MARIANA TONELOTTO

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO EM *LONOMIA OBLIQUA***

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
da Universidade de São Paulo,
Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para
obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2016

MARIANA TONELOTTO

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO EM *LONOMIA OBLIQUA***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Ronaldo Zucatelli
Mendonça

Co-orientador: Dra. Adriana Rios
Lopes

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tonelotto, Mariana.

Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico em *Lonomia obliqua*. / Mariana Tonelotto; orientador: Ronaldo Zucatelli Mendonça; co-orientadora Adriana Rios Lopes. -- São Paulo, 2016.
151 p.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Lonomia obliqua*. 2. Hemolinfa. 3. Intestino médio. 4. Carboidrase. I. Zucatelli, Mendonça, Ronaldo orientador. II. Lopes, Adriana Rios, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Mariana Tonelotto

Título da Tese: Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico em *Lonomia obliqua*

Orientador (a): Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 15 de abril de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico em *Lonomia obliqua*", protocolo nº. I-1039/13, sob a responsabilidade de Ronaldo Zucatelli Mendonça e Mariana Tonelotto, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico essa tese a minha avó materna Benedita Bráulio e aos meus avôs paternos Rosa e Armando Tonelotto (em memória)

Pessoas simples, íntegras, honestas, humildes e dedicadas à família. Infelizmente não tiveram oportunidade de estudar, mas se sacrificaram trabalhando dobrado para formar minhas tias e meus pais. Também sempre me incentivaram a concluir os estudos e o maior sonho da minha avó materna era me ver doutora. É graças ao caráter deles repassados aos meus pais que me fizeram ser a pessoa que sou hoje. Só posso dedicar a eles se hoje posso segurar confortavelmente uma pipeta, uma caneta ou uma vidraria de laboratório, pois sabiam o peso da enxada e de uma pá. Portanto, a dedicatória desse doutorado vai para minha família, que está sempre me apoiando em tudo que faço. A todos vocês meu eterno agradecimento!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar saúde, sustento, oportunidade, ânimo, paciência e capacidade durante todo o tempo para desenvolver esse trabalho.

Ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça pela orientação, por acreditar e confiar integralmente em mim na execução desse trabalho. Muito obrigada pelo incentivo e disposição durante essa pesquisa. Nunca vou esquecer a frase que sempre me disse: “Se fosse fácil, não teria graça.” Uma frase pequena, mas com grande significado. Obrigada por convivermos, trabalharmos juntos e aceitar meus erros e acertos durante esses anos.

A Dra Adriana Rios Lopes pela co-orientação, pela ajuda plena na execução, elaboração e correção dessa tese. Sua participação foi fundamental e essencial para a execução desse trabalho. Agradeço especialmente pelos ensinamentos, pelas conversas, por nunca deixar de oferecer ajuda, por me acolher tão bem no seu laboratório, pelo total incentivo e dedicação durante toda a pesquisa. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo. Especialmente a você, Dri, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos pesquisadores Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi, Dr. Ivo Lebrun, Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, Dra Eliana Nakano e a Dra Maria Carolina Quartim Barbosa Elias-Sabbaga por permitirem a utilização de seus equipamentos laboratoriais.

A Fabiana Alves Moreira, PAP *Purific*, que com seu sorriso contagiante e cativante me ajudou a enfrentar as dificuldades que encontramos pelo caminho. Agradeço pela confiança, pela sua paciência em sempre me ouvir e me acalmar, pelos almoços engraçados e sinceros, pelo pensamento positivo em realizar os experimentos, por nunca desfalecer ou reclamar quando dissecamos 700 lagartas da espécie *Lonomia obliqua* em um único dia e pela agradável presença, mesmo que indireta, da pequena e risonha Giovanna.

Ao apoio técnico dos funcionários da bioquímica e da parasitologia por garantirem o bom funcionamento dos laboratórios e por estarem sempre prontos e a disposição. Ao Dimmy e ao Adrian pelas conversas engraçadas e as risadas que sempre damos juntos. Especialmente também a Silvana pela ajuda na execução dos géis, dos protocolos, na limpeza impecável das diversas placas de 96 poços utilizadas nessa tese, pelo bolo de tapioca delicioso e pelos conselhos que me deu e a Karina que estava sempre pronta a ouvir-me, ajudar-me e dar-me conselhos. Agradeço pela amizade que construímos.

A Natália, Carlos, Felipe, que acompanharam meu trabalho de perto e ajudaram-me com os experimentos, pelas risadas e brincadeiras que sem dúvida fizeram toda diferença nessa trajetória. Agradeço também aos colegas: Guilherme, Dalton, Ana Carolina, Ana Rita, Carla, Andrea, Yacov, Veronica, Hugo e Douglas que estiveram sempre prontos para me ajudar.

Ao Instituto Butantan, a Universidade de São Paulo, ao programa de Interunidades em Biotecnologia, especialmente aos funcionários Marcos, Fábia e Eliane. E aos funcionários da biblioteca do ICB: Valéria e Iroshi. Obrigada pelo carinho de vocês.

A Dra. Fan Hui Wen e equipe que gentilmente cederam algumas lagartas da espécie *Lonomia obliqua* para a execução dessa tese. Obrigada por incentivarem a pesquisa com esse inseto e por acreditarem que a pesquisa e a produção do soro anti-lonômico precisam andar paralelamente.

Ao Msc. Roberto Henrique Pinto Moraes, Betão/taturana, pelos conhecimentos que dividiu comigo sobre as taturanas, por acreditar e apostar na minha tese, pelas conversas francas e sinceras e principalmente pelos valiosos conselhos. Sem dúvida seus conhecimentos e amor por esse inseto fizeram toda a diferença na execução desse projeto. A você, meu amigo, meus sinceros agradecimentos.

Pelo apoio técnico do CEFAP na realização do proteoma e pela colaboração com o LAFIECO da USP. Agradeço ao prof. Dr. Marcos Buckeridge por gentilmente abrir as portas do seu laboratório e pela ajuda técnica da Eglee Silvia Gonçalves Igarashi e da aluna de mestrado Débora Pagliuso.

Aos Prof^{as}. Dra. Inês Cordeiro, Prof. Dr. Matheus Fortes Santos e Prof. Dr. José Rubens Pirani pelas informações sobre as filogenias das plantas utilizadas nesse trabalho. A Dra. Márcia Regina Franzolin, pesquisadora do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pelas identificações das bactérias presentes no intestino de *Lonomia obliqua*.

A toda equipe que trabalhou com afinco na elaboração do transcriptoma de *Lonomia obliqua*. Especialmente a Dra. Úrsula Castro de Oliveira, o Dr. Milton Yutaka Nishiyama Junior, o Dr. Fernando Luiz Kamitani e o Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo.

Ao CNPQ, FAPESP e FUNDAP pelo suporte financeiro à pesquisa.

Aos meus pais, Nildete e José Carlos Tonelotto, que sempre me apoiaram em estudar. Ensinarão-me a nunca desistir dos meus sonhos e objetivos por mais adversas que sejam as dificuldades. Agradeço por toda a dedicação que tiveram comigo nesses anos de estudo.

Ao meu irmão autista, Thiago Tonelotto, que com todo seu amor e paciência me faz ser um ser humano melhor. Agradeço por sempre guardar um pedaço da sobremesa quando chegava tarde do Instituto Butantan. Seus pequenos avanços são grandes vitórias para todos nós.

Ao Douglas Giroto Savian pelo amor, pelo apoio incondicional, pelo companheirismo, pela paciência e principalmente pela vontade de sempre estar ao meu lado, sempre me ajudando e pronto para me defender. Você tem acompanhando minha carreira científica desde o começo e nunca me deixou esmorecer nas dificuldades e nas lutas. Amo dividir todos os momentos da minha vida ao seu lado.

Aos membros da igreja Batista Esperança em Tatuapé, especialmente aos pastores e esposas Alceu e Heidi Olímpio e Ricardo e Lilian Pereira pela amizade, orações, pelo apoio espiritual e por sempre me falarem que o segredo é não desesperar, crer e confiar somente em Deus.

“Ser humilde com os superiores é
uma obrigação, com os colegas
uma cortesia, com os inferiores é
uma nobreza.”

(Benjamin Franklin)

RESUMO

TONELOTTO, M. **Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico em *Lonomia obliqua***. 2016. 151 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O número de acidentes hemorrágicos causados pela lagarta *Lonomia obliqua* aumentaram nos últimos anos. Apesar de sua importância médica, pouco se conhece sobre a fisiologia desse inseto. As carboidrases são essenciais para o desenvolvimento de organismos herbívoros. Esta lagarta se alimenta de folhas de árvores frutíferas. Nosso grupo de pesquisa verificou durante experimentos em cultura celular sobre a presença de proteínas anti-virais e anti-apoptóticas na hemolinfa dessa lagarta que alguma enzima presente na hemolinfa hidrolisava a sacarose do meio de cultivo celular em glicose e com isso aumentava a viabilidade dessa cultura em relação ao controle. Dessa forma, esse trabalho propôs investigar as principais carboidrases presentes na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*. Além de avaliar o efeito das diferentes dietas sobre as atividades das carboidrases presentes no sistema circulatório e no sistema digestório dessa lagarta. As atividades de: amilase, α -fucosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -fructosidase, pectinase e celulase foram avaliadas na hemolinfa, nas frações do epitélio do intestino médio (ME) e no conteúdo luminal e na membrana peritrófica (MP). As pectinases e celulases foram identificadas somente no intestino, porém a amilase, a α -glucosidase, a β -glucosidase, a α -fucosidase e a β -fructosidase foram detectadas também na hemolinfa dessa lagarta. As despolimerases apresentaram as maiores atividades absolutas no espaço endoperitrófico e as enzimas envolvidas na digestão intermediária e final dos carboidratos concentravam-se mais no espaço ectoperitrófico de *Lonomia obliqua*. Os géis nativos e os pHs ótimos das carboidrases são distintos na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*. Somente os pHs ótimos das carboidrases das frações intestinais divergiram quando houve alterações nas dietas. Nos dois sistemas não foram detectadas atividades de α -galactosidase. Dessa forma, as β -fructosidasas foram as principais responsáveis pela hidrólise da rafinose e da sacarose. A presença da α -glucosidase indica que a hidrólise da sacarose nos cultivos celulares deve ser um resultado conjunto da β -fructosidase e da α -glucosidase presentes na hemolinfa. Dentre todas as carboidrases avaliadas, a β -fructosidase e a α -fucosidase foram selecionadas para estudo mais detalhados, pois essas enzimas foram pouco caracterizadas em Lepidoptera. Comportamentos cinéticos dessas enzimas foram divergentes nos dois sistemas dessa lagarta tanto pela eficiência catalítica como na presença dos inibidores. O transcriptoma do corpo inteiro de *Lonomia obliqua* confirmou a presença de um transcrito de α -fucosidase e dois transcritos de β -fructosidase. As análises proteômicas das frações cromatográficas enriquecidas dessas enzimas confirmaram as sequências proteicas dessas enzimas. Experimentos com RT-PCR revelaram que um transcrito de β -fructosidase é expresso exclusivamente nos túbulos de Malpighi e o outro transcrito no intestino médio e nos túbulos de Malpighi. Portanto, esse estudo amplia o conhecimento das carboidrases presentes nos dois sistemas de *Lonomia obliqua* e demonstra como as diferentes dietas influenciam nas atividades das carboidrases, especialmente nas intestinais e consequentemente na forma de absorção dos nutrientes. Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar se isso também afeta a qualidade do veneno e consequentemente do soro anti-lonômico. Além disso, os inibidores das carboidrases de *Lonomia obliqua*

poderão permitir futuramente o desenvolvimento de métodos eficazes para o controle desse inseto.

Palavras-chave: *Lonomia obliqua*. Hemolinfa. Intestino médio. Carboidrase.

ABSTRACT

TONELOTTO, M. **Bioprospecting the enzymes of biotechnological interest in *Lonomia obliqua***. 2016. 151 p. Ph.D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The number of hemorrhagic accidents caused by the *Lonomia obliqua* caterpillar has increased in recent years. Despite its medical importance, little is known about the physiology of such insect. The carbohydrases are essential for the growth of herbivorous. This caterpillar feeds mainly on leaves of fruit trees. Our research group found during cell culture experiments on the presence of anti-viral and anti-apoptotic proteins in the hemolymph of this caterpillar that some enzyme present in the hemolymph hydrolyzed sucrose from the cell culture medium in glucose and thereby increased the viability of that culture compared to the control. Thus, this work proposed to investigate the main carbohydrases present in the hemolymph and intestine of *Lonomia obliqua*. In addition to evaluating the effect of different diets on the activities of carbohydrases present in the circulatory system and in the digestive system of this caterpillar. The activities of: amylase, α -fucosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -fructosidase, pectinase and cellulase were evaluated in hemolymph, fractions of the midgut epithelium and luminal content and peritrophic membrane (MP). The pectinases and cellulases were identified only in the midgut, but amylase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase and β -fructosidase were also detected in the hemolymph of this caterpillar. The depolymerases have shown the biggest absolute activities were in the endoperitrophic space and the enzymes involved in the carbohydrates intermediate and final digestion were more concentrated in tissue samples of *Lonomia obliqua*. The native gels and the optimal pH of carbohydrases are distinct in the hemolymph and midgut of *Lonomia obliqua*. Only the optimum pHs of the carbohydrases from the midgut samples have diverged with diet changes. In both systems no α -galactosidase activities were detected. Thus, β -fructosidases were the main enzyme responsible for the hydrolysis of raffinose and sucrose. The presence of α -glucosidase has indicated that hydrolysis of sucrose in the cell cultures should be the result of combined activities of β -fructosidase and α -glucosidase from hemolymph. Among all the carbohydrases evaluated, the β -fructosidase and α -fucosidase were selected for further detailed study, as these enzymes were poorly characterized in Lepidoptera. Kinetic behaviors of these enzymes were divergent in both systems of this caterpillar regarding the catalytic efficiency and the effect of the inhibitors. The transcriptome of the entire body of *Lonomia obliqua* has confirmed the presence of a α -fucosidase transcript and two β -fructosidase transcripts. Proteomic analyzes of the enriched chromatographic fractions of these enzymes have confirmed the proteic sequences of these enzymes. Experiments with RT-PCR have revealed that a β -fructosidase transcript is exclusively expressed in the Malpighian tubules and another transcript is expressed in the midgut and Malpighian tubules. Therefore, this study broadens the knowledge of the carbohydrases present in both systems of *Lonomia obliqua* and demonstrates how the different diets influence in the activities of carbohydrases, especially in the digestive ones and consequently in the nutrients absorption. However, further studies are needed in order to verify if this also affects the quality of the venom and, consequently, the anti-lonomic serum. In addition, inhibitors of the carbohydrases of *Lonomia obliqua* may allow the development of effective methods for the control of this insect in the future.

