não pode ser um membro da família 16, constituída por enzimas retentoras. Dentre as famílias com atividade sobre β -1,3-glucanas descritas, a única possibilidade seria a de participação na família 64, uma família pouco conhecida e para a qual não existem dados estruturais. De qualquer forma as massas moleculares observadas nessa família (42-58kDa) são compatíveis com a de LAM_T (50kDa). A ocorrência típica de β -1,3-glucanases produtoras de laminaripentaose nessa família (*Streptomyces* sp.) sugere LAM_T como um membro, pois não é comum encontrar enzimas com produtos de hidrólise tão grandes. As diferenças entre os mecanismos de ação de LAM_T e LAM_A teriam, nesse caso, razões estruturais. As indicações obtidas de que LAM_T é uma enzima inversora estão de acordo com essa hipótese.

A família 64 das glicosil-hidrolases possui apenas laminarinases de bactérias (*Lysobacter* e *Arthrobacter*) e fungos (*Streptomyces* e *Neurospora*; Coutinho & Henrissat, 1999). O alinhamento da seqüência de amino-ácidos das enzimas presentes nessa família permitiu-nos destacar uma série de resíduos completamente conservados (figura 62). Dentre os resíduos conservados observamos um resíduo de Histidina (H519, numeração de acordo com o alinhamento da figura 62), 4 resíduos de Tirosina (Y77, Y297, Y513, Y528), três

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710																													
AAA25520.1	PWADPTD	TNQVQLAT	CSGNAAQ	QWTRG	TGTVRAL	GKCLD	VARSG	TADG	TAVWI	YTCN	GTGAQ	KWYD	SATK	ALRN	PQSG	KCLD	AGG	PAP	LRD	GQ	KV	QV	LW	T	C	N	O	T	E	A	Q	R	W	T	L					
Arthrobacter sp.	PWADPTD	TNQVQLAT	CSGNAAQ	QWTRG	TGTVRAL	GKCLD	VARSG	TADG	TAVWI	YTCN	GTGAQ	KWYD	SATK	ALRN	PQSG	KCLD	AGG	PAP	LRD	GQ	KV	QV	LW	T	C	N	O	T	E	A	Q	R	W	T	L					
S. avermitilis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
S. coelicolor 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
S. matensis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
S. coelicolor 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Streptomyces sp.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S. coelicolor	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
L. enzymogenes	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
N. crassa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 62 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos de β -1,3-glucanases da família 64 das glicosil-hidrolases. Resíduos invariantes em cinza. As seqüências são de um organismo não identificado (genebank nº AAA25520.1), *Arthrobacter sp.*, (bactéria, genebank nº BAA04892.1), *Streptomyces avermitilis* (bactéria, genebank nº BAC68763.1), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (bactéria, genebank nº CAC16439.1), *Streptomyces matensis* (bactéria, genebank nº BAA34349.1), *Streptomyces coelicolor* (bactéria, genebank nº CAC16456.1), *Streptomyces sp.* (bactéria, genebank nº BAC68677.1), *Streptomyces coelicolor* (bactéria, genebank nº CAB69688.1), *Lysobacter enzymogenes* (bactéria, genebank nº AAN77504.1), *Neurospora crassa* (fungo, genebank nº CAD31211.1).

resíduos de Arginina (R139, R268, R485) e um resíduo de cisteína (C459). Dessa forma, os resíduos conservados na família 64 adequam-se aos dados obtidos durante os experimentos de modificação química de LAM_T.

Na família 64 também observamos um grande número de aminoácidos conservados que tipicamente constituem o suporte hidrofóbico para unidades glicosídicas do substrato. São 4 Tirosinas (Y77, Y297, Y513 e 528), 2 Fenilalaninas (F447 e F530) e 1 Triptofano (W294). A existência de um número maior de plataformas hidrofóbicas conservadas também indica a possibilidade de um sítio ativo maior (são apenas 5 na família 16). A não modificação de LAM_T por N-bromosuccinimida pode estar relacionada à presença de apenas um resíduo de triptofano conservado, o qual deve estar inacessível ao solvente na enzima livre.

São observados 5 resíduos de aspartato conservados (D116, D174, D201, D533, D534) e apenas um resíduo de glutamato (E185) conservado na família 64. Dessa maneira, pelo menos um dos grupos prototrópicos envolvidos em catálise é um aspartato. Todos esses resíduos possuem outros resíduos conservados na vizinhança. Duas regiões na seqüência, contudo, são especialmente ricas em resíduos conservados vizinhos: são os aminoácidos 167-207 e 510-536 (figura 62). É possível que essas regiões participem na construção do sítio ativo.

A proximidade dos resíduos conservados de Histidina (519) e Tirosina (514 e 529, figura 62) sugere a participação em catálise dos resíduos de aspartato 533 e 534. É provável que os resíduos de cisteína e histidina modificados quimicamente - e que estão presentes no sítio ativo, dada a proteção pelo substrato - sejam os resíduos C459 e H519. De especial

interesse é a proximidade na seqüência entre a histidina H519 e os aspartatos 533 e 534, pois o comportamento da enzima modificada com DPC sugere que essa histidina está em íntimo contato com o grupo nucleófilo e com o doador de prótons. Na outra região com resíduos conservados, não se observa proximidade entre resíduos de glutamato ou aspartato com resíduos conservados que tenham sido modificados quimicamente (histidina, cisteína, tirosina e arginina).

Não é possível saber quais seriam os resíduos de tirosina e arginina que reagiram com os inativadores, pois o número de resíduos conservados nesses casos (4 e 3, respectivamente) é maior do que o número de resíduos modificados (1 e 2).

Dessa forma, a provável colocação de LAM_T na família 64 poderia trazer informações interessantes sobre a constituição de seu sítio ativo, além de indicar a presença de cálcio na estrutura dessas enzimas. Não obstante, são necessários dados estruturais para confirmar essa classificação.

4.7. A quitinase digestiva de *Tenebrio molitor*.

Até o presente momento, 17 quitinases provenientes de insetos já foram clonadas e sequenciadas, constituindo parte da família 18 das glicosil-hidrolases (Coutinho & Henrissat, 1999). As proteínas dessa família possuem uma estrutura modular (Arakane *et al.*, 2003), sendo constituídas de um peptídeo sinal (aminoácidos 1 a 19 da seqüência da quitinase de *Manduca sexta*), um domínio catalítico (resíduos 20 a 395), um domínio conector rico em

serinas e treoninas (resíduos 396 a 496) e um domínio de ligação a quitina rico em cisteínas (resíduos 497 a 554).