Keywords: *Lonomia obliqua*. Hemolymph. Midgut. Carbohydrase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética baseada na análise de máxima verossemelhança. Nos ramos estão os valores dos nucleotídeos e dos aminoácidos	24
Figura 2 - (A) <i>Eacles imperialis</i> ; (B) <i>Attacus atlas</i> ; (C) <i>Actias luna</i> ; (D) <i>Lonomia obliqua</i>	25
Figura 3 - Número de acidentes notificados com lagartas por macro região do Brasil (A) regiões: Sul, Sudeste e Centro-Oeste e (B) regiões: Nordeste e Norte nos anos de 2007 a 2015..	27
Figura 4 - Lagartas da espécie <i>Lonomia obliqua</i> (A). Hábitos gregários (B)..	28
Figura 5 - Ciclo de vida da <i>Lonomia obliqua</i> : (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupas, (D) mariposa macho, (E) mariposa fêmea.....	29
Figura 6 - (A) Representação esquemática do sistema digestório da larva de inseto e (B) Representação esquemática do sistema digestório da larva de Lepidoptera.	33
Figura 7 - Domínios da estrutura tridimensional de α -amilase de <i>Tenebrio molitor</i> . O domínio A é representado pela cor azul, o B pela cor verde e o C pela cor vermelha. O íon cloreto e cálcio estão representados pela cor roxa e amarela, respectivamente. Os aminoácidos da tríade catalítica Asp 185, Glu 222 e Asp 287 são apresentados nas cores rosa.	37
Figura 8 - Um dos domínios da estrutura tridimensional de β -glucosidase de <i>Spodoptera frugiperda</i> (PDB: 5CGO). Os aminoácidos Glu 399, Glu 187 e Glu 451 são representados pelas cores: rosa, amarela e azul, respectivamente.	42
Figura 9 - Sequências das etapas cromatográficas utilizadas na purificação dos solúveis da hemolinfa e da MES1 para enriquecimento da α -L-fucosidase e β -fructosidase.	53
Figura 10 - Ensaio para a determinação das atividades absolutas (A) e específicas (B) de celulase, α -fucosidase, β -glucosidase, pectinase, amilase, α -glucosidase e β -fructosidase utilizando como substratos: CMC, MUFUC, NPBGLU, PEC, AMI, NPAGLU, SAC e RAF e os pHs das reações foram: 7,0; 5,0; 7,0; 7,0; 9,0; 7,0; 7,0 e 7,0, respectivamente. Estas medidas são médias de três diferentes lotes de hemolinfa, homogenizados de amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos da <i>Lonomia obliqua</i> alimentada com folhas de <i>Mangifera indica</i>	62
Figura 11 - Atividade das enzimas amilases, celulasas e pectinases utilizando AMI, CMC e PEC, respectivamente como substrato em amostras de frações intestinais (MES1, MES2, MES3 e MP). Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de homogeneizados dos intestinos de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas nas diferentes dietas.	64
Figura 12 - Atividade de amilase utilizando AMI como substrato em amostras de hemolinfa. Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas nas diferentes dietas.....	65
Figura 13 - Quantidade de amido (%) nas folhas de <i>Alchornea ssp</i> , <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Psidium guajava</i> e <i>Mangifera indica</i> às 10 h e 18 h. O cálculo da quantidade de amido nas folhas em porcentagem foi baseado na razão mg de amido por mg de peso seco de cada folha. As barras são as médias aritméticas $\pm$	66
Figura 14 - Efeito do pH sobre a atividade de amilase das amostras solúveis MP do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas com diferentes dietas: <i>Alchornea ssp</i> (A), <i>Eriobotrya japonica</i> (B), <i>Mangifera indica</i> (C), <i>Psidium guajava</i> (D) utilizando AMI como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 4,0; 5,0; 6,0), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0 e 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0).	67
Figura 15 - Efeito do pH sobre a atividade de pectinase das amostras solúveis MP do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> utilizando PEC como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão glicina com ácido clorídrico (pH 2,5); 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 3,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0; 7,5; 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5 e 9,0).	69

Figura 16 - Efeito do pH sobre a atividade de celulase das amostras solúveis MP do intestino utilizando CMC como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0 e 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pH 9,0).

..... 70

Figura 17 - Separação cromatográfica das (A) amilases (AMI) e das (B) pectinases (PEC) na coluna HiTrap Q das amostras solúveis do intestino MP (-■-) de *Lonomia obliqua*, gradiente salino em degraus crescente (-). O perfil de proteína está representado por..... 71

Figura 18 - Atividade sobre AMI (A) e PEC (B) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MP) de *Lonomia obliqua* das dietas: *Eriobotrya japonica* (1 e 5), *Psidium guajava* (2), *Mangifera indica* (3 e 6) e *Alchornea* ssp (4). Todas as amostras continham valores similares na quantidade de proteína. 72

Figura 19 - Atividades de pectinases (-■-) e proteína (-▲-) nas frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir do reunido das frações 15 e 16 da HiTrap Q do intestino (MP) (-■-) de *Lonomia obliqua*. Após os ensaios de atividades os volumes de retenções das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa). 73

Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações de AMI sobre a atividade do reunido ativo do intestino (MP) de *Lonomia obliqua* após fracionamento em cromatografia de interação iônica na coluna HiTrap Q FF. 74

Figura 21 - Efeito da presença de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂) e cloreto de magnésio (MgCl₂) sobre as atividades absolutas de amilase em amostras de MP utilizando AMI como substrato. Foram utilizados dois controles: amostra do homogeneizado do conteúdo e membrana peritrófica antes da diálise (AD) e amostra do homogeneizado do conteúdo e membrana peritrófica após diálise (DD). Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de homogeneizados dos intestinos de *Lonomia obliqua*. O cinza escuro e cinza claro referem-se às condições de diálises que foram submetidas às amostras de MP, ou seja, a diálise contra tampão e a diálise contra EDTA, respectivamente. 75

Figura 22 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de amilases de *Tenebrio molitor* (TM), *Bombxy mori* (BM), *Homo sapiens* (HM), *Mus musculus* (MM), sequência 1 de *Lonomia obliqua* (LO1) e sequência 2 de *Lonomia obliqua* (LO2). Seguindo a numeração de *Tenebrio molitor*, os resíduos destacados em amarelo correspondem a tríade catalítica (Asp 185, Glu 222 e Asp 287), os destacados em verde indicam os resíduos envolvidos com a interação com os íons cloreto e os destacados em rosa com os íons cálcio. 77

Figura 23 - Ensaio para a determinação de atividade β-glucosidase utilizando NPBGLU como substrato. Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa (H) e homogeneizados das amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos de *Lonomia obliqua* em diferentes dietas. 78

Figura 24 - Efeito do pH sobre a atividade β-glucosidase das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchornea* ssp (A), *Eriobotrya japonica* (B), *Mangifera indica* (C), *Psidium guajava* (D) e das amostras de hemolinfa (E). Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão glicina com ácido clorídrico (pH 2,5); 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 3,0; 4,0; 4,2; 4,5; 4,8; 5,0; 5,2; 5,5; 6,0; 6,2; 6,5), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 6,8; 7,0; 7,2; 7,5; 7,7; 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0). 80

Figura 25 - Separação cromatográfica da β-glucosidase na coluna HiTrap Q da hemolinfa (-□-) e das amostras solúveis do intestino MES1 (-■-) de *Lonomia obliqua*, gradiente salino em degraus crescente (-). O perfil de proteína está representando por (-▲-). 81

Figura 26 - Atividade sobre MUBGLU após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MES1) de *Lonomia*

<i>obliqua</i> nas dietas: <i>Eriobotrya japonica</i> (1), <i>Psidium guajava</i> (2), <i>Mangifera indica</i> (3) e <i>Alchornea</i> ssp (4). Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteína.	82
Figura 27 - Atividades de β -glucosidases nas frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir da hemolinfa (A) (-□-) e do intestino (B) (-■-) de <i>Lonomia obliqua</i> . O perfil de proteína está representando por (-▲-). Após os ensaios de atividades os volumes de retenções das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).	83
Figura 28 - Enzimas que hidrolisam a SAC, NPAGLU e RAF quantificadas por atividade absoluta (mU/mL) na hemolinfa (H) nos homogeneizados do intestino médio sob a influência de diferentes dietas da <i>Lonomia obliqua</i> . As medidas de atividade específica foram feitas e refletem o mesmo resultado que a atividade absoluta.	84
Figura 29 - Quantidades de μ g de glicose, frutose, sacarose e rafinose por mL de extração das folhas de <i>Alchornea</i> ssp, <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i> as 10h e 18h. As barras são as médias aritméticas $\pm$ erros padrões das médias.	86
Figura 30 - Efeito do pH sobre a atividade α -glucosidases (NPAGLU e SAC) e β -fructosidases (SAC e RAF) das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas com diferentes dietas: <i>Alchornea</i> ssp (A, G e K), <i>Eriobotrya japonica</i> (B, H e L), <i>Mangifera indica</i> (C, I e M), <i>Psidium guajava</i> (D, J e N) e das amostras de hemolinfa (E, F e O). As barras são as médias aritméticas de triplicatas das amostras de hemolinfa e intestino (MES1) $\pm$ erros padrões.	88
Figura 31 - Atividade sobre MUAGLU (A) e RAF (B) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i> das dietas: <i>Eriobotrya japonica</i> (1), <i>Psidium guajava</i> (2), <i>Mangifera indica</i> (3) e <i>Alchornea</i> ssp. Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteínas.	90
Figura 32 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Q da hemolinfa (-□-) e das amostras solúveis do intestino MES1 (-■-) de <i>Lonomia obliqua</i> e gradiente salino em degraus crescentes (--).	91
Figura 33 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Fenil FF a partir de frações ativas sobre sacarose e rafinose após cromatografia em coluna HiTrap Q da amostra de hemolinfa (-□-) e das amostras dos solúveis do intestino MES1 (-■-) de <i>Lonomia obliqua</i> . Gradiente salino em degraus decrescentes (--).	92
Figura 34 - Atividades de α -glucosidases e β -fructosidases em frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir das frações ativas após combinação de cromatografias de troca iônica e hidrofóbica que tiveram como amostra inicial a porção solúvel do homogenizado do intestino (MES1) (-■-) e da hemolinfa (-□-) de <i>Lonomia obliqua</i> . Após os ensaios de atividades os volumes de retenção das enzimas em estudo foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa)...	93
Figura 35 - (A) Eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS para preparação da β -fructosidase isolada a partir da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i> . Como padrão foi utilizado a mistura pré-corada <i>Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder</i> (Thermo Scientific, EUA). (B) Regressão linear das massas moleculares e da migração relativa de proteínas padrão Massa molecular da β -fructosidase (□).	93
Figura 36 - Efeito da concentração de RAF (A e C) e SAC (B e D) sobre a atividade do reunido ativo da hemolinfa (A e B) e de intestino (MES1) (C e D) das β -fructosidases de <i>Lonomia obliqua</i> . O valor do coeficiente de correlação linear (R) de todos os plotes de Lineweaver-Burk é de 0,999.	94
Figura 37 - Inibição da atividade de β -fructosidase por Tris: (A) β fruHcom RAF (♦) controle, (▪) 2,5 mM de inibidor, (▲) 5 mM de inibidor, (x) 7,5 mM de inibidor, (*) 10 mM de inibidor; (●) 15 mM de inibidor; (B) β fruH com SAC (♦) controle, (▪) 2,5 mM de inibidor, (▲) 5 mM de inibidor, (x) 7,5 mM de inibidor, (*) 11 mM de inibidor; (C) β frul com RAF (♦) controle, (▪) 10 mM de inibidor, (▲) 20 mM de inibidor, (x) 27 mM de inibidor, (-) 34 mM de inibidor, (●) 40 mM de inibidor; (D) β frul com SAC (♦) controle, (▪) 5 mM de inibidor, (▲) 10 mM de inibidor, (x) 20 mM de inibidor, (*) 40 mM de inibidor. ...	96

Figura 38 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de β -fructosidases de <i>Bifidobacterium longum</i> (BM), <i>Arabidopsis thaliana</i> (AT), <i>Bacillus subtilis</i> (BS), <i>Thermotoga maritima</i> (TM), <i>Daucus carota</i> (DC), <i>Operophtera brumata</i> (OB), <i>Manduca sexta</i> (MS), <i>Lonomia obliqua</i> (β fru1 e β fru2). Seguindo a numeração de <i>Bifidobacterium longum</i> (BL), os resíduos destacados em rosa são os nucleófilos catalíticos e os destacados em verde indicam os resíduos envolvidos na catálise ácido-base.....	99
Figura 39 - Sequência de β -fructosidase indetificada no transcriptoma de lagartas inteiras de <i>Lonomia obliqua</i> . A sequência completa foi identificada no transcriptoma e as sequências grifadas em azul e destacadas em cinza são os peptídeos identificados no proteoma. Análise por espectrometria de massas e identificação de peptídeos a partir de amostras de: (A) beta-fructosidase – β fru1 no intestino médio, (B) beta-fructosidase – β fru2 no intestino médio, (C) beta-fructosidase – β fru1 na hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	100
Figura 40 - Gel de agarose 1% do produto de PCR utilizando os iniciadores específicos para amplificação de: β fru1, β fru2 e actina (gene endógeno) a partir do cDNA de: carcaça (C), hemolinfa (H), intestino médio total (IT), intestino médio anterior (IA), intestino médio posterior (IP) e túbulos de Malpighi (TM) de <i>Lonomia obliqua</i> . Quantidades iguais de (5 μ g) de RNA extraídos desses tecidos, tratados com DNase e posteriormente utilizados como molde para a reação da transcriptase reversa (RT). O padrão utilizado foi GeneRuler (M) 1 kb DNA Ladder.	101
Figura 41 - Ensaios de atividade de α -fucosidase utilizando MUFUC como substrato em amostras de porções distintas do intestino e da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i> . Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa (H) e homogeneizados das amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos das diferentes dietas de <i>Lonomia obliqua</i>	102
Figura 42 - Efeito do pH sobre a atividade α -fucosidase das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas com diferentes dietas: <i>Alchornea</i> ssp (A), <i>Eriobotrya japonica</i> (B), <i>Mangifera indica</i> (C), <i>Psidium guajava</i> (D) e das amostras de hemolinfa (E).....	104
Figura 43 - Separação cromatográfica das atividades da α -fucosidase e da α -glucosidase em coluna HiTrap Q FFA partir das amostras da hemolinfa (-□-) e das amostras da porção solúvel do epitélio do intestino MES1 (-■-) de <i>Lonomia obliqua</i> . Gradiente salino em degraus crescente (--).	105
Figura 44 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Fenil FF da hemolinfa (-□-) de <i>Lonomia obliqua</i> e gradiente salino em degraus decrescentes (--).	106
Figura 45 - Atividade sobre MUAGLU (1 e 3) e MUFUC (2 e 4) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos epitélios dos intestinos médios (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i> provenientes das dietas: <i>Eriobotrya japonica</i> (A), <i>Psidium guajava</i> (G), <i>Mangifera indica</i> (M) e <i>Alchornea</i> ssp. (T). Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteínas.....	106
Figura 46 - Separação em filtração em gel coluna Superdex G- 75 a partir de amostra bruta da hemolinfa (-□-) e de reunidos ativos após cromatografia em coluna de troca iônica (Figura 43) da porção solúvel do epitélio do intestino médio (MES1) (-■-) de <i>Lonomia obliqua</i> . (A) Atividades de α -glucosidases utilizando NPAGLU como substrato e (B) atividade de α -fucosidases utilizando MUFUC como substrato. Após os ensaios de atividades os volumes de retenção das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).	107
Figura 47 - Efeito da concentração de MUFUC sobre a atividade do reunido ativo da hemolinfa (α fucH) (A) e do intestino (α fucI) (B) de <i>Lonomia obliqua</i> após fracionamento em cromatografia de troca aniônica na coluna HiTrap Q FF.	108
Figura 48 - Inibição da α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconojirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> : pela fucose (C) e pela fuconojirimicina (D).	108
Figura 49 - Determinação do modo de inibição α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconojirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> : pela fucose (C) e pela fuconojirimicina (D).	109

Figura 50 - Inibição da α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconojirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> : pela fucose (C) e pela fuconojirimicina (D).....	110
Figura 51 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de α -fucosidases de <i>Thermotoga maritima</i> (TM), <i>Homo sapiens</i> (HS), <i>Drosophila melanogaster</i> (DM), <i>Mus musculus</i> (MM), <i>Spodoptera litura</i> (SL), <i>Bombxy mori</i> (BM), <i>Lonomia obliqua</i> (α FULO) os resíduos destacados em amarelo são os nucleófilos catalíticos e os destacados em rosa indicam os resíduos relacionados a catálise ácido-base. Os resíduos destacados em verde correspondem aos bolsos hidrofóbicos, os resíduos destacados em cinza são os de interação com o substrato e os resíduos destacados em vermelho alteram o valor do pKa e participam da catálise.	112
Figura 52 - Sequência da (A) α -fucosidase – α fuchH na hemolinfa, (B) α -fucosidase - α fucI no intestino médio identificada no transcriptoma (Illumina) e no proteoma (<i>Shotgun mass spectrometry</i>) da hemolinfa e do intestino médio de <i>Lonomia obliqua</i> . A sequência completa foi identificada no transcriptoma e as sequências grifadas em azul e destacadas em cinza são os peptídeos identificados no proteoma.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substratos hidrolisados pelas carboidrases presentes nesse trabalho.	46
Tabela 2 - Substratos utilizados e condições de ensaio de detecção de hidrolases.	50
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados na realização da RT-PCR semi-quantitativa.....	59
Tabela 4 - Efeito do pH sobre a atividade de amilase das amostras solúveis da fração MP do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> . Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.....	68
Tabela 5 - Efeito do pH sobre a atividade de pectinase das amostras solúveis da fração MP do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> . Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.	69
Tabela 6 - Efeito do pH sobre a atividade de β -glucosidase das amostras de hemolinfa e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> . Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.	80
Tabela 7 - Efeito do pH sobre a atividade α -glucosidases e β -fructosidases de amostras de diferentes tecidos de lagartas de <i>Lonomia obliqua</i> alimentada em diferentes dietas. Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.	89
Tabela 8 - Efeito da concentração dos substratos RAF e SAC sobre a atividade de β -frutosidase isoladas da hemolinfa (β fruH) e do intestino MES1 (β frul).	95
Tabela 9 - Valores de IC ₅₀ sobre a atividade de β fruH e β frul parcialmente isoladas de <i>Lonomia obliqua</i> utilizando como inibidores a glicose, a frutose e o Tris.....	95
Tabela 10 - Valor do pH das amostras de hemolinfa e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de <i>Lonomia obliqua</i> alimentadas com diferentes dietas: <i>Alchornea</i> sp (Euphorbiaceae), <i>Eriobotrya japonica</i> (Rosacea), <i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae), <i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae) em comparação com outras Lepidoptera.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI - amido

α fuch - α -fucosidase isolada da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

α fucl – α -fucosidase isolada do intestino de *Lonomia obliqua*

β fruH – β -fructosidase isolada da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

β frul - β -fructosidase isolada do intestino de *Lonomia obliqua*

CMC – Carboximetilcelulose

DNS – Ácido dinitrosalicílico

HCl – Ácido clorídrico

MUAGLU – 4-metilumbeliferil- α -L-glucopiranosídeo

MUBGLU – 4-metilumbeliferil- β -L-glucopiranosídeo

MUFUC – 4-metilumbeliferil- α -L-fucopiranosídeo

NPAGLU – 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo

NPAGAL – 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo

NPBGAL – 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

NPBGLU – 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo

K_i – constante de inibição

K_m – constante de Michaelis-Menten

MR – migração relativa

PEC - Pectina

RAF – Rafinose

SAC – Sacarose

Tris – hidroximetilaminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Lepidoptera	23
1.1.1	<i>Lonomia obliqua</i>	27
1.2	Produtos de interesse biotecnológico	30
1.3	Sistema circulatório dos insetos	31
1.4	Sistema digestório dos insetos	33
1.5	Enzimas	34
1.5.1	Amilases	35
1.5.2	Pectinases	37
1.5.3	Celulases	39
1.5.4	α -glucosidases	40
1.5.5	β -glucosidases	41
1.5.6	α -galactosidases	43
1.5.7	β -fructosidases	43
1.5.8	α -fucosidases	44
1.6	Carboidrases e seus substratos	45
2	OBJETIVO	47
2.2	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Coleta, manutenção e disseções das lagartas	48
3.1.1	<i>Lonomia obliqua</i>	48
3.2	Preparo das amostras	49
3.3	Ensaio enzimático para detecção das hidrolases em estudo e estimativa da quantidade de proteína	49
3.4	Efeito do pH sobre as atividades das carboidrases	50
3.5	Preparação enzimática das folhas de <i>Alchornea</i> ssp, <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	51
3.6	Determinação dos carboidratos solúveis nas folhas de <i>Alchornea</i> ssp, <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	51
3.7	Quantificação dos açúcares solúveis totais das folhas de <i>Alchornea</i> ssp, <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	51
3.8	Extração e dosagem de amido das folhas de <i>Alchornea</i> ssp, <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	52
3.9	Estimativa da massa molecular	52
3.10	Separação cromatográfica e purificação	53
3.10.1	Passo I – Troca Aniônica em Hitrap Q FF	53
3.10.2	Passo II – Interação Hidrofóbica em Hitrap Fenil FF	54
3.11	Determinação da concentração do substrato sobre a atividade de α -fucosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i>	54
3.12	Determinação da concentração do substrato sobre a atividade de β -fructosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i>	54
3.13	Efeito de fucose e fuconojirimicina sobre a atividade α -fucosidase da hemolinfa e do intestino (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i>	55
3.14	Efeito do Tris, frutose e glicose sobre as atividades de β -fructosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i>	55
3.15	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sds	55
3.16	Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida	56
3.16.1	Gel nativo de α -fucosidase	56
3.16.2	Gel nativo de α -glucosidase e β -glucosidase	56
3.16.3	Gel nativo de β -fructosidase	56
3.16.4	Gel nativo de amilase	57
3.16.5	Gel nativo de pectinase	57
3.17	Extração de RNA total	57
3.18	Tratamento com DNase	58
3.18.1	Síntese da fita de cDNA	58
3.18.2	Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)	58
3.18.3	Eletroforese de DNA em gel de agarose	59
3.19	Preparação da biblioteca de mRNA e sequenciamento	59

3.20	Procedimentos do proteômica	60
4	RESULTADOS	61
4.1	Identificação das carboidrases, das bactérias intestinais e avaliação do pH na hemolinfa e no intestino de <i>Lonomia obliqua</i>	61
4.1.1	Identificação das carboidrases presentes no sistema circulatório e digestório de <i>Lonomia obliqua</i>	61
4.1.2	Identificação das bactérias intestinais de <i>Lonomia obliqua</i>	63
4.1.3	Avaliação do pH dos intestinos médios e da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	63
4.2	Avaliação das despolimerases presentes no intestino e na hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	63
4.2.1	Presença de amilase, celulase e pectinase intestinal em <i>Lonomia obliqua</i>	63
4.2.2	Presença de amilase, celulase e pectinase na hemolinfa em <i>Lonomia obliqua</i>	65
4.2.3	Quantificação de amido nas folhas das plantas de <i>Alchornea ssp</i> , <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	66
4.2.4	Determinação dos pHs ótimos das despolimerases intestinais de <i>Lonomia obliqua</i>	67
4.2.4.1	DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA AMILASE DO INTESTINO DE <i>Lonomia obliqua</i>	67
4.2.4.2	DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA PECTINASE DO INTESTINO DE <i>Lonomia obliqua</i>	68
4.2.4.3	DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA CELULASE DO INTESTINO DE <i>Lonomia obliqua</i>	69
4.2.5	Separação cromatográfica e géis nativos das amilases e pectinases das amostras intestinais (MP) de <i>Lonomia obliqua</i>	70
4.2.6	Efeitos de diferentes concentrações do substrato AMI sobre a atividade da amilase do intestino (MP) de <i>Lonomia obliqua</i>	73
4.2.7	Efeito da presença de íons sobre as atividades das amilases de <i>Lonomia obliqua</i>	74
4.2.8	Sequências das amilases de <i>Lonomia obliqua</i>	76
4.3	Presença de β -glucosidase na hemolinfa e no intestino médio de <i>Lonomia obliqua</i>	78
4.3.1	Determinação do pH ótimo das β -glucosidases de <i>Lonomia obliqua</i>	79
4.3.2	Separação cromatográfica, géis nativos e determinação da massa molecular das β -glucosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	81
4.4	Presença de β -fructosidases na hemolinfa e no intestino médio de <i>Lonomia obliqua</i>	83
4.4.1	Quantificação de glicose, frutose, rafinose e sacarose nas folhas das plantas de <i>Alchornea ssp</i> , <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Mangifera indica</i> e <i>Psidium guajava</i>	85
4.4.2	Determinação do pH ótimo das β -fructosidases de <i>Lonomia obliqua</i>	86
4.4.3	Separação cromatográfica e géis nativos das α -glucosidases e das β -fructosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	89
4.4.4	Efeitos do substrato RAF e SAC sobre a atividade da β -fructosidase da hemolinfa (β fruH) e do intestino (MES1) (β frul) de <i>Lonomia obliqua</i>	94
4.4.5	Efeito do Tris, da frutose e da glicose sobre a atividade de β -fructosidase da hemolinfa (β fruH) e do intestino (MES1) (β frul) de <i>Lonomia obliqua</i>	95
4.4.6	Análise do proteômica e do transcriptoma para as sequências de β -fructosidase	96
4.4.7	Análise da expressão das β -fructosidases em diferentes tecidos de <i>Lonomia obliqua</i> por RT-PCR	101
4.5	Presença de α -fucosidase na hemolinfa e no intestino médio de <i>Lonomia obliqua</i>	101
4.5.1	Determinação do pH ótimo da α -fucosidase presente na hemolinfa e no intestino de <i>Lonomia obliqua</i>	103
4.5.2	Separação cromatográfica e géis nativos das α -glucosidases e das α -fucosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	105
4.5.3	Efeitos de diferentes concentrações do substrato MUFUC sobre a atividade da α -fucosidase da hemolinfa (α fuch) e do intestino (MES1) (α fucl) de <i>Lonomia obliqua</i>	107
4.5.4	Efeito de fucose e fuconojirimicina sobre a atividade de α -fucosidase da hemolinfa e do intestino (MES1) de <i>Lonomia obliqua</i>	108
4.5.5	Análise proteômica e do transcriptoma para as sequências de α -fucosidase	110
5	DISCUSSÃO	114
5.1	Carboidrases presentes na hemolinfa e no intestino de <i>Lonomia obliqua</i>	114
5.2	Avaliação das diferentes alimentações nas atividades enzimáticas das carboidrases do sistema circulatório e digestório de <i>Lonomia obliqua</i>	118
5.3	Interferência das diferentes alimentações nos pHs ótimos e nos géis nativos das carboidrases do sistema circulatório e digestório de <i>Lonomia obliqua</i>	121
5.4	Isoformas e massas moleculares das carboidrases de <i>Lonomia obliqua</i>	127
5.5	relação do K_m das amilases, α -fucosidases e β -fructosidases de <i>Lonomia obliqua</i> com os substratos específicos dessas enzimas	129

5.6	Relação das α -fucosidases e β -fructosidases de <i>Lonomia obliqua</i> com seus respectivos inibidores	130
5.7	Sequências das amilases, α -fucosidases e β -fructosidases de <i>Lonomia obliqua</i>	131
5.8	Contribuições desse trabalho	135
6	CONCLUSÃO	137
	REFERÊNCIAS	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lepidoptera

As borboletas e as mariposas compõem a ordem Lepidoptera composta por mais de 160.000 espécies descritas, embora muitas espécies desconhecidas possam elevar esse número em meio milhão (KAWAHARA; BREINHOLT, 2014). As espécies de Lepidoptera são essenciais para o ecossistema, pois se destacam por serem eficientes herbívoros e polinizadores (REGIER et al., 2013).