A presença de um peptídeo sinal indica que essas enzimas são secretadas para o espaço extracelular - esse peptídeo, entretanto, não é conservado, sendo característico do táxon considerado. Em insetos, parece haver certa conservação dentro de uma mesma ordem (figura 47).

O domínio catalítico das quitinases de insetos possui uma série de resíduos conservados (figura 47). Entre eles encontram-se os resíduos de aspartato (D159 e D161 no alinhamento da figura 47) e tirosina (Y232 na mesma figura) envolvidos diretamente em catálise (Aalten *et al.*, 2001).

O domínio conector rico em serinas e treoninas parece ser importante para o dobramento adequado dessas proteínas durante a secreção e para a estabilidade dessa enzima frente a proteases (Arakane *et al.*, 2003).

O domínio C-terminal rico em cisteínas é importante para o reconhecimento e atividade sobre quitina. A retirada desse domínio na quitinase de *M. sexta* reduz drasticamente a atividade dessa enzima sobre o substrato natural, mas não afeta a atividade sobre oligosacarídeos ou substratos sinéticos como metil-umbelliferil- β -D-quitotriosídeo (Arakane, 2003).

Diversas funções têm sido propostas para as quitinases de insetos. Grande parte delas estão claramente envolvidas no processo da muda, participando na digestão do exoesqueleto a ser substituído. Nesses casos, a quitinase é secretada para o espaço entre a cutícula velha e a cutícula nova. É o caso da quitinase de *Manduca sexta*. A função proposta para as quitinases de *Aedes aegypti* e *Phaedon cochleriae*, isoladas a partir do tubo digestivo

desses insetos, tem sido a de regular o processo de síntese e degradação da membrana peritrófica. Alimentando adultos de *A. aegypti* com um inibidor de quitinase, observa-se que a membrana peritrófica torna-se mais espessa, resistente e durável (Terra & Ferreira, 2004).

Contudo, a quitinase de *A. aegypti* possui uma estrutura modular semelhante à da enzima de *M. sexta*, enquanto a enzima de *P. cochleriae* não possui o domínio de ligação rico em serina/treonina e o domínio ligante de quitina (figura 47). A enzima de *Tenebrio molitor* assemelha-se à de *P. cochleriae* nesse aspecto (figura 47). Acreditamos que a função da quitinase presente no tubo digestivo de *T. molitor* seja digestiva, pois o alimento desse inseto possui uma quantidade considerável de fungos. Dessa maneira, a ausência do domínio ligante de quitina nessa enzima pode estar relacionada à defesa da membrana peritrófica do inseto, estrutura que seria degradada caso a quitinase, cuja expressão em grande quantidade é necessária para a digestão, possuísse esse domínio.

Inúmeros relatos demonstram que a ingestão de quitinases exógenas em grande quantidade é deletéria para insetos, sendo essa a base para o desenvolvimento de algumas plantas resistentes a herbívoros (Terra & Ferreira, 2004). De fato, um dos grupos de proteínas expressas por plantas como defesa a patógenos é constituído por quitinases, sendo essas expressas quando a planta é atacada por fungos ou por insetos (Bowles, 1990; Stinzi *et al.*, 1993).

Assim sendo, características peculiares da quitinase intestinal de *T. molitor*, como o baixo pH ótimo (4,5) - a enzima é muito pouco ativa no pH fisiológico em que se encontra (5,6-7,9) - e a ausência do domínio de ligação

de quitina parecem ser uma estratégia para preservar a membrana peritrófica. A presença de peritrofinas também pode proteger a membrana peritrófica do ataque de quitinases.

A comparação da quitinase intestinal de *T. molitor* com enzimas de vertebrados ressalta essa adaptação. A quitinase digestiva de sapo, por exemplo, retém o conector e o domínio de ligação de quitina (dados não apresentados).

As enzimas de *Chironomus tentans* também não possuem um domínio ligante de quitina. Talvez essas enzimas e a de *Phaedon cochleriae* atuem na digestão de fungos ingeridos. É interessante verificar que as quitinases de *T. molitor* e *P. cochleriae* não possuem o conector rico em serinas e treoninas, e que nas enzimas de *C. tentans* esse domínio é muito pouco conservado (figura 47). Como em *M. sexta* foi observado que essa região da proteína é importante para o dobramento e estabilidade frente à proteases, é possível que nesses insetos essas enzimas estejam sujeitas à proteólise, o que também diminui a possibilidade de ataque à membrana peritrófica. A ligação ao substrato pode proteger uma enzima do ataque proteolítico. Nesse caso, apenas o excesso de quitinase seria rapidamente degradado - o que corresponderia à quitinase não adsorvida ao alimento, se as peritrofinas evitarem a ligação à membrana peritrófica.

A quitinase intestinal majoritária de *T. molitor* possui todos os resíduos conservados nas outras quitinases de insetos (figura 47), inclusive os resíduos envolvidos em catálise. Contudo, essa enzima possui uma especificidade bastante singular, atacando preferencialmente a ponta não redutora do substrato, gerando quitobiose. Esse tipo de atividade enzimática é semelhante

ao observado para a quitinase de *Serratia mascerens* (ChiB, Aalten *et al.*, 2001), embora a enzima dessa bactéria produza quitobiose e quitotriose em iguais quantidades. Esse tipo de atividade enzimática ainda não foi catalogado (IUBMB-NC, 2004). A produção preferencial de quitobiose a partir de quitina assemelha-se à produção de celobiose a partir de celulose por celobiohidrolases (E.C.3.2.1.91). Sugerimos dessa forma o nome de quitobiohidrolase, ou quitina-1,4- β -quitobiosidase, para esse tipo de enzima.

Não é possível saber se as enzimas dos outros insetos, ou outras enzimas da família 18 das glicosil-hidrolases, possuem o mesmo tipo de padrão de ação. Também não é possível saber se, à semelhança do que ocorre em celobiohidrolases, a quitinase de *T. molitor* possui processividade. Curiosamente, a enzima de *S. mascerens* possui um sítio ativo em formato de túnel (Aalten *et al.*, 2001). Essas características, em celobiohidrolases, estão claramente associadas ao padrão exo e à processividade (von Ossowski *et al.*, 2003).