Entretanto, devido à herbivoria durante sua fase larval, estes animais são importantes pragas agrícolas podendo causar danos e prejuízos ao sistema agrícola e também problemas de saúde pública (BERGER et al., 2010; REGIER et al., 2009). Por outro lado, essas lagartas proporcionam importantes modelos para estudos científicos tais como: genética, fisiologia, morfologia e muitos aspectos ecológicos principalmente relacionados a biologia evolutiva e coevolução na interação da lagarta com a planta. Essa interação foi importante para a mega-radiação das angiospermas (KAWAHARA; BREINHOLT, 2014).

As relações filogenéticas são fundamentais para compreender a diversidade, adaptações e os papéis ecológicos em Lepidoptera (REGIER et al., 2009). A ordem Lepidoptera abrange de 45 a 47 superfamílias, 115 a 124 famílias e 303 a 332 subfamílias no sistema de classificação de Kristensen (REGIER et al., 2013). Dentro da superfamília Bombycoidea, a Saturniidae é a maior família com mais espécies. As famílias Sphingidae e a Bombycidae são grupos irmãos da Saturniidae (Figura 1).

Figura 1 - Árvore filogenética baseada na análise de máxima verossimilhança. Nos ramos estão os valores dos nucleotídeos e dos aminoácidos. Figura adaptada de (Kawahara; Breinholt, 2014).

A família Saturniidae inclui as maiores espécies de Lepidoptera (REGIER et al., 2009), como a mariposa imperial (*Eacles imperialis*), mariposa-atlas (*Attacus atlas*), mariposa-lua (*Actias luna*), taturana assassina (*Lonomia obliqua*) entre outras espécies (Figura 2). Essa família apresenta mais de 1800 espécies, 162 gêneros e nove subfamílias de acordo com a classificação de Lemaire e Mine (REGIER et al.,

2009). No Brasil, foram registradas mais de 400 espécies da família Saturniidae (DE CAMARGO; BECKER, 1999).

Figura 2 - (A) *Eacles imperialis*; (B) *Attacus atlas*; (C) *Actias luna*; (D) *Lonomia obliqua*. Fontes: I, Joelmills. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2382830>>. Acesso em: 07 de nov. 2016. Sachin Palkar. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3549785>>. Acesso em: 07 de nov. 2016. Megan McCarty. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7660693>>. Acesso em: 07 de nov. 2016. Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.cit.sc.gov.br>>. Acesso em: 07 de nov. 2016.

No Brasil, as espécies das famílias Saturniidae e Magalopygidae são conhecidas por causarem reações adversas nos seres humanos. Entretanto, somente as lagartas do gênero *Lonomia* (Saturniidae) destacam-se pelos acidentes de importância médica (SPADACCI-MORENA et al., 2016). A partir de 2008, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) reformulou a página virtual de notificações de agravos à saúde e não discrimina os gêneros de Lepidoptera relacionados com os acidentes. Entre os anos de 2007 até 2015, a

região Sul seguida da região Sudeste registraram os maiores casos de acidentes relacionados com lagartas quando comparados às demais regiões do país (Centro Oeste, Nordeste e Norte) (Figura 3). No entanto, o número de acidentes pode ser ainda maior, pois a falta de registros de sub-notificações e o baixo incentivo das divulgações dos estudos relacionados a esses insetos contribuem para esse fato (MORAES, 1992).

Figura 3 - Número de acidentes notificados com lagartas por macro região do Brasil (A) regiões: Sul, Sudeste e Centro-Oeste e (B) regiões: Nordeste e Norte nos anos de 2007 a 2015. Disponível em: <http://sinan.saude.gov.br>. Acesso em: 07 de nov. 2016.

1.1.1 *Lonomia obliqua*

As lagartas da espécie *Lonomia obliqua* (Figura 4) (Lepidoptera: Saturniidae) são encontradas na América do Sul. No Brasil, são popularmente chamadas de “taturanas” (do tupi guarani “semelhante a fogo”) e são localizadas em todo território nacional, porém concentram-se mais nas regiões sul e sudeste do país (MORAES, 1992; WOLFF et al., 2002).

Inicialmente, a *Lonomia obliqua* alimentava-se das árvores do Araticum (*Rollinia emarginata*), do Cedro (*Cedrella fissilis*) e do Ipê (*Tebula pulcherrima*) que compunham a cobertura vegetal nativa da Mata Atlântica. Porém, o avanço do desmatamento e favorecimento de monocultura estimulou as formas larvais dessa espécie a incluir novas espécies vegetais na sua dieta, como as folhas de árvores frutíferas (GARCIA, 2006). Alguns exemplos são: a goiaba (*Psidium guajava*), a ameixa amarela (*Eriobotrya japonica*), a manga (*Mangifera indica*), o pêssego (*Prunus persica*), a figueira (*Ficus carica*), o abacate (*Persea gratissima*), o tapiá (*Alcornea* ssp) dentre outras (MORAES, 1992).

As lagartas desta espécie de mariposas apresentam um colorido marrom com listas negras longitudinais e a presença de cerdas venenosas e urticantes. Também apresentam hábitos gregários e durante o dia permanecem nos troncos das árvores frutíferas das quais se alimentam e esse comportamento potencializa a gravidade dos acidentes (Figura 4) (MORAES, 1992; SPADACCI-MORENA et al., 2016).

Figura 4 - Lagartas da espécie *Lonomia obliqua* (A). Hábitos gregários (B). Fonte: (Moraes, 1992).

Quando ocorre o contato acidental com as espículas da *Lonomia obliqua* há a liberação de toxinas, que afetam a cascata de coagulação e desencadeiam o processo inflamatório no ser humano (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007; MORAES, 1997; VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001;). Acredita-se que o envenenamento pode envolver não só a injeção da secreção, mas

também de outros fluidos da lagarta, como a hemolinfa (SPADACCI-MORENA et al., 2016; VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001).

Uma forte sensação de dor e queimação no local do contato com as cerdas da *Lonomia obliqua* são os primeiros sintomas do envenenamento seguidos de dor de cabeça e náusea. Os efeitos adversos podem ser ainda mais drásticos como: hemorragia difusa, insuficiência renal, dano cerebral e nos casos mais graves, à morte (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007; PINTO et al., 2010; WOLFF et al., 2002).

A fase larval da *Lonomia obliqua* está compreendida em seis instares e esse período pode variar de quatro meses e meio a oito meses e meio. Posteriormente, estes insetos atingem a fase de pupa cuja duração pode variar de 46 a 92 dias e após a emergência do adulto, novos ovos são colocados dando início a um novo ciclo. Esta espécie apresenta dimorfismo sexual na fase adulta, pois a mariposa fêmea é maior e apresenta uma coloração parda-rosada e a mariposa macho é menor e mais amarelada, com tonalidades mais vivas, porém ambas possuem uma listra transversal sobre as asas (Figura 5) (LORINI; CORSEUIL, 2001; MORAES, 1997; VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001).

Figura 5 - Ciclo de vida da *Lonomia obliqua*: (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupas, (D) mariposa macho, (E) mariposa fêmea. Fonte: (Moraes, 1992).

Os parasitóides *Belvosia wiedemanni*, *Leschenaultia* ssp, *Moreiria wiedemanni*, *Lespesia affinis* (Diptera), a *Enicospilus* ssp (Hymenoptera) e poliedrovírus (vírus) impedem o desenvolvimento do ciclo biológico da lagarta (LORINI; CORSEUIL, 2001; MORAES, 1997). Porém o extermínio dos inimigos naturais por agrotóxicos, o desmatamento para o cultivo de monoculturas podem estar relacionados com o aumento populacional da *Lonomia obliqua* (GARCIA, 2006; LORINI; CORSEUIL, 2001).

Dessa forma, o número de acidentes com estas taturanas aumentaram no sul e sudeste do país (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007). Naturalmente, os trabalhos na literatura concentram-se mais nas cerdas. Porém, há uma lacuna de informações sobre as proteínas presentes no sistema digestório e circulatório deste animal. Diante disso, é necessário um conhecimento mais detalhado dessas proteínas e a elucidação de seus papéis fisiológicos presentes nesses sistemas. Esses estudos permitirão desenvolver novas técnicas para o controle da *Lonomia obliqua*, a qual tem se caracterizado como um problema de saúde pública.

1.2 Produtos de interesse biotecnológico

Nas últimas décadas há um aumento significativo do uso de proteínas na indústria. A biodiversidade brasileira se destaca como um vasto campo a ser explorado na busca por novas proteínas de aplicação biotecnológica. Neste contexto, a lagarta *Lonomia obliqua* ganhou destaque devido às proteínas de interesse biotecnológico identificadas na hemolinfa e no seu veneno.

Novas proteínas de interesses biotecnológicos foram isoladas das cerdas e do veneno da *Lonomia obliqua* e atuam de diferentes formas na cascata de coagulação, tais como: Lopap (proteína ativadora de protombina) que aumentou o tempo de coagulação através da depleção do fibrinogênio, resultando na dissolução de trombos. Tanto na sua forma nativa, quanto na forma recombinante (REIS et al., 2001; REIS et al., 2006). Os mesmos autores esperam produzir um fármaco com essa proteína e assim auxiliar na reversão dos casos de trombooses. Outra proteína denominada como Losac (ativador de fator X) foi isolada do veneno de *Lonomia obliqua* e aumentou, nos cultivos celulares, a proliferação das células endoteliais da

veia umbilical humana, inibiu a apoptose e também é responsável pelo fator pró-coagulante (ALVAREZ FLORES et al., 2006).

Uma série de proteínas com diferentes atividades biológicas foram descobertas na hemolinfa da *Lonomia obliqua* tais como: anti-virais, anti-apoptóticas e enzimas responsáveis por aumentar a longevidade celular (CARMO et al., 2012; GRECO et al., 2009; MARANGA et al., 2003; SOUZA et al., 2005).

Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que visem o conhecimento de outras proteínas presentes na hemolinfa ou em outros sistemas com potenciais biotecnológicos.

1.5 Sistema circulatório dos insetos

O sistema circulatório dos insetos é um sistema aberto no qual a hemolinfa circula pela hemocele dos insetos, sendo constituído por um fluido que contém os hemócitos. A hemolinfa é o contato direto entre todos os tecidos e assim fornece manutenção para todo o corpo (CHAPMAN, 1998; HANDKE et al., 2013).

A hemolinfa contém diferentes proteínas que são usualmente classificadas através das suas funções. Podem estar relacionadas com: resposta imunológica, armazenamento, proteínas transportadoras de lipídeos, enzimas, inibidores de enzimas, resposta imune dentre outros (CHAPMAN, 1998), porém muitas proteínas nem sempre são conhecidas bem como suas funções e seus papéis fisiológicos e, portanto, requerem maiores estudos. A hemolinfa das larvas de Lepidoptera corresponde cerca de 40% da massa corpórea e contém 50% da água do corpo destes animais refletindo a importância das funções hidrostáticas da hemolinfa nestes animais (CHAPMAN, 1998).

Apesar da importância da hemolinfa para os insetos em relação ao desenvolvimento e manutenção dos processos fisiológicos, há pouco conhecimento sobre sua composição. As análises bioquímicas revelaram a presença de sais inorgânicos, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, açúcares e há poucas informações sobre as proteínas presentes na hemolinfa. Entretanto, o advento do proteoma tem auxiliado a identificar as proteínas presentes nesse fluido em diferentes insetos, especialmente as proteínas relacionadas com o sistema imune, principalmente em *Drosophila melanogaster* considerado o modelo ideal para esse tipo de estudo (HANDKE et al., 2013; ROCHA et al., 2016). As proteínas de

reconhecimento envolvidas no sistema imunológico, presentes no sistema circulatório dos insetos, aderem aos polissacarídeos das paredes celulares das bactérias e de fungos invasores como os peptideoglicanos, β -1,3-glucanos e lipopolissacarídeos, que induzem as enzimas relacionadas às respostas imunes (PAUCHET et al., 2009).

Algumas dessas proteínas foram identificadas na hemolinfa de Lepidoptera e outras ordens de insetos tais como: a fenoloxidase, que é uma importante enzima envolvida no sistema imune dos invertebrados sendo relacionada com a cascata de coagulação (FENG et al., 2008); a tirosinase, que é responsável pelo enrijecimento do exoesqueleto e oxidação da hemolinfa (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995).