De qualquer forma, este é o primeiro relato de uma quitinase com provável função digestiva em insetos, e é a primeira descrição de uma quitinase com um padrão de ação semelhante ao de celobiohidrolases.

4.8. Sistemas celulásicos em insetos e proteínas ligantes de papel.

Sistemas celulásicos completos são conjuntos de enzimas capazes de degradar eficientemente celulose cristalina (Klesov, 1991). São conhecidos três tipos de sistemas celulásicos completos. Eles podem conter (1)

celobiohidrolases, (2) uma endoglucanase fortemente adsorvida à celulose, (3) uma endoglucanase cujo produto majoritário é glicose (Klesov, 1991). O sistema celulásico completo mais caracterizado até o momento é o do fungo *Trichoderma reesei*, composto por endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases.

Em insetos até o presente momento não foram descritas celobiohidrolases, sendo freqüente a descrição e isolamento de endo- β -1,4-glucanases (celulases) e β -glicosidases (Watanabe & Tokuda, 2001). Tal fato levou alguns autores a considerar que nesses organismos não existem sistemas celulásicos completos. Segundo essa teoria, organismos como baratas xilófagas e cupins secretam enormes quantidades de endoglucanases (celulases) de maneira a compensar essa incapacidade (Scrivener & Slaytor, 1994).

Contudo, nos estudos realizados em insetos até o presente momento, não se estimou a capacidade de hidrólise de celulose cristalina de uma forma adequada, assim como não se realizaram ensaios capazes de detectar enzimas como celobiohidrolases. O substrato preferentemente utilizado é a carboximetilcelulose, específico para endo- β -1,4-glucanases. Em alguns casos, o homogeneizado do tubo digestivo do inseto é filtrado em papel (por exemplo, Watanabe *et al.*, 1997), o que exclui qualquer possibilidade de se encontrar nesses materiais enzimas cuja característica principal é a grande capacidade de adsorção a celulose.

Os ensaios realizados com Avicel sugerem que, de fato, *P. americana* não é capaz de hidrolisar celulose cristalina eficientemente. Contudo, *A.*

flavolineata e *T. molitor* (especialmente o segundo) parecem ter no tubo digestivo enzimas capazes de hidrolisar a porção cristalina da Avicel. Ao mesmo tempo, a fração solúvel do tubo digestivo desses dois insetos possui proteínas que se adsorvem a celulose fortemente, não encontradas em *P. americana*, o que sugere que nesses insetos observamos celulasas com alta capacidade de adsorção ao substrato, o que estaria de acordo com a teoria acima (sistemas do tipo 1 ou 2). As massas moleculares observadas (20kDa para a proteína de *A. flavolineata* e 30kDa para *T. molitor*) são compatíveis com algumas β -1,4-glucanases de baixo peso molecular (Xu *et al.*, 2000) ou mesmo com celobiohidrolases (apenas a proteína de *T. molitor*).

As proteínas adsorvidas a celulose acima foram eluídas com a utilização de um detergente não iônico (Tween 20), o que sinaliza a existência de interações hidrofóbicas entre essas proteínas e a superfície das fibras do substrato. É interessante ressaltar que a exposição a soluções salinas de alta concentração não é suficiente para a eluição dessas proteínas. De fato, a elucidação estrutural de domínios de ligação a celulose, e do sítio ativo de celulasas e celobiohidrolases revela que uma interação dominante entre resíduos de glicose da celulose e subsítios de reconhecimento na proteína é o emparelhamento hidrofóbico entre o anel do glicosil e resíduos de fenilalanina, tirosina ou triptofano (Tormo *et al.*, 1996; Brun *et al.*, 1997).

Este é o primeiro relato de um sistema celulásico completo em animais, e a primeira indicação de que insetos podem ter enzimas como celobiohidrolases em seu tubo digestivo. É preciso esclarecer, contudo, se essas enzimas são de fato secretadas pelo animal.

4.9. β -1,3-glucanases em *Spodoptera frugiperda*.

A digestão em insetos lepidópteros (mariposas e borboletas) ocorre em meios extremamente alcalinos. O pH luminal no ventrículo desses animais varia entre 9,5-10,5 (Terra & Ferreira, 1994). Essa seria uma adaptação para melhor solubilização das hemiceluloses ingeridas (Terra & Ferreira, 2004). Como a maior parte das enzimas digestivas de insetos possui um pH ótimo similar ao pH luminal (Terra & Ferreira, 1994; Terra & Ferreira, 2004), é de se esperar que as enzimas de Lepidópteros tenham sofrido alterações que permitam seu funcionamento nessas condições.

Isso não ocorre, entretanto, com as atividades de carboximetilcelulase, liquenase e xilanase presentes no ventrículo de *Spodoptera frugiperda*. Das enzimas estudadas, apenas as atividades de amilase, pectinase e laminarinase possuem um pH ótimo compatível com o pH fisiológico da digestão, o que sugere que essas enzimas sejam essenciais para o metabolismo do inseto.

De fato, a amilase é a principal carboidrase digestiva do inseto, sendo o amido a principal fonte de glicose na dieta do animal. Nesse contexto a pectinase atuaria na disrupção da parede celular vegetal primária, necessária para a exposição do conteúdo celular.

É pouco provável que a função da laminarinase desse inseto seja a digestão da parede celular de fungos, dada a pequena quantidade desse material presente na dieta. β -1,3-glucanas vegetais como calose também estão presentes em quantidades insignificantes no alimento (menos de 0,5% do peso

seco em vegetais superiores; Aspinall, 1982), não sendo provavelmente o substrato natural dessa enzima. A hipótese mais razoável é a de que a laminarinase de *S. frugiperda* tenha o papel de digerir a β -1,3-1,4-glucana constituinte da parede celular do endosperma de gramíneas. Esse polisacarídeo constitui cerca de 18% da glicose da semente (Morral & Briggs 1978), e sua digestão, além de constituir considerável fonte de energia, provavelmente é necessária para a liberação do conteúdo das células desse tecido de reserva. *S. frugiperda* é uma praga agrícola que ataca preferencialmente o cartucho de gramíneas como o milho. O alto nível de secreção de laminarinase (comparável ao nível de amilase) indica que essa enzima é bastante importante na obtenção de carboidratos pelo inseto.

Dessa maneira, a laminarinase de *S. frugiperda* parece ser um alvo bastante interessante para o controle desse inseto através da produção de inibidores em plantas transgênicas, dado que vertebrados não utilizam essa enzima na digestão. Inibidores proteicos de laminarinases foram recentemente descobertos em algas marinhas - nesse caso, sua função é inibir a enzima digestiva de moluscos predadores (Ermakova *et al.*, 2001; Yermakova *et al.*, 2002).

Pectina e β -1,3-1,4-glucanas são polisacarídeos com alta capacidade gelificante. Uma possibilidade é a de que a importância da pectinase e da laminarinase na digestão desse inseto resida na capacidade dessas enzimas de diminuir a viscosidade do conteúdo do ventrículo. Um paralelo interessante seria, nesse caso, a suplementação de vertebrados monogástricos (porcos e galinhas) com essas enzimas. Tem sido demonstrado que o aumento na taxa

de crescimento de animais suplementados não provém de uma maior digestibilidade, e sim de uma maior taxa de ingestão do alimento e de um fluxo mais rápido do bolo alimentar, resultado de uma menor viscosidade deste (Jaroni *et al.*, 1999; Thacker & Campbell, 1999). Em insetos como lepidópteros, que apresentam um ciclo de vida curto, com grandes taxas de alimentação e passagem rápida do alimento pelo tubo digestivo, esse fenômeno pode ser de grande importância, especialmente nos primeiros ínstares larvais.

4.10. Proteínas ligantes de pachyman.

A análise das proteínas intestinais adsorvidas ao polisacarídeo pachyman (β -1,3-glucana linear do fungo *Poria cocos*) dos três insetos estudados revela um grupo de proteínas bastante similar nos três organismos. Como o ponto de partida desse experimento foi a fração solúvel ventricular (no caso de *A. flavolineata*, representada pelo regurgitado), esperava-se a purificação de laminarinases digestivas, dado que muitas dessas enzimas possuem domínios de ligação a carboidratos insolúveis (Zverlov *et al.*, 2001).

Contudo, a massa molecular das proteínas isoladas de acordo com essa técnica difere, em parte, das massas moleculares das laminarinases digestivas isoladas até o momento. Algumas das proteínas enriquecidas apresentam massa molecular singularmente baixa (10-20kDa). É possível que as proteínas de maior massa molecular correspondam a laminarinases: LIQ1 (24kDa), LAM_P (40kDa) e LAM_A (45kDa) provavelmente correspondem aos ligantes com essas massas moleculares observados em *A. flavolineata* e

P.americana. Talvez a proteína de 25kDa encontrada em *A. flavolineata* corresponda à laminarinase minoritária do inseto, não estudada.

Contudo, é bastante intrigante que, no caso de *T. molitor*, não se tenha observado nenhuma proteína com massa molecular semelhante à de LAM_T (50kDa). Esse dado sugere que LAM_T não possui um sítio para ligação de glucanas insolúveis, enquanto as laminarinases de *A. flavolineata* e *P. americana* têm essa propriedade. Verifica-se, assim, em β -1,3-glucanases, um paralelo entre inibição pelo substrato e presença de um sítio para ligação a substratos insolúveis. Também é possível que a laminarinase digestiva minoritária de *T. molitor* não estudada corresponda ao ligante de 35kDa.

A notável conservação no padrão de proteínas ligantes de pachyman nos três insetos sugere que essas proteínas têm um papel fisiológico essencial. Recentemente, inúmeros fatores de ligação a β -1,3-glucanas foram isolados a partir da hemolinfa de insetos, principalmente da ordem Lepidoptera (Yu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000; Ma & Kanost, 2000; Ochiai & Ashida, 2000). Esses fatores provavelmente não possuem atividade enzimática (ver alinhamento da figura 60) e provavelmente têm a função de ativar a cascata de coagulação da hemolinfa. Como os fatores isolados até o presente momento pertencem à família 16 das glicosil-hidrolases e aparentemente as laminarinases dos insetos mais basais estudados podem pertencer a essa família, é possível que essas proteínas tenham tido a mesma origem evolutiva. É interessante observar que os fatores de coagulação de crustáceos provavelmente possuem atividade catalítica, o que sugere o aproveitamento de

enzimas digestivas no ancestral durante o desenvolvimento do sistema imune em animais.

A existência de fungos entomopatogênicos cuja via de acesso ao organismo é o epitélio intestinal sugere que a presença de laminarinases no tubo digestivo desses animais pode ter uma função protetora, dificultando a sobrevivência de fungos no ventrículo.

Peptídeos antimicrobianos com capacidade antifúngica já foram isolados a partir de insetos, especialmente de *T. molitor* (tenecina, Lee *et al.*, 1996). É possível que o ligante de pachyman com cerca de 10kDa seja parte desse grupo de peptídeos. A presença desses peptídeos no tubo digestivo de insetos bastante afastados filogeneticamente aponta para a necessidade de proteção do epitélio contra esse tipo de organismo exógeno. Esses fatores podem ser de vital importância para organismos detritívoros como *P. americana* e *T. molitor*.

4.11. Papel fisiológico das β -1,3-glucanases de insetos.

A semelhança com fatores de proteção do sistema imune sugere que o papel das β -1,3-glucanases digestivas de insetos é proteger o epitélio ventricular contra agentes infecciosos. Contudo, a caracterização dessas enzimas indica fortemente que sua função é digestiva, propiciando ao inseto aproveitar hemiceluloses cereais e β -glucanas da parede de fungos como fonte de glicose. Entretanto, é importante ressaltar que em cada um dos insetos

estudados observamos um contexto fisiológico diferenciado para a participação de β -1,3-glucanases.

P. americana é um inseto onívoro e detritívoro, em cuja dieta encontramos grande quantidade de fungos. Dessa maneira, o inseto possui uma enzima específica para a hidrólise de β -1,3-glucanas fúngicas (LAM_P) e as duas β -1,3-glucanases do inseto possuem capacidade lítica. Contudo, a observação de uma enzima com um sítio ativo especialmente desenhado para a hidrólise de β -1,3-1,4-glucanas cereais (LIQ1) indica que a hidrólise desse tipo de hemicelulose é importante para a digestão do animal. Assim sendo, *P. americana* apresenta enzimas diferenciadas para cumprir essas duas funções.