As proteínas da hemolinfa relacionadas às respostas imunológicas são alvos de estudo nos insetos, pois seus sistemas imunes inatos lhes proporcionam uma gama de respostas celulares e humorais contra o ataque de patógenos e assim garantem seu sucesso evolutivo (ROCHA et al., 2016; WOJDA, 2016). No entanto, poucos estudos estão relacionados com as carboidrases presentes na hemolinfa de Lepidoptera. Uma das poucas carboidrases da hemolinfa destacadas na literatura é a trealase. Essa enzima na hemolinfa foi registrada em: *Periplaneta americana*, *Locusta migratoria*, *Phormia regina*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*. Entretanto, o papel biológico desta trealase na hemolinfa ainda não foi completamente elucidado. Aparentemente, esta trealase da hemolinfa está relacionada à manutenção dos níveis de trealose circulante (CHAPMAN, 1998). Alfa-amilases distintas foram detectadas na hemolinfa e no sistema digestório de *Bombxy mori*, porém a expressão dessa enzima ocorreu somente no intestino. As diferenças cinéticas das amilases da forma digestiva e da hemolinfa de *Bombxy mori* devem-se as modificações pós-traducionais. A função da α -amilase na hemolinfa desta lagarta pode estar relacionada à degradação de glicogênio do corpo gorduroso (NGERNYUANG et al., 2011). Ao investigar novas proteínas anti-virais na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, nosso grupo de pesquisa verificou também a presença de uma enzima no sistema circulatório dessa lagarta que era capaz de hidrolisar a sacarose do meio do cultivo celular em glicose (MARANGA et al., 2003). Diante disso, a hipótese inicial desse trabalho está correlacionada em investigar quais eram as enzimas presentes na hemolinfa de *Lonomia obliqua* que são responsáveis por essa hidrólise.

Muitas carboidrases provenientes do sistema digestório de Lepidoptera foram caracterizadas, dado que estas enzimas são fundamentais para processar o alimento tornando possível a obtenção de açúcares como nutrientes, bem como a absorção destes pelo epitélio intestinal e o posterior transporte para a hemolinfa e, desta forma, para todos os outros tecidos (BEYENBACH, 2016). Contudo, poucas enzimas que degradam carboidratos na hemolinfa destes animais foram exploradas e estudadas.

1.4 Sistema digestório dos insetos

As enzimas produzidas pelo sistema digestório dos insetos hidrolisam o alimento consumido na forma de macromoléculas e o transforma em moléculas simples capazes de serem absorvidas pelo organismo. Este sistema é dividido em três partes: anterior, médio e o posterior (Figura 6) (CHAPMAN, 1998).

Figura 6 - (A) Representação esquemática do sistema digestório da larva de inseto e (B) Representação esquemática do sistema digestório da larva de Lepidoptera. Adaptado de: (Chapman, 1998; Engel; Moran, 2013; Terra; Ferreira, 2005; Terra; Ferreira, 2012).

O intestino anterior inicia-se na boca e inclui a cavidade bucal (com as glândulas salivares), faringe, esôfago e o papo (Figura 6). O intestino médio, devido

a sua origem endodérmica e a ausência de um revestimento de cutícula, é o local principal de digestão e absorção dos nutrientes (TERRA; FERREIRA, 2012).

A maioria dos insetos apresenta no lúmen do intestino médio uma estrutura quitino-protéica denominada membrana peritrófica, a qual divide o lúmen em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico (local onde se encontra o alimento) e o espaço ectoperitrófico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio) (TERRA; FERREIRA, 2012).

Os túbulos de Malpighi, responsáveis pela excreção, estão localizados na região do esfíncter que separa o intestino médio do intestino posterior. A porção final do intestino é responsável pela absorção de água e íons. Em muitos insetos o intestino posterior apresenta-se como um tubo estreito e em outros pode ser modificado em câmaras de fermentação abrigando microrganismos que podem auxiliar na digestão de celulose (TERRA; FERREIRA, 2012).

O epitélio que reveste o intestino médio é formado por uma camada de células, sendo as células colunares as mais abundantes. Estas células estão diretamente envolvidas na absorção e secreção de água, na secreção de enzimas, absorção de nutrientes (CHAPMAN, 1998).

A necessidade de diferentes enzimas digestivas nos diferentes organismos incluindo os insetos está relacionada principalmente à complexa composição química das dietas ingeridas por eles (TERRA; FERREIRA, 2012) e os estudos dessas enzimas constituem uma importante base para a compreensão da fisiologia digestiva (ASADI et al., 2010).

Insetos fitófagos, como a *Lonomia obliqua*, podem apresentar diferentes carboidrases para realizar a digestão e aquisição dos nutrientes, pois as folhas das plantas apresentam altos teores de carboidratos, tais como amido, celulose, xilana, pectina, rafinose, sacarose entre outros (ANAND et al., 2010; POLLOCK et al., 1999).

1.5 Enzimas

A digestão de polímeros provenientes da alimentação nos intestinos dos insetos ocorre em três fases: primária, intermediária e final (TERRA; FERREIRA, 2012):

- a) Digestão primária: reduz os polímeros em oligômeros e ocorre no espaço endoperitrófico. Os exemplos de algumas enzimas são as amilases, pectinases, celulasas dentre outras;
- b) Digestão intermediária: os oligômeros resultantes da fase anterior são hidrolisados a dímeros no espaço ectoperitrófico;
- c) Digestão final: esses dímeros são transformados em monômeros por enzimas presentes nas membranas microvilares presentes na superfície das células do intestino médio.

As enzimas digestivas são, em geral, hidrolases (TERRA; FERREIRA, 2005). As glicosidases (EC 3.2.) pertencem ao grupo das hidrolases e são classificadas em famílias de acordo com as similaridades das sequências de aminoácidos e das estruturas terciárias dessas enzimas (LOMBARD et al., 2014).

1.1.1 Amilases

As α -amilases (EC 3.2.1.1) hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 do amido e do glicogênio. A amilose e a amilopectina formam a estrutura do amido. A amilose é um polímero linear composto de resíduos de glicoses unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e a amilopectina apresenta a mesma estrutura da cadeia principal do amido, porém há a presença de ramificações formadas por resíduos de glicoses unidos por ligações do tipo α -1,6 que partem da cadeia principal (SOUZA; MAGALHÃES, 2010; XU et al., 2014).

As α -amilases são extremamente importantes nos processos industriais e estão envolvidas principalmente na produção de alimentos, papel, detergente e indústrias têxtil e farmacêutica. Atualmente, essa enzima representa cerca de 30% de participação no mercado mundial de enzimas (RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

A α -amilase pode ser isolada de plantas, animais e microrganismos (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Dentre essas, as amilases microbianas, fúngicas e bacterianas, são as mais utilizadas pelas indústrias, pois são econômicas, estáveis e mais fáceis de manipular para se obter as características enzimáticas desejadas para o processamento do amido (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

Nos insetos, o tipo de alimento determina a síntese e a atividade de α -amilase. Nos insetos que se alimentam de lã, a concentração dessa enzima é baixa.

Por outro lado, em insetos fitófagos essa enzima é abundante e apresenta uma alta atividade (ZIBAEE et al., 2008).

A amilase foi caracterizada em diversas ordens de insetos que incluem: Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera e Hemiptera sendo essencial para o crescimento e a sobrevivência do inseto (VALENCIA-JIMENEZ et al., 2008; ZIBAEE et al., 2008).

As amilases dos insetos são ativadas na presença de íons como cálcio divalentes ou íons como cloreto, brometo e nitrato, porém essa enzima em Lepidoptera pode não ser ativada na presença do íon cloreto (TERRA; FERREIRA, 1994).

A única estrutura proteica cristalizada de α -amilase de inseto é da fase larval do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Essa enzima contém três domínios. O domínio A, central, é formado por $(\alpha/\beta)_8$ barril, apresenta resíduos de aminoácidos envolvidos com o sítio catalítico (Asp 185, Glu 222 e Asp 287) e a interação com os íons cloreto também ocorre nesse domínio. As ligações com o íon cálcio estão presentes no domínio B e são essenciais para manter a estrutura e a integridade dessa enzima. O domínio C contém a porção C-terminal da proteína e sua função não está bem elucidada. O aminoácido Glu 222 é o doador de prótons, o Asp 185 é o nucleófilo e o Asp 287 eleva o pKa do doador de prótons, embora não esteja envolvido na catálise (STROBL, STEFAN et al., 1998) (Figura 7).

Figura 7 - Domínios da estrutura tridimensional de α -amilase de *Tenebrio molitor*. O domínio A é representado pela cor azul, o B pela cor verde e o C pela cor vermelha. O íon cloreto e cálcio estão representados pela cor roxa e amarela, respectivamente. Os aminoácidos da tríade catalítica Asp 185, Glu 222 e Asp 287 são apresentados nas cores rosa. Fonte: (Strobl, Stefan et al., 1998).

As sequências gênicas completas de α -amilases de insetos foram registradas no GenBank, os quais incluem: Hymenoptera, Coleoptera, Diptera e Lepidoptera. Todas essas sequências apresentam a tríade catalítica e dependência do íon cálcio (TERRA; FERREIRA, 2012).

Os inibidores de amilases e plantas mais resistentes a predação são apontados como peça chave para o controle de pragas agrícolas, especialmente para Lepidoptera e Coleoptera (VALENCIA-JIMENEZ et al., 2008). Assim, há um número crescente de trabalhos que estudam o desenvolvimento mais eficaz de inibidores que atuem sobre α -amilases dos insetos e também na elucidação dos mecanismos responsáveis por essa inibição.

1.5.2 Pectinases

Os polissacarídeos pécticos, presentes nas paredes celulares dos vegetais, são formados por uma cadeia principal constituída por monômeros de ácido galacturônico ligados por ligações α -1,4. Nas ramificações são associados outros açúcares como: ácido galacturônico, ramnose, arabinose e a galactose (YAPO et al., 2007).

As pectinas são conhecidas por suas propriedades gelificante, estabilizante, espessante e, recentemente, utilizadas como substituintes de açúcar e gordura dos alimentos dietéticos. Essas características são amplamente utilizadas na indústria de cosméticos, alimentícias e farmacêuticas (BAEVA; PANCHEV, 2005; CHAN; CHOO, 2013; IGLESIAS; LOZANO, 2004; THAKUR et al., 1997). Entretanto o acúmulo de pectina nos reatores industriais promove turbidez do meio e incrustações nos equipamentos. Portanto, tornam-se um grande empecilho nesses processos (SANTOS, 2007).

A solução deste problema dentre outras aplicações são atribuídas às pectinases, que passaram a ser utilizadas principalmente nas indústrias de: alimentos, têxteis e de papel e celulose (BHAT, 2000). Atualmente, essas enzimas são amplamente utilizadas em diversos setores industriais como: extração de óleos vegetais, fermentação de chás e chocolates, tratamento de resíduos vegetais, clarificação, redução da viscosidade em sucos de frutas, amadurecimento artificial de frutas, extração da polpa do tomate, degomagem de fibras na indústria têxtil e de papel, nutrição animal e enriquecimento de proteínas nos alimentos infantis (UENOJO; PASTORE, 2007). As pectinases equivalem a 10% da produção total das enzimas na indústria (MUKESH et al., 2012).

As pectinases são sintetizadas por bactérias, fungos, plantas e insetos (IRSHAD et al., 2014; TERRA; FERREIRA, 1994). As pectinases (Poligalacturonases, EC 3.2.1.15) ocorrem em Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera e Trichoptera (KIRSCH et al., 2014; TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA; FERREIRA, 2005;). Essa enzima em besouros pode ter sido originada de bactérias endossimbiontes, porém o cDNA da pectinase de *Phaedon cochleariae* demonstrou que há maior similaridade com as endopoligalacturonases de fungos (TERRA; FERREIRA, 2005).

Por outro lado, há insetos que são incapazes de degradar pectina e a simbiose com microrganismos capazes de degradar este e outros polissacarídeos pode ocorrer, favorecendo assim a máxima absorção dos nutrientes das plantas. Um exemplo é o caso das formigas cortadoras de folhas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que não se alimentam das folhas que cortam, mas somente da seiva das plantas e com estes nutrientes líquidos também alimentam os fungos, *Leucoagirus gongylophorus*, presentes em seus ninhos. Esses fungos são capazes

de degradar celulose, amido, xilana e pectina. As pectinases sintetizadas pelos fungos auxiliam na hidrólise das paredes celulares das plantas e as altas concentrações de pectinase são utilizadas primeiramente pelos fungos para invadir e degradar outros tecidos das plantas e posteriormente pelas formigas que aproveitam a liberação dos nutrientes resultantes desta hidrólise (GOMES DE SIQUEIRA et al., 1998).

1.5.3 Celulases

A degradação da celulose em glicose é realizada pelo efeito sinérgico de diversas enzimas com especificidades diferentes. O sistema mais conhecido consiste em três classes de enzimas: celulases (EC 3.2.1.4) que são endoglicosidases responsáveis por iniciar a hidrólise e clivam as ligações internas das regiões da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos. As exoglucanases (EC 3.2.1.91) podem catalisar tanto quanto a hidrólise nos terminais da fibra celulósica e promovem a hidrólise dos oligossacarídeos em celobiose e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), descritas no item 1.5.5, que hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (OPPERT et al., 2010; TONELOTTO, 2012) (Tabela 1).

As enzimas celulolíticas são responsáveis pela degradação da biomassa vegetal, porém o uso desse complexo celulolítico precisa ser aprimorado para reduzir os custos na produção, por exemplo, de biocombustível (SUN; CHENG, 2002) bem como seu uso em outros processos (WYMAN, 2007). A descoberta de novas enzimas celulolíticas bem como o desenvolvimento de enzimas mais eficientes combinadas com estratégias de remodelagem da parede celular vegetal ainda se faz necessário (HOTTA et al., 2010).