A dieta do gafanhoto *A. flavolineata* possui quantidades insignificantes de β -1,3-glucanas fúngicas ou vegetais. Dessa maneira, é provável que a laminarinase majoritária do inseto (LAM_A) tenha principalmente o papel de digerir β -1,3-1,4-glucanas cereais. A inibição da enzima por β -1,3-glucanas e a não inibição por β -1,3-1,4-glucanas indica uma adaptação para a hidrólise do segundo substrato, reconhecendo o primeiro mesmo em concentrações muito pequenas - o que está claramente de acordo com a composição da dieta.

A dieta de *T. molitor* contém uma considerável quantidade de fungos. A secreção coordenada das atividades de laminarinase e quitinase indica que o papel principal dessa enzima é digerir β -1,3-glucanas da parede de fungos. Coerentes com essa hipótese são a especificidade da enzima - incapaz de clivar β -1,3-1,4-glucanas - e seu poder lítico. A baixa densidade de fungos na flora intestinal das larvas do inseto indica um sistema digestivo adaptado para o aproveitamento desses microorganismos como fonte de energia. É interessante

observar que, das β -1,3-glucanases estudadas, LAM_T foi a única que não apresentou inibição por altas concentrações de laminarina. A secreção de uma enzima resistente à inibição e que não reconhece o substrato insolúvel (baixa capacidade de ligação) está de acordo com uma exposição maior dessa enzima ao substrato natural.

4.12. Evolução de β -1,3-glucanases em insetos.

Alguns autores tem sugerido que genes de celulasas de insetos podem ser oriundos da transferência horizontal de material genético a partir de bactérias da flora intestinal. Essa hipótese, contudo, não tem encontrado suporte em dados experimentais (Watanabe & Tokuda, 2001). A análise de genes de celulasas eucariotos mostrou recentemente uma conservação das regiões intrônicas presentes nos genes de celulasas de nematóides e de insetos, o que reforça a hipótese de que pelo menos um gene desse tipo estaria presente no ancestral Bilateria (Lo *et al.*, 2003).

De acordo com essas observações, o panorama mais provável é que as β -1,3-glucanases encontradas em insetos sejam derivadas das enzimas encontradas nos ancestrais de hexapoda. Se as tendências aqui observadas forem confirmadas, o ancestral de insetos seria portador de β -1,3-glucanases de pelo menos duas famílias distintas (16 e 64), com especificidades de β -1,3(4) e β -1,3-glucanase, à semelhança do observado em *P. americana*.

A presença desses tipos de enzimas sugere que o ancestral de insetos tenha sido um organismo onívoro ou detritívoro. De fato, esse é o

comportamento encontrado em todas as ordens mais antigas de insetos - Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Thysanura (Ruppert & Barnes, 1994; Brusca & Brusca, 1990). Todos esses insetos vivem em locais úmidos, em meio a folhas e madeira em decomposição. Nesse contexto, a presença de β -glucanases com um espectro amplo de ação, capazes de digerir polisacarídeos vegetais e fúngicos, seria uma característica ancestral em Hexapoda.

Adotando a condição encontrada em *P. americana* como a mais próxima da ancestral, podemos verificar algumas tendências na evolução de β -1,3-glucanases de insetos. Inicialmente, verificamos uma especialização (em termos de especificidade) da β -1,3-glucanase majoritária. Nos dois insetos derivados estudados, observa-se a existência de uma enzima majoritária com apenas um dos tipos de especificidade encontrados na condição ancestral. Contudo, as enzimas de *A. flavolineata* e *T. molitor* são bastante diferentes entre si, o que indica que essas duas condições se diferenciaram do ancestral independentemente. Uma hipótese é a de que a enzima de *A. flavolineata* tenha se originado a partir de enzimas semelhantes à LIQ1 (β -1,3(4)-glucanases possivelmente da família 16 das glicosil-hidrolases), e que a enzima de *T. molitor* tenha se originado a partir de enzimas semelhantes a LAM_P (β -1,3-glucanases, que nesse caso seriam da família 64 das glicosil-hidrolases).

Outra tendência observada é a de que, nos insetos derivados estudados, a β -1,3-glucanase majoritária apresenta um padrão exo de hidrólise, contrastando com o padrão endo presente nas enzimas de *P.*

americana. O sítio ativo de exo- β -1,4-glucanases apresenta um formato de túnel, enquanto o sítio ativo de endo- β -1,4-glucanases apresenta o formato de fenda (Henrissat & Bairoch, 1995). Algumas exo- β -1,3-glucanases apresentam um sítio ativo em formato de bolso, mas essas enzimas são da família 5 das glicosil-hidrolases, relacionada a β -glicosidases de plantas e fungos (Coutinho & Henrissat, 1999). É possível que os sítios ativos das enzimas de *A. flavolineata* e *T. molitor* tenham se formado pela inserção de alças na proximidade do sítio ativo da endoglucanase ancestral, transformando uma fenda em um túnel, à semelhança das diferenças observadas entre cellobiohidrolases e endoglucanases.

Também observamos um estreitamento no espectro de produtos gerados pela ação das β -1,3-glucanases do inseto. Enquanto as β -1,3-glucanases de *P. americana* produzem uma grande gama de oligosacarídeos, as β -glucanases de *A. flavolineata* e *T. molitor* geram apenas um ou dois tipos de produtos - glicose e laminaribiose ou glicose e laminarioctose, respectivamente. Essa parece ser uma adaptação dos sistemas β -1,3-glucanásicos desses insetos de forma a propiciar uma digestão mais rápida do alimento. Assim, em *A. flavolineata* observamos uma enzima que disponibiliza diretamente às células o produto absorvível da digestão (glicose), ou um produto rapidamente hidrolisável por β -glicosidases (laminaribiose). Em *T. molitor*, parece haver ocorrido uma especialização ainda maior, com a produção do que seria o melhor substrato das β -glicosidases desse inseto, as quais possuem preferência pela ligação glicosídica do tipo β -1,3 e um sítio ativo singularmente estendido, com quatro ou cinco subsítios de ligação. O

acoplamento entre β -1,3-glucanase e β -glicosidase em *T. molitor* pode ter acompanhado a perda da digestão nos cecos, sendo necessária uma digestão mais rápida no ventrículo anterior.

O surgimento de β -1,3-1,4-glucanas importantes em termos de biomassa na natureza é recente, pois remete ao aparecimento das gramíneas (90 milhões de anos). Esse fato evolutivo é muito posterior ao aparecimento das grandes ordens de insetos (300-500 milhões de anos). Dessa maneira, cada ordem de insetos deve ter desenvolvido estratégias específicas para lidar com esse tipo novo de substrato. Assim sendo, adaptações comuns para a clivagem de β -1,3-1,4-glucanas devem ser observadas como convergentes, e não como uma característica ancestral.

Algumas adaptações em sistemas β -1,3-glucanásicos parecem ter ocorrido ao longo da história evolutiva nas diferentes ordens de insetos, especialmente no que se refere ao reconhecimento de substratos específicos como β -1,3-1,4-glucanas ou β -1,3-1,6-glucanas. De qualquer forma, o padrão de reconhecimento de β -1,3-glucanas parece ter sido estritamente conservado ao longo da evolução dos grandes grupos de hexapoda.

5. Conclusões

- *P. americana* e *T. molitor* são capazes de secretar β -1,3-glucanases no tubo digestivo.
- β -1,3-glucanases de insetos possuem diferentes especificidades, padrões de ação e resíduos envolvidos em catálise.
 - O papel das β -1,3-glucanases digestivas de insetos é degradar β -glucanas de fungos ou de cereais ingeridos.
- As laminarinases digestivas de *Periplaneta americana* (LIQ1 e LAM_P) são secretadas pelas glândulas salivares. LIQ1 (42 kDa) é uma endo- β -1,3(4)-glucanase (E.C.3.2.1.6) capaz de reconhecer especificamente β -1,3-1,4-glucanas cereais. LAM_P é uma endo- β -1,3-glucanase (E.C.3.2.1.39) com alto grau de ataque múltiplo.
- A laminarinase digestiva majoritária de *Abracris flavolineata* é uma exo- β -1,3-glucanase (E.C.3.2.1.58) processiva, é inibida por altas concentrações de substrato e possui um sítio acessório para ligação de laminarina, que pode estar envolvido no mecanismo de processividade.
- A laminarinase digestiva majoritária de *Tenebrio molitor* é uma exo- β -1,3-glucanase (E.C.3.2.1.58) com produtos de ação de tamanho intermediário e com grande poder lítico sobre células de levedura.
- A quitinase digestiva de *T. molitor*, além de não possuir o domínio de ligação à quitina, possui um padrão de ação e formação de produto (quitobiose) ainda não catalogado.
- *A. flavolineata* e *T. molitor* possuem sistemas celulásicos completos.
- O ancestral de Hexapoda provavelmente possuía β -1,3 e β -1,3(4) glucanases digestivas associadas a um hábito detritívoro.

6. Referências Bibliográficas

- Abe J., Sidenius U. & Svensson B. (1993) Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochemical Journal* 293: 151-155.
- Abel M., Iversen K., Planas A. & Christensen U. (2003) Pre-steady-state kinetics of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-glucanase: evidence for a regulatory binding site. *Biochemical Journal* 371: 997-1003.
- Abo-Khatwa N. (1978) Cellulase of fungus-growing termites: a new hypothesis on its origin. *Experientia* 34: 559-560.
- Alstad D.N. & Andow D.A. (1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894-1896.
- Amersham Biosciences (2004) Gel Filtration: Principles and Methods. In <http://amersham-biosciences.com>
- Arakane Y., Zhu Q., Matsumiya M., Muthukrishnan S. and Kramer K.J. (2003) Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 631-648.
- Aspinall G.O. (Ed.) (1982) The Polysaccharides. Vols. 1 e 2. New York: Academic Press. 340 e 503p.
- Bauer L.S. (1995) Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomology* 78: 414-443.
- Bell W.J. & Adiyodi K.G. (1982) The American Cockroach. London, New York: Chapman and Hall. 529p.
- Blum H., Beir H., & Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bochkov A.F., Sova V.V. & Kirkwood S. (1972) The study of the action pattern of an exo- β -(1-3)-D-glucanase. *Biochimica et Biophysica Acta* 258: 531-540.
- Bowles D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.

- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bray M.R. & Clarke A.J. (1990) Essential carboxy groups in xylanase A. *Biochemical Journal* 270: 91-96.
- Brun E., Moriaud F., Gans P., Blackledge M.J., Barras F. & Marion D. (1997) Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. *Biochemistry* 36: 16074-16086.
- Brusca R.C. & Brusca G.J. (1990) *Invertebrates*. 1^oEd. (7^o reimpressão) Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers. 922p.
- Chapman R.F. (1985) Structure of the digestive system. In: Kerkut G.A. and Gilbert L.I. (Eds.) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol 4. New York: Pergamon Press. p. 165-211.
- Chapman R.F. (1998) *The Insects*. 4^o Edição. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chipoulet J.M. & Chararas C. (1984) Purification and partial characterization of a laminarinase from the larvae of *Rhagium inquisitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 77B: 699-706.
- Cleland W.W. (1979) Substrate Inhibition. *Methods in Enzymology* 63: 500-513.
- Cleveland L.R. (1924) The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* 46: 117-227.
- Coutinho P.M. & Henrissat B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server. In <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>
- Cristofolletti P.T., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* 47: 143-155.
- Cristofolletti P.T. & Terra W.R. (2000) The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1479: 185-195.
- Cutfield S.M., Davies G.J., Murshudov G., Anderson B.F., Moody P.C.E., Sullivan P.A. & Cutfield J.F. (1999) The structure of the exo- β -(1,3)-

- glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hidrolases. *Journal of Molecular Biology* 294: 771-783.
- Dalqvist A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry* 22: 99-107.
- Davies G. & Henrissat B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
- Davies G.J., Mackenzie L., Varrot A., Dauter M., Brzozowski M., Schülein M. & Withers S.G. (1998) Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining β -glycoside hydrolase. *Biochemistry* 37 (34): 11707-11713.
- Dixon M. & Webb E.C. (1958) *Enzymes*. New York: Academic Press. 782p.
- Ermanova S.P., Burtseva Y.V., Sova V.V., Kratchun V.V., Zvyagintseva T.N. (2001) Proteins of brown seaweeds as inhibitors of endo-1 \rightarrow 3- β -D-glucanases of marine invertebrates. *Biochemistry (Moscow)* 66 (2): 188-194.
- Ferreira A.H.P., Marana S.R., Terra W.R. & Ferreira C. (2001) Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1065-1076.
- Ferreira A.H.P., Ribeiro A.F., Terra W.R. & Ferreira C. (2002) Secretion of β -glycosidase by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* 48: 113-118.
- Genta F.A. (2000) Purificação e caracterização de β -glucanases digestivas de *Periplaneta americana* (Dictyoptera). São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Tese de Mestrado. 149p.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280: 309-316.
- Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.E., Barker R.F. & Boulter D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.