Várias celulases de insetos foram purificadas e caracterizadas. Vinte e sete espécies distribuídas em seis ordens de insetos apresentam genes que expressam celulases (MARTIN, 1983; OPPERT et al., 2010; TERRA; FERREIRA, 1994; WATANABE; TOKUDA, 2010). O sistema de celulase de larvas de *Ergates faber* (Coleoptera) é formado por três enzimas. Uma exoglucanase com 25 kDa e pH ótimo 4,5 e as outras duas enzimas com 57 kDa e pH ótimo 5,2 e 70 kDa e pH ótimo 5,2, que são ativas sobre celobiose, carboximetilcelulose e celulose cristalina

(CHARARAS et al., 1983). No intestino médio de *Periplaneta americana* foram isoladas a endoglucanase e a β -glucosidase (GENTA; TERRA; FERREIRA, 2003).

O cDNA do besouro *Phaedon cochleariae* apresentou uma sequência de celulase e essa sequência foi clonada e pertence a família GH-45 (glicosídeo hidrolase). Enzimas similares ocorrem no intestino médio de *Psacotha hilaris* e *Apriona germari*, entretanto a celulase do grilo *Teleogryllus emma* e dos cupins *Reticulitermes speratus*, *Nasutitermes takasagoensis* e *Panesthia cribrata* pertencem a família GH-9. Essa família também apresenta as celulases das bactérias *Thermomonospora fusca* (TERRA; FERREIRA, 2012).

Há controversas sobre o papel dos simbiossitos de insetos que digerem celulose, pois os insetos parecem ser dependentes dos simbiossitos para a digestão da celulose (GENTA et al., 2006). Porém existem evidências de que os insetos secretam enzimas capazes de hidrolisar a celulose cristalina (SLAYTOR, 1992; WATANABE; TOKUDA, 2010).

Apesar do interesse das celulases e pectinases de insetos, até o momento não houve a determinação da estrutura cristalográfica dessas enzimas nesses seres vivos.

1.5.4 α -glucosidases

As α -glucosidases (EC 3.2.1.20) catalisam preferencialmente a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 das extremidades não redutoras de oligo ou polissacarídeos (Tabela 1) (BORGES DE MELO; GOMES; CARVALHO, 2006). As α -glucosidases podem ser denominadas como maltase e sacarase. O termo sacarase deve ser evitado, pois a sacarose pode ser hidrolisada por outras enzimas (Tabela 1). A invertase é outra denominação das α -glucosidases, entretanto esse termo refere-se as β -fructosidases de fungos (TERRA; FERREIRA, 1994).

A principal função das α -glucosidases é hidrolisar oligo ou polissacarídeos em monossacarídeos e esses são absorvidos e utilizados como fontes de energia. Essa enzima é, em geral, encontrada no glicocálix, no lúmen intestinal e nas secreções salivares dos insetos (ZIBAE; BANDANI; RAMZI, 2009).

As α -glucosidases pertencentes a família GH-13 foram encontradas em diversos Lepidoptera como, por exemplo: *Chilo suppressalis* (Pyralidae), *Erinnyis ello*, *Thaumetopoea pityocampa* (Notodontidae) e *Parnassius apollo* (Papilionidae)

(NAKONIECZNY; MICHALCZK; KEDZIORSKI, 2006; PRATVIEL-SOSA et al., 1986; SANTOS; TERRA, 1986b; ZIBAEE; BANDANI; RAMZI, 2009). Diversos dados de outras espécies desta ordem de insetos são essenciais para a compreensão das propriedades desta enzima.

1.5.5 β -glucosidases

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 de resíduos de monossacarídeos do terminal não redutor dos glicosídeos (Tabela 1). Essas enzimas podem receber diferentes denominações dependendo do monossacarídeo que é removido. Por exemplo: β -glucosidase remove o monossacarídeo glicose, a β -galactosidase remove o monossacarídeo galactose, a β -xilosidase remove o monossacarídeo xilose e assim por diante. Frequentemente, a mesma β -glucosidase é capaz de hidrolisar diversos resíduos de monossacarídeos diferentes, sendo nomeada de acordo como o substrato que ela hidrolisa com maior eficiência (TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA; FERREIRA, 2005).

As β -glucosidases dos insetos são principalmente encontradas no intestino, na qual atuam como enzimas digestivas (TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA; FERREIRA, 2005). Alguns insetos apresentam três ou quatro isoformas de β -glucosidases que auxiliam na digestão com diferentes especificidades pelos substratos. Em outros, apenas duas destas enzimas são encontradas, as quais são capazes de hidrolisar diferentes β -glicosídeos (AZEVEDO; TERRA; FERREIRA, 2003; FERREIRA; TORRES; TERRA, 1998).

Em insetos, essas enzimas são divididas em duas classes baseado na eficiência catalítica dos diferentes substratos: a classe A são enzimas que hidrolisam os substratos que contém aglicones hidrofílicos, tais como a hidrólise das ligações β -1,3, β -1,4 e β -1,6 dos dissacarídeos e oligossacarídeos e a classe B incluem as enzimas que hidrolisam somente substratos com aglicones hidrofóbicos, como: 4-nitrofenil-glicosídeo, o metilumbeliferil-glicosídeo e os glicosídeos das plantas (AZEVEDO; TERRA; FERREIRA, 2003; FERREIRA et al., 2001; MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000; PANKOKE; BOWERS; DOBLER, 2010).

A determinação da sequência protéica de β -glucosidase das glândulas salivares de *Neotermes koshunensis* e *Bombxy mori*, do intestino de *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*, *Neotermes koshunensis*, *Reticulitermes flavipes*

revelou que essa enzima nesses insetos pertence a família GH-1 (TERRA; FERREIRA, 2012).

Diversos trabalhos tentam elucidar a bioquímica e a estrutura cristalográfica das β -glucosidases dos insetos, incluindo as enzimas de Lepidoptera e Hymenoptera (JENG et al., 2011; MARANA et al., 2004;), pois essa enzima é considerada um alvo importante para controle de pragas agrícolas. A estrutura cristalográfica de β -glucosidase de *Spodoptera frugiperda* apresenta domínios proteicos formados por $(\alpha/\beta)_8$ barril, o Glu 399 como nucleófilo e o Glu 187 como doador de prótons no seu sítio catalítico. Além disso, o aminoácido Glu 451 é considerado peça chave, pois determina se a enzima terá preferência por glicosídeos ou galactosídeos (MARANA et al., 2004) (Figura 8).

Figura 8 - Um dos domínios da estrutura tridimensional de β -glucosidase de *Spodoptera frugiperda* (PDB: 5CGO). Os aminoácidos Glu 399, Glu 187 e Glu 451 são representados pelas cores: rosa, amarela e azul, respectivamente.

Nos insetos, as β -glucosidases desempenham um importante papel digestivo, pois hidrolisam os oligossacarídeos das celulosas e hemicelulosas da parede vegetal e, assim, o produto final (glicose) pode ser absorvido pela hemolinfa.

Além disso, as diferentes β -glucosidases são alvos de estudo para melhor compreender a interação da planta com o inseto, pois essas enzimas podem hidrolisar aglicones tóxicos presentes nas folhas das plantas, que podem prejudicar o desenvolvimento dos insetos. Entretanto, muitas lagartas tem rotas alternativas para evitar essa intoxicação ou até mesmo utilizar esses glicosídeos como uma estratégia de defesa (TERRA; FERREIRA, 2005).

1.5.6 α -galactosidases

A α -galactosidase (EC 3.2.1.22) hidrolisa a ligação α -1,6 que une os resíduos de galactose ao de glicose da rafinose, α -galactosídeos, galactolipídeos e outros carboidratos (Tabela 1) e podem participar da digestão final das hemiceluloses.

As α -galactosidases dos insetos são solúveis e independente do pH do lúmen intestinal, seus pHs ótimos são ácidos. Essas enzimas são encontradas associadas ao glicocálix das células intestinais (SANTOS; TERRA, 1986a).

As α -galactosidases foram isoladas e caracterizadas nos seguintes insetos: *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera), *Abracris flavolineata* (Orthoptera), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera), *Rhagium inquisitor* (Coleoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Psacotha hilaris* (Coleoptera) e *Erinnyis ello* (Lepidoptera) (SANTOS; TERRA, 1986a; TERRA; FERREIRA, 1994). E no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* apresentou três α -galactosidases com similares valores de: pH ótimos (5,8), pI (7,2) e massas moleculares (46-52 kDa) (GROSSMANN; TERRA, 2001).

1.5.7 β -fructosidases

As β -fructosidases (EC 3.2.1.26) hidrolisam a sacarose em frutose e glicose (Tabela 1), porém diferencia-se das α -glucosidases (EC 3.2.1.20) pela capacidade de hidrolisar substratos com β -frutossil, enquanto as α -glucosidases são específicos para os substratos que apresentam a porção α -glucossil (TERRA; FERREIRA, 1994). Portanto, as β -fructosidases são caracterizadas por hidrolisar a sacarose e a rafinose, mas não conseguem hidrolisar maltose e a melibiose.

As β -fructosidases tem sido amplamente descritas em microrganismos e eram desconhecidas nos insetos, pois acreditava-se que no intestino médio dos insetos as α -glucosidases eram responsáveis pela hidrólise da sacarose. Entretanto, as β -fructosidases foram descritas em larvas e adultos da mariposa *Erinnyis ello* e seu

papel fisiológico é hidrolisar a sacarose tanto da folha como do néctar, respectivamente. Posteriormente, essa enzima também foi detectada em *Diatraea saccharalis* e *Bombxy mori* (CARNEIRO et al., 2004; SANTOS; TERRA, 1986b; SUMIDA; YUAN; MATSUBARA, 1994;).

O primeiro registro da ocorrência de β -fructosidase em um transcriptoma foi em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera). Outras Lepidoptera apresentam a β -fructosidase, pois a biblioteca de cDNA apontou a sequência gênica de β -fructosidase no intestino médio da lagarta *Helicoverpa armigera*, bem como da lagarta *Bombxy mori*, a qual foi caracterizada no intestino médio e nas glândulas salivares (DAIMON et al., 2008; PAUCHET et al., 2008). Posteriormente, a β -fructosidase foi encontrada no transcriptoma da lagarta *Manduca sexta* (PAUCHET et al., 2010). Esses dados refletem que as β -fructosidases, ao contrário do que se pensava, são comuns em diferentes espécies de Lepidoptera.

A ocorrência de β -fructosidase de *Bombxy mori* pode estar relacionada como uma adaptação à dieta, pois essas lagartas se alimentam de folhas de amoreiras. Essas folhas contêm alcaloides que atuam como inibidores das α -glucosidases e não atuam como inibidores nas β -fructosidase (DAIMON et al., 2008). Portanto, a β -fructosidase pode auxiliar o bicho da seda a burlar o sistema de defesa das folhas da amoreira.

1.5.8 α -fucosidases

As α -fucosidases (EC 3.2.1.51) hidrolisam as ligações α -1,2, α -1,3, α -1,4 e α -1,6 para remoção de resíduos de fucose, principalmente nas extremidades não redutoras das cadeias de glicoconjugados (Tabela 1) (PERRELLA et al., 2015).

As primeiras fucosidases estudadas foram as fucosidases humanas pelo fato da ausência de atividade desta enzima acarretar em uma doença: a fucosidose (LIU, S. W. et al., 2009; LIU, T. W. et al., 2009). Essa doença é autossômica recessiva e resulta em severas alterações neurológicas, retardo no crescimento e em alguns casos mais graves à morte (SULZENBACHER et al., 2004; WILLEMS et al., 1999). Mais recentemente a alteração da α -fucosidase humana tem sido relacionada a outras patologias como: inflamação, câncer e fibrose cística (ALI et al., 2008; LISTINSKY; SIEGAL; LISTINSKY, 2011; SCANLIN; GLICK, 1999; WU et al., 2010). O conhecimento mais detalhado desta enzima é importante para inovações de

produtos biotecnológicos, como kits de diagnósticos na detecção de diversos quadros patológicos. Entretanto, para que estes potenciais sejam alcançados, há a necessidade de explorarmos diferentes papéis fisiológicos e funcionais de forma mais detalhada desta enzima.

Outras α -fucosidases solúveis foram identificadas como enzimas digestivas de alguns invertebrados como: moluscos, ácaros e carrapatos, porém essa enzima foi estudada em poucos insetos (BERTEAU et al., 2002; BOWMAN, 1987; ENDO et al., 1993; MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015; REGLERO; CABEZAS, 1976).

A função digestiva é atribuída às α -fucosidases intestinais nos moluscos (BERTEAU et al., 2002; ENDO et al., 1993; REGLERO; CABEZAS, 1976). Lopes e colaboradores caracterizaram esta enzima no sistema digestivo de diferentes artrópodes, mas seu papel fisiológico e a especificidade das fucosidases ainda são desconhecidos. Entretanto, para os artrópodes tem sido proposto que estas fucosidases digestivas podem remover os resíduos de fucose do alimento ingerido e os utilizem como fonte de carbono e energia, além de exercerem um papel de defesa, pois estão possivelmente relacionadas na remoção de resíduos de fucose envolvidos na interação de microrganismos patogênicos como *Anaplasma marginali* com o epitélio intestinal (MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015).

1.6 Carboidrases e seus substratos

A Tabela 1 ilustra as enzimas abordadas nesse estudo. Também é possível observar que diferentes enzimas hidrolisam substratos semelhantes como, por exemplo, no caso da sacarose que é hidrolisada pela α -glucosidase e pela β -fructosidase ou a rafinose que é hidrolisada pela β -fructosidase e pela α -galactosidase.

Tabela 1 - Substratos hidrolisados pelas carboidrases presentes nesse trabalho (Bujacz et al., 2011; Evans; Payne, 1964; Martin, 1983; Morgan, 1975; Noda; Watanabe; Scrivener, 1997; Sumida; Yuan; Matsubara, 1994).