- Hrmova M., de Gori R., Smith B.J., Fairweather J.K., Driguez H., Varghese J.N. & Fincher G.B. (2002) Structural basis for broad substrate specificity in higher plant β -D-glucan glucohydrolases. *The Plant Cell* 14: 1033-1052.
- Hsu S.C. & Lockwood J.L. (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology* 29 (3): 422-426.
- IUBMB-NC: International Union of Biochemistry and Molecular Biology - Nomenclature Committee (2004) Enzyme Nomenclature *In* <http://iubmb.org>
- Jaroni D., Scheideler S.E., Beck M., Wyatt C. (1999) The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation. 1. Late egg production efficiency, egg yields, and egg composition in two strains of leghorn hens. *Poultry Science* 78: 841-847.
- Johnston J.R. (Ed.) (1994) *Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach.* Oxford: IRL Press. 275p.
- Jouanin L., Bonade-Bottino M., Girard C., Morrot G. & Giband M. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131(1): 1-11.
- Keitel T., Simon O., Borriss R., Heinemann U. (1993) Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90: 5287-5291.
- Kim Y.-S., Ryu J.-H., Han S.-J., Choi K.-H., Nam K.-B., Jang I.-H., Lemaitre B., Brey P.T. & Lee W.-J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32721-32727.
- Klesov A.A. (1991) Biochemistry and enzymology of cellulose hydrolysis. *Biokhimiya* 55: 1295-1318.
- 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.

- Laemli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee W.-J., Lee J.-D., Kravchenko V.V., Ulevitch R.J., Brey P.T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93: 7888-7893.
- Lee Y.J., Chung T.J., Park C.W., Hahn Y., Chung J.H., Lee B.L., Han D.M., Jung Y.H., Kim S., Lee Y. (1996). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218: 6-11.
- Lemos F.J.A., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (1993) A bacteria-digesting Midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) Larvae. Purification, Properties and Secretory Mechanism. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23 (4): 533-541.
- Lo N., Tokuda G., Watanabe H., Rose H., Slaytor M & Maekawa K. (2000) Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology* 10: 801-804.
- Lo N., Watanabe H., Sugimura M. (2003) Evidence for the presence of a cellulase gene in the last common ancestor of bilaterian animals. *Proc. R. Soc. London B* 270: S69-S72.
- Ma C. & Kanost M. (2000) A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (11): 7505-7514.
- MacLeod A.M., Tull D., Rupitz K., Warren R.A.J. & Withers S.G. (1996) Mechanistic consequences of mutation of active site carboxylates in a retaining β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* 35: 13165-13172.
- Manchenko G.P. (1994) *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton: CRC Press.
- Manners D.J., Masson A.J., Patterso J.C. (1973) Structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from yeast-cell walls. *Biochemical Journal* 135 (1): 19-30.

- Martin M.M. (1987) Invertebrate-microbial interactions. Ingested fungal enzymes in arthropod biology. Ithaca: Comstock.
- Martin M.M. (1991) The evolution of cellulose digestion in insects. Phil. Trans. R. Soc. London B 333:281-288.
- Martin M.M. & Martin J.S. (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive systems. Science 199: 1453-1455.
- McGaughey W.H. & Whalon M.E. (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science 258: 1451-1455.
- Morrall P. & Briggs D.E. (1978) Phytochemistry 17: 1495-1502.
- NC-IUB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1983) Symbolism and terminology in Enzyme kinetics. Recommendations 1981. Biochemical Journal 213: 561-571.
- Nielsen, C. (1966) Laminaranases in soil and litter invertebrates. Nature 199:1001.
- Noelting G. & Bernfeld P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques. III. La beta-amilase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d'alfa-amilase. Helvetica Chimica Acta 31: 286-290.
- Notemboom V., Birsan C., Nitz, Rose D.R., Warren R.A.J. & Withers S.G. (1998) Insights into transition state stabilization of the β -1,4-glycosidase Cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. Nature Structural Biology 5: 812-818.
- Ochiai M. & Ashida M. (2000) A pattern-recognition protein for β -1,3-glucan. The Journal of Biological Chemistry 275 (7): 4995-5002.
- Parra J.R.P. (1986) Criação de Insetos para Estudos com Patógenos. In Alvez S.B. (Ed.) Controle microbiano de Insetos. São Paulo: Editora Manole. p. 348-373.
- Planas A. (2000) Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 361-382.
- Potts R.C. & Hewitt P.H. (1974) The partial purification and some properties of the cellulase from the termite *Trinervitermes trinervoides*

- (Nasutermitinae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 47B: 317-326.
- Read S.M., Currie G. & Bacic A. (1996) Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 281: 187-201.
- Richards O.W. & Davis R.G. (1977) *Imm's General Textbook of Entomology*. 10^o Ed. London: Chapman. 1354p.
- Riordan J.F. & Vallee B.L. (1972) Nitration with tetranitromethane. *Methods in Enzymology* XXV: 515-521.
- Robyt J.F. & French D. (1967) Multiple attack hypothesis of amylase action. Action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* α -amylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 122: 8-16.
- Rombouts F.M. & Phaff H.J. (1976) Lysis of yeast cell walls. Lytic β -1,3-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *European Journal of Biochemistry* 63: 121-130.
- Rouland C., Civas A., Renoux J. & Petek F. (1988) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mulleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91B: 449-458.
- Rouland C., Lenoir F., & Lepage M. (1991) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus-growing termites. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99A: 657-663.
- Ruppert E.E. & Barnes R.D. (1994) *Invertebrate Zoology*. 6^oEd. Fort Worth: Saunders College Publishing. 1102p.
- Sakon J., Irwin D., Wilson D.B & Karplus A. (1997) Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Structural Biology* 4 (10): 810-818.
- Schomburg D. & Salzmann M. (1991) *Enzyme Handbook* 3. Berlin, New York, Tokyo: Springer-Verlag. Folhas soltas.
- Schuler T.H, Poppy G.M., Kerry R.B. & Denholm I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 6: 168-175.

- Schumaker T.T.S, Cristofolletti P.T. & Terra W.R. (1993) Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona punctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie* 24: 3-17.
- Scrivener A.M. & Slaytor M. (1994) Properties of the endogenous cellulase from *Panesthia cribrata* Saussure and purification of major endo- β -1,4-glucanase components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24 (3): 223-231.
- Scrivener A.M., Watanabe H. & Noda H. (1998) Properties of digestive carbohydrase activities secreted by two cockroaches, *Panesthia cribrata* and *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119B: 273-282.
- Segel I.H. (1993) *Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 957p.
- Shade R.E., Schroeder H.E., Pueyo J.J., Tabe L.M., Murdock L.L., Higgings T.J.V. & Chrispeels M.J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12: 793-796.
- Sidhu G., Withers S.G., Nguyen N.T., McIntosh L.P., Ziser L. & Brayer G.D. (1999) Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. *Biochemistry* 38: 5346-5354.
- Silva A., Bacci Jr. M., Siqueira C.Q., Bueno O.L., Pagnoca F.C. & Hebling M.J.A. (2003) Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 49: 307-313.
- Skoubas A. & Georgatsos J.G. (1997) Identification of essential amino acids for the catalytic activity of barley β -glucosidase. *Phytochemistry* 46 (6): 997-1003.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.

- Spande T.F. & Witkop B. (1967) Tryptophan involvement in the function of enzymes and protein hormones as determined by selective oxidation with N-bromosuccinimide. *Methods in Enzymology* XI: 506-522.
- Stahl E. (1969) *Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. Berlin: Springer-Verlag.
- Stinzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedermann-Merdinoglu S., Kaufmann S., Geoffroy P., Legrand M. & Fritig B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706.
- Stryer L. (1996) *Bioquímica*. 4^o edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1000p.
- Sulzenbacher G., Schüle M. & Davies G.D. (1997) Structure of the endoglucanase I from *Fusarium oxysporum*: native, cellobiose, and 3,4-epoxybutyl β -D-cellobioside-inhibited forms, at 2.3Å resolution. *Biochemistry* 36: 5902-5911.
- Terra W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35: 181-200.
- Terra W.R. & Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B (1): 1-62.
- Terra W.R. & Ferreira C. (2004) Biochemistry of digestion. In: Gilbert L.I., Iatov K., Gill S. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry Pharmacology and Molecular Biology*. Vol 4: Biochemistry and Molecular Biology. Oxford: Elsevier. In Press.
- Terra W.R, Ferreira C. & Bastos F. (1985) Phylogenetic considerations of insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry* 15: 443-449.
- Terra W.R., Ferreira C. & de Bianchi A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25: 487-494.

- Thacker P.A. & Campbell G.L. (1999) Performance of growing finishing pigs fed untreated or micronized hull-less barley-based diets with or without β -glucanase. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 8 (2): 157-170.
- Tokuda G., Saito H. & Watanabe H. (2002) A digestive β -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1681-1689.
- Tormo J., Lamed R., Chirino A.J., Morag E., Bayer E.A., Shoham Y. & Steitz T.A. (1996) Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *The EMBO Journal* 15 (21): 5739-5751.
- van Aalten D.M.F., Komander D., Synstad B., Gåseidnes S., Peter M.G. & Eijsink V.G.H. (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 98 (16): 8979-8984.
- Varrot A., Schüle M. & Davies G.D. (1999) Structural changes of the active site tunnel of *Humicola insolens* cellobiohydrolase, Cel6A, upon oligosaccharide binding. *Biochemistry* 38: 8884-8891.
- von Ossowsky I., Ståhlberg J., Koivula A., Piens K., Becker D., Boer H., Harle R., Harris M., Divne C., Mahdi S., Zhao Y., Driguez H., Claeyssens M., Sinnott M & Teeri T.T. (2003) Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *Journal of Molecular Biology* 333: 817-829.
- Vonk H.J. and Western J.R.H. (1984) *Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion*. New York: Academic Press.
- Watanabe H., Nakamura M., Tokuda G., Yamaoka I., Scrivener A.M. & Noda H. (1997) Site of secretion and properties of endogenous endo- β -1,4-glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27 (4): 305-313.

- Watanabe H. & Tokuda G., (2001) Animal Cellulases. Cellular and Molecular Life Sciences 58: 1167-1178.
- Wood P.J., Weisz J. & Blackwell B.A. (1994) Structural studies of (1-3),(1-4)- β -D-Glucans by ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. Cereal Chemistry 71 (3): 301-307.
- Xu B., Hellman U., Ersson B. & Janson J.-C. (2000) Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. European Journal of Biochemistry 267: 4970-4977.
- Yermakova S.P., Sova V.V. and Zvyagintseva T.N. (2002) Brown seaweed protein as an inhibitor of marine mollusk endo-(1-3)- β -D-glucanases. Carbohydrate Research 337: 229-237.
- Yu X.-Q., Zhu Y.-F., Ma C., Fabrick J.A. & Kanost M.R. (2002) Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1287-1293.
- Zverlov V.V., Volkov I.Y., Velikodvorskaya G.A., Schwarz W.H. (2001) The binding pattern of two carbohydrate-binding modules of laminarinase Lam16A from *Thermotoga neapolitana*: differences in β -glucan binding within family CBM4. Microbiology 147: 621-629.

7. Curriculum Vitae

Nome: Fernando Ariel Genta

Local e data de nascimento: São Paulo, 29 de julho de 1976

Educação

Colégio Objetivo, São Paulo, 1993

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997

Bacharel em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

Mestrado em Bioquímica

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

Licenciado em Ciências Biológicas

Ocupação

Aluno de pós-graduação (doutorado), Universidade de São Paulo, 2000 até o presente.

Bolsista FAPESP

Publicações

Genta F.A., Terra W.R. & Ferreira C. (2003) Action pattern, specificity, lytic activities, and physiological role of five digestive β -glucanases isolated from *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 1085-1097.