EC 3.2.1-	Enzima	Substrato
20	α -glucosidase	Maltose Sacarose Melezitose Estaquiase 4-nitrofenil- α -glucopiranosídeo 4-metilumbeliferil- α -L-glucopiranosídeo 4-metilumbeliferil- α -L-fucopiranosídeo
21	β -glucosidase	Celobiose Gentiobiose 4-nitrofenil- β -glucopiranosídeo 4-metilumbeliferil- α -L-glucopiranosídeo
22	α -galactosidase	Melibiose Rafinose Estaquiase 4-nitrofenil- α -galactopiranosídeo 4-metilumbeliferil- α -L-fucopiranosídeo 4-metilumbeliferil- α -L-galactopiranosídeo
26	β -fructosidase	Sacarose Rafinose Estaquiase Kestose Nistose Inulina
51	α -fucosidase	4-metilumbeliferil- α -L-fucopiranosídeo
15	pectinase	Pectina
4	celulase	Carboximetilcelulose
1	amilase	Amido

Portanto, esse estudo concentrou-se nas carboidrases da Tabela 1 do sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Inicialmente, nosso grupo de pesquisa observou a presença de uma enzima na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, que era responsável pela hidrólise da sacarose presente no meio de cultura celular (MARANGA et al., 2003). Desta forma, esse trabalho propõe investigar, identificar, caracterizar as carboidrases presentes na hemolinfa e no intestino da fase larval (6º instar) de *Lonomia obliqua* e então, compará-las. Além disso, avaliar o efeito das diferentes dietas nas atividades destas enzimas tanto no sistema digestório, quanto no sistema circulatório. Essa caracterização também permitirá o teste da hipótese inicial que correlaciona quais carboidrases presentes na hemolinfa desta lagarta são responsáveis pela hidrólise da sacarose do meio de cultura celular.

2.2 Objetivos específicos

Alimentar, separadamente, com folhas de: *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* as larvas de *Lonomia obliqua* do 2º ao 6º instar;

Medir o pH da hemolinfa e do conteúdo intestinal das lagartas do 6º instar da espécie *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas;

Verificar se as diferentes dietas influenciam nas atividades enzimáticas das carboidrases do sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*

Avaliar a presença de algumas carboidrases na hemolinfa e no intestino médio do 6º instar de *Lonomia obliqua*;

Avaliar se as diferentes dietas podem interferir na atividade e no pH ótimo das enzimas em estudo nesses dois sistemas da lagarta;

Isolar as atividades responsáveis pela hidrólise da sacarose e também uma enzima pouco caracterizada em Lepidoptera através de estratégias de purificação das proteínas;

Caracterizar as enzimas isoladas quanto a sua especificidade, eficiência catalítica e efeito de inibidores específicos sobre suas atividades;

Comparar as sequências de mRNA obtidas a partir de análises do transcriptoma com a sequência peptídicas obtidas por espectrometria de massas das enzimas enriquecidas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta, manutenção e dissecções das lagartas

3.1.1 *Lonomia obliqua*

As lagartas da espécie *Lonomia obliqua* utilizadas nesse trabalho foram coletadas nos municípios do extremo Oeste do Paraná, Norte do Rio Grande do Sul e Sudoeste de São Paulo no período de janeiro de 2014 a maio de 2016.

Os animais foram capturados manualmente com auxílio de pinças deslocando as lagartas dos troncos das árvores e posteriormente foram acondicionadas em caixas de madeiras. O material foi enviado ao Instituto Butantan por via aérea, em caixas padronizadas de madeira, medindo 40 cm x 30 cm x 20 cm, a tampa apresentava orifícios para aeração. As lagartas foram separadas por instar e acomodadas em caixas plásticas (120 cm x 60 cm x 60 cm) que apresentavam telas nas laterais.

Os instares mais abundantes foram o 5º e o 6º instar, devido os acidentes com as lagartas, *Lonomia obliqua*, ocorrerem principalmente no último instar do estágio larval e por estarem próximo à fase de pupa, portanto próximos do solo.

A alimentação da *Lonomia obliqua* constitui-se de folhas. Foram fornecidas quatro espécie de folhas sendo essas: ameixeira amarela (*Eriobotrya japonica*), goiabeira (*Psidium guajava*), mangueira (*Mangifera indica*) e tapiá (*Alchornea* ssp). Essas espécies de plantas são encontradas em abundância no Instituto Butantan. As folhas eram lavadas em água corrente antes de serem fornecidas às lagartas. As condições de temperatura (20 °C), umidade (60%) e fotoperíodo de 12 h. Aproximadamente 200 lagartas de 2º instar eram mantidas sob as mesmas dietas até chegarem à fase de 6º instar.

Quando o 6º instar larval era atingido, os animais foram imobilizados em gelo e a retirada das cerdas foi utilizada na produção do soro antilonômico produzido no Instituto Butantan. Para a obtenção da hemolinfa foram realizados cortes dos pseudo-pés da lagarta e a hemolinfa foi então obtida pelo extravasamento, tomando-se cuidado de não misturar a hemolinfa com qualquer outro material da lagarta. Posteriormente à coleta a hemolinfa foi centrifugada a 1000 g por 10 min. Esse material é estocado à -20 °C. Após este procedimento, estas lagartas também foram

utilizadas para extração do intestino e do conteúdo intestinal. As lagartas foram dissecadas com auxílio de tesoura oftalmológica e pinças de modo a isolar o sistema digestório em solução salina 1,15% de cloreto de potássio. Após o isolamento do sistema digestório o intestino médio foi isolado. A separação do epitélio do intestino médio (MES) e da membrana peritrófica e do conteúdo intestinal foi então realizada com auxílio de pinças. O epitélio foi lavado em salina logo após a dissecação. Os materiais biológicos isolados foram mantidos à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

3.2 Preparo das amostras

A hemolinfa foi centrifugada a 1000 g por 10 min e fração solúvel foi utilizada como fonte de enzima.

Os MES e MP citados anteriormente foram homogeneizados separadamente em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem em água ultrafiltrada (Millipore). Em seguida, tanto os MP como MES foram centrifugados por 30 min à 16000 g à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As frações solúveis (MP e MES, respectivamente) foram utilizadas como fontes de enzimas. Os solutos do MES1 foram reomogeneizados em água ultrapura, congelados e descongelados 3 vezes e mais uma vez centrifugados, sendo que uma delas teve duração de 24 h. As frações solúveis foram denominadas MES2 e os solutos foram ressuspensos e denominados MES3. Ambas as amostras foram usadas como fontes de enzimas.

Os resultados dos ensaios enzimáticos da hemolinfa e das amostras intestinais ocorreram em triplicata de diferentes preparações com 5 animais cada.

3.3 Ensaio enzimático para detecção das hidrolases em estudo e estimativa da quantidade de proteína

A detecção da atividade nas diferentes amostras em estudo foi realizada para todos os ensaios incubando-se misturas de substrato e enzima em banho-maria termostatizado ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) por diferentes períodos de tempo. Os controles das reações foram denominados como: controle do substrato (contendo tampão e substrato) e controle da enzima (contendo tampão e enzima) sendo incubados do mesmo modo que os grupos experimentais. Os substratos utilizados bem como as condições de ensaio estão listados na Tabela 2.

A atividade sobre substrato contendo 4-metilumbeliferona foi determinada pela medida da liberação de 4-metilumbeliferona (BAKER; WOO, 1992) em espectrofluorímetro Gemini XPS (Molecular Devices) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 nm e 460 nm, respectivamente. A reação enzimática foi interrompida pela adição de tampão Glicina-NH₄OH 0,8 M pH 10,5.

Os ensaios com NPAGAL, NPB GAL, NPAGLU, NPBGLU foram realizados à 30°C por diferentes períodos de tempo. A reação foi interrompida pela adição de tampão carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e SDS 10% e a atividade detectada em espectrofotômetro com comprimentos de onda de 420 nm.

Os ensaios com CMC, AMI, PEC, RAF, SAC foram realizados à 30 °C por diferentes períodos de tempo. A reação foi interrompida com fervura por 5 min e posteriormente pela adição de DNS e água (MILLER, 1959) e a atividade detectada com espectrofotômetro com comprimentos de onda de 550 nm.

A estimativa da quantidade de proteína das amostras foi realizada pelos métodos de Smith et al., (1985) utilizando ovoalbumina como padrão.

Tabela 2 - Substratos utilizados e condições de ensaio de detecção de hidrolases.

Enzima	Substrato	Tampão	Referência
α -L-fucosidase	4-MU- α -L-fucopiranosídeo	Citrato-fosfato 0,05 M	(PERRELLA et al., 2015)
	4-UM- α -L-glucopiranosídeo	Fosfato de sódio 0,2 M	(PERRELLA et al., 2015)
α -glucosidase	4-NP- α -D-glucopiranosídeo	Fosfato de sódio 0,2 M	(PADRO et al., 2010)
	Sacarose	Fosfato de sódio 0,2 M	(PEDEZZI et al., 2014)
β -glucosidase	4-NP- β -D-glucopiranosídeo	Fosfato de sódio 0,2 M	(PONTOH; LOW, 2002)
α -galactosidase	4-NP- α -D-galactopiranosídeo	Fosfato de sódio 0,2 M	(SANTOS; TERRA, 1986b)
β -galactosidase	2-NP- β -D-galactopiranosídeo	Fosfato de sódio 0,2 M	(PEDEZZI et al., 2014)
	Rafinose	Fosfato de sódio 0,2 M	(PEDEZZI et al., 2014)
β -fructofuranosidase	Sacarose	Fosfato de sódio 0,2 M	(PEDEZZI et al., 2014)
	Carboximetilcelulose	Fosfato de sódio 0,2 M	(BRAGATTO et al., 2010)
Celulase	Amido	Glicina-NaOH 0,2 M	(ABRAHAM; NAGARAJU; DALTA, 1992)
Amilase	Pectina	Fosfato de sódio 0,2 M	(BRAGATTO et al., 2010)
Pectinase			

3.4 Efeito do pH sobre as atividades das carboidrases

O efeito do pH sobre a atividade da foi avaliado utilizando 4 tipos diferentes de tampão (Glicina-HCl, citrato-fosfato, fosfato de sódio e Glicina-NaOH) em uma faixa de pH de 2,0 a 12,0. Os substratos: NPAGLU, MUFUC, NPBGLU, AMI, PEC, RAF, SAC foram preparado nestes diferentes tampões e os ensaios das atividades enzimáticas foram realizados como descrito no item 3.3.

3.5 Preparação enzimática das folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

As folhas de ameixeira amarela (*Eriobotrya japonica*), goiabeira (*Psidium guajava*), mangueira (*Mangifera indica*) e tapiá (*Alchornea* ssp) foram submetidas para processo de extração enzimática. As folhas foram limpas com água corrente e logo após trituradas com nitrogênio líquido e maceradas até obter uma farinha. As farinhas foliares foram homogeneizadas em refrigeração durante 3 h. Posteriormente, esses extratos foram centrifugados em 10000 g por 30 min e os sobrenadantes foram utilizados para dosagem enzimática conforme a metodologia do item 3.3.

3.6 Determinação dos carboidratos solúveis nas folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

A determinação dos carboidratos solúveis das folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* foram realizadas em colaboração com o laboratório Lafieco (Laboratório de fisiologia ecológica de plantas) do departamento de Botânica sob coordenação do professor Dr. Marcos Buckeridge.

As folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* foram coletadas às 10 h e 18 h para a extração dos açúcares solúveis das folhas. As coletas constaram de três repetições de cada espécie de folha e 10 mg de cada amostra foi homogenizada com etanol 80% em banho-seco por 20 min à 80 °C sob constante agitação e repetida 8 vezes e verificou-se na 8ª repetição que não havia mais açúcares solúveis no sobrenadante (DUBOIS et al., 1956). Após cada extração, a mistura foi centrifugada por 10 min a 3220 g e o sobrenadante foi retirado. O precipitado foi seco na estufa à 40 °C por 24 h.

3.7 Quantificação dos açúcares solúveis totais das folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

Os sobrenadantes das amostras do item 3.6 foram secos e logo após, ressuspendidos em 1 mL de água ultrapura. Para retirar a clorofila e outros pigmentos lipossolúveis adicionou-se 500 µL de clorofórmio seguido de agitação constante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 g e a fase superior foi transferida para novos microtubos e novamente centrifugados.

Após esse processo, uma alíquota de 500 µL foi utilizada para a separação e quantificação dos açúcares (glicose, frutose, sacarose e rafinose) por cromatografia de troca iônica de alta eficiência e detecção por pulso amperométrico (HPLC/PAD) em sistema Dionex-D 500 (Thermo Scientific). A coluna utilizada foi a Carbpac PA1 e para a eluição dos açúcares foi utilizado 200 mM de NaOH. A curva padrão utilizou-se os açúcares glicose, frutose, sacarose e rafinose nas concentrações 50, 100 e 200 µM.

3.8 Extração e dosagem de amido das folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

Para extração dos amidos das folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* foram utilizadas duas enzimas comerciais: α-amilase de *Bacillus licheniformis* (Megazymes) e aminoglucosidase de *Aspergillus niger* (Megazymes). A reação enzimática foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido perclórico 0,8 M. As amostras foram centrifugadas a 9300 g por 5 min. Posteriormente, alíquotas dessas amostras foram incubadas com o reagente glicose PAP Liquiform (Centerlab, Brasil) à 30 °C por 15 min. A glicose foi detectada com espectrofotômetro com comprimentos de onda de 490 nm. A curva padrão utilizou 1 mg/mL de glicose (AMARAL et al., 2007).

3.9 Estimativa da massa molecular

Amostras da porção solúvel dos intestinos (MES1) e da hemolinfa em estudo foram aplicadas individualmente em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia, Suécia) equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M contendo NaCl 0,5 M pH 5,0 e num fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 0,5 mL foram coletadas. As frações foram ensaiadas com os substratos: MUFUC, NPAGLU, NPAGLU, RAF e SAC conforme o item 3.3. Os seguintes padrões de massa molecular foram utilizados para estabelecimento de uma curva de calibração para esta cromatografia: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

3.10 Separação cromatográfica e purificação

A Figura 9 demonstra as etapas de purificação das carboidrases da hemolinfa e do intestino (MES1).

Figura 9 - Sequências das etapas cromatográficas utilizadas na purificação das carboidrases da hemolinfa e do intestino (MES1) para enriquecimento da α -L-fucosidase e β -fructosidase.

3.10.1 Passo I – Troca Aniônica em HiTrap Q FF

O solúvel da hemolinfa e do intestino (MES1) seguiram as mesmas etapas de purificação. Separadamente, essas amostras foram aplicadas na coluna de troca aniônica HiTrap Q FF (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) previamente equilibrada com 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A resina foi lavada com 3 volumes do mesmo tampão utilizada para equilibrá-la. As α -fucosidases e as β -fructosidases foram eluídas com 5 mL e 14 mL de um gradiente salino de graus crescente de 20 mM de Tris-HCl contendo 1 M de NaCl, respectivamente. O fluxo foi de 1,0 mL/min e 28 frações de 1,0 mL foram coletadas. As medidas da atividade enzimática foram feitas como descrito no item 3.3.

3.10.2 Passo II – Interação Hidrofóbica em Hitrap Fenil FF

As frações enzimáticas ativas de α -fucosidase e β -fructosidase nos específicos substratos da etapa anterior foram reunidas e aplicadas na coluna de interação hidrofóbica HiTrap Fenil FF (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) previamente equilibrada com 5 mL de tampão Fosfato de Sódio 0,05 M pH 7,0 e 2,5 M de NaCl dissolvido no mesmo tampão. A resina foi lavada com 3 volumes do mesmo tampão utilizada para equilibrá-la. Essas enzimas foram eluídas com 15 mL e 19 mL, respectivamente de um gradiente salino de graus decrescente do mesmo tampão descrito acima. O fluxo foi de 1,0 mL/min e 28 frações de 1,0 mL foram coletadas. As medidas da atividade enzimática foram feitas como descrito no item 3.3.

3.11 Determinação da concentração do substrato sobre a atividade de α -fucosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*

Com o objetivo de determinar o K_m das α -L-fucosidases da hemolinfa e do intestino médio de *Lonomia obliqua* em estudo realizaram-se ensaios utilizando diferentes concentrações do substrato MUFUC, sendo as concentrações finais: 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100; 125; 150; 200; 250; 300 μ M e 4; 6,5; 8; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 80; 100; 200; 300; 400 μ M, respectivamente. Os ensaios de atividade foram realizados como descrito no item 3.3. Os dados obtidos foram tratados no programa Enzfitter (Biosoft).

3.12 Determinação da concentração do substrato sobre a atividade de β -fructosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*

Com o objetivo de determinar o K_m das β -fructosidases em estudo realizaram-se ensaios utilizando diferentes concentrações do substrato RAF e SAC, sendo as concentrações finais: 3; 5; 7,5; 10; 20; 25; 30; 50; 65; 80; 100; 120; 150; 200 mM e 0,3; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30; 50; 60; 80 mM, respectivamente. Os ensaios de atividade foram realizados como descrito no item 3.3. Os dados obtidos foram tratados no programa Enzfitter (Biosoft).

3.13 Efeito de fucose e fuconojirimicina sobre a atividade α -fucosidase da hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*

O efeito da presença de fucose e fuconojirimicina sobre a atividade da α -fucosidase também foi verificado. Para isso, ensaios de atividade na presença das α -fucosidases da hemolinfa e do intestino de diferentes concentrações do substrato MUFUC (6,10, 20, 30, 40, 60, 80, 150, 200, 300 μ M e 10, 25, 30, 50, 200, 300 μ M) e com diferentes concentrações de fucose (0, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 μ M e 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 μ M) e fuconojirimicina (0,05; 0,02; 0,045; 0,09; 0,18; 0,3 μ M e 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,1 μ M) foram realizados, respectivamente. Os ensaios de atividade foram realizados como descrito no item 3.3. Os dados obtidos foram tratados no programa Enzfitter (Biosoft).

3.14 Efeito do Tris, frutose e glicose sobre as atividades de β -fructosidase de hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*

O efeito da presença de Tris, da frutose e da glicose sobre a atividade das β -fructosidases também foi verificado. Para isso, ensaios de atividade da β -fructosidase da hemolinfa na presença de diferentes concentrações do substrato RAF (2; 5; 10; 20; 40; 80 mM) e SAC (2; 4; 8; 40; 80 mM) e com diferentes concentrações de Tris: 2,5; 5; 7,5; 10; 15 mM e 2,5; 5; 7,5; 11 mM, frutose: 2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 50; 80 mM e 2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 50; 80 mM e glicose: 0,4; 2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 60; 80 mM e 2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 50; 80 mM respectivamente e da MES1 na presença de diferentes concentrações de substrato RAF (2,5; 5; 10; 20; 40; 80 mM) e SAC (1; 2; 4; 10; 20; 40 mM) e com diferentes concentrações de Tris (10; 20; 30; 35; 40 mM), frutose (2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 50; 80 mM) e glicose (2; 4; 8; 10; 15; 18; 22; 30; 50; 80 mM) foram realizados. Os ensaios de atividade foram realizados como descrito no item 3.3.

Os dados obtidos foram tratados para cálculo das velocidades, K_m e K_i no programa Enzfitter (Biosoft).

3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. A amostra foi misturada a um tampão contendo 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,5% SDS, 0,36 mM β -mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol e 0,005% (w/v) azul de bromofenol e

então fervida por 5 min. Como padrão utilizado foi a mistura pré-corada *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). A amostra correu em voltagem constante de 200 V e o gel corado com nitrato de prata para a visualização das bandas de proteína (LAEMMLI, 1970).

3.16 Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10%. As amostras da hemolinfa e MES1 e MP do intestino foram diluídas em um tampão de corrida (Glicina e Tris) e correu em voltagem constante de 100 V por 2 h em câmara fria em tampão de corrida nativo sem a presença de SDS. Posteriormente para verificar a presença das enzimas amilases, α -fucosidases, α -glucosidases, β -glucosidases, β -fructosidases e pectinases o gel foi transferido para as metodologias descritas a seguir.

3.16.1 Gel nativo de α -fucosidase

O gel foi lavado com tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 5,5 por 3 vezes durante 20 min cada lavagem e incubado com um papel filtro embebido com o substrato MUFUC 600 μ M a temperatura ambiente por 5 min. As bandas da atividade enzimática produzida pela liberação de 4-metilumbeliferona foram visualizadas em transiluminador de luz UV.

3.16.2 Gel nativo de α -glucosidase e β -glucosidase

O gel foi lavado com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 por 3 vezes durante 20 min cada lavagem. O gel foi incubado com um papel filtro embebido com o substrato MUAGLU (600 μ M) e MUBGLU (600 μ M) a temperatura ambiente por 5 min. As bandas da atividade enzimática produzida pela liberação de 4-metilumbeliferona foram visualizadas em transiluminador de luz UV.

3.16.3 Gel nativo de β -fructosidase

O gel foi lavado com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 por 3 vezes durante 20 min cada lavagem e logo em seguida incubado em uma solução de

tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 e 2,5 M de RAF por 30 min à 30 °C. Para a revelação das bandas utilizou-se uma solução fervente de 1 M de NaOH e 2,3,5-Trifeniltetrazolio-cloreto sendo visualizadas pela liberação de formazam.

3.16.4 Gel nativo de amilase

O gel foi inserido em uma solução contendo 0,5% de amido dissolvido em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 à 37 °C por 30 min. Para a revelação das bandas utilizou-se uma solução fervente de 1 M de NaOH e 2,3,5-Trifeniltetrazolio-cloreto sendo visualizadas pela liberação de formazam.

3.16.5 Gel nativo de pectinase

O gel foi inserido em uma solução à 40 °C contendo tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, 1,5% de ágar e 0,5% de ácido poligalacturônico e posteriormente incubado a 30 °C por 3 h. Para a revelação das bandas removeu-se a camada de ágar do gel e o incubou em uma solução de 1% brometo de cetiltrimetilamônio sendo visualizadas pela precipitação do ácido poligalacturônico.

3.17 Extração de RNA total

Amostras da carcaça (cerdas, exoesqueleto e corpo gorduroso) (C), hemolinfa (H), intestino médio total (IT), anterior do intestino médio (IA), posterior do intestino médio (IP) e túbulos de Malpighi (TM) de *Lonomia obliqua* foram homogeneizadas em homogeneizadores do tipo Potter-Elvehjem com 1,0 mL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). Posteriormente, a mistura permaneceu por 5 min a temperatura ambiente para permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Logo após, a amostra foi então centrifugada a 11000 g por 10 min à 4 °C e 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados ao sobrenadante coletado após a centrifugação. A mistura sobrenadante/clorofórmio foi agitada por inversão e deixada na bancada a temperatura ambiente por 3 min. A amostra foi novamente submetida a centrifugação a 11000 g por 15 min a 4 °C para a separação de duas fases: uma inferior (orgânica) e outra superior e incolor (aquosa), essa última onde se encontra o RNA total. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 0,25 mL de isopropanol e

0,25 mL da solução de precipitação (1,2 M NaCl e 0,8 M de citrato trissódico dissolvidos em água DEPC. Este material foi deixado a temperatura ambiente por 10 min e, em seguida, centrifugado a 11000 g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,0 mL de etanol 75 % (v/v). Após a adição do etanol o material foi centrifugado a 12000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido, e a lavagem foi repetida mais uma vez. Em seguida este material foi seco sob fluxo de ar em uma capela e, finalmente, o RNA total dissolvido em H₂O-DEPC.

3.18 Tratamento com DNase

As amostras de RNAs extraídas conforme descrito no item 3.17 foram tratadas com DNase (Invitrogen) para garantir a pureza do material. Desta forma, as amostras contendo até 5 µg do RNA total, foram incubadas com 1 U de DNase a 37 °C por 30 min, seguindo-se incubação a 65 °C por 10 min após a adição de 1 µL de EDTA a 25 mM.

3.18.1 Síntese da fita de cDNA

Para sintetizar a primeira fita de cDNA a partir do mRNAs extraídos foi usado o Kit “SuperScrip First strand synthesis system for RT” (Invitrogen Life Technologies). Foram utilizados 5 mg de cada RNA total, e este foi misturado a dNTPmix 10 mM e oligo (dT) 0,5 mg. A seguir a amostra foi incubada a 75 °C por 10 min e foi adicionado a amostra Rtbuffer 10x, MgCl₂ 25 mM, DTT 0,1 M e 1 unidade de RNaseOUT (inibidor recombinante de RNase). A seguir, a amostra foi incubada a 42 °C por 2 min. Foram adicionadas 50 unidades de Super Script II RT (transcriptase reversa) e a amostra foi incubada novamente a 42 °C por 90 min, para que a enzima transcrevesse o mRNA a DNA. Para finalizar a reação a amostra foi incubada a 70 °C por 15 min, e a seguir foi adicionada 1 unidade de RNaseH (para destruir o mRNA) e a amostra foi incubada por 20 min a 37 °C.

3.18.2 Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)

Para as reações de PCR utilizamos a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), em reações de 50 µL contendo oligonucleotídeos 2 mM, dNTPs 10 mM, Tampão da Taq platinum DNA polimerase, MgCl₂ 1,5 mM e DNA molde em concentração variável. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied

Biosystems, Carlsbad, California, Estados Unidos) com desnaturação inicial por 4 min (RT-PCR). Em seguida foram realizados mais 40 ciclos como descrito a seguir: 30 s a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA, 60 s a 55 °C, 2 min a 72 °C e finalmente 10 min a 72 °C para alongamento da fita complementar de DNA. A Tabela 3 apresenta os iniciadores utilizados nesse trabalho.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados na realização da RT-PCR semi-quantitativa

Oligonucleotídeo	Sequência de DNA
α fuc - FW	5'CTCGAGCGAATATATATACTGTTGACATTG3'
α fuc - RV	5'CTGCAGTTAGTGTAGAGAAAATTTCAAAGTCC3'
β fru1 - FW	5'GAATTCGCCGATGTGATCACTACC3'
β fru1 - RV	5'AAGCTTTTATTCTGGCACGCTTCTTC3'
β fru2- FW	5'CTCGAGAAGTTAATTTTTACCTTGAATTTATTC3'
β fru2- RV	5'GAATTCTTATTCGAAAACAGGATGTTTC3'
Actina - FW	5'CCCATCTACGAAGGTTATGCC3'
Actina RV	5'TGCTTCTGGGCAACGGAATCT3'

3.18.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de potencial de 100 V. Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 mg/ml) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

3.19 Preparação da biblioteca de mRNA e sequenciamento

O desenvolvimento do transcriptoma da *Lonomia obliqua* está sobre responsabilidade do Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça (Projeto Fapesp: 12/23115-5). Para a extração de RNA do corpo inteiro da lagarta *Lonomia obliqua* foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante.

O mRNA foi purificado de acordo com o protocolo descrito por Illumina® usando microesferas magnéticas contendo oligo (dT) para a separação do rRNA. Depois disso, o mRNA foi fragmentado no tampão apropriado e a síntese da primeira fita de cDNA foi feita usando o kit Superscript II Reverse Transcriptase® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos).

Após a construção da biblioteca, a sua qualidade foi validada pela confirmação de que a maioria parte dos fragmentos estavam com tamanho em torno de 260 pares de base (pb), utilizando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) com o chip DNA 1000. As bibliotecas foram quantificadas individualmente através de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) com o kit KAPA Library Quantifications (Kapa Biosystems). A biblioteca foi diluída a uma concentração final de 20 pM e cada um foi agrupado e amplificado utilizando o TruSeq PE Cluster Kit v30cBot-HS. O sequenciamento de nova geração foi realizado no HiScanSQ (Illumina®) utilizando o Kit de TruSeq SBS v3-HS (200 ciclos) de acordo com as instruções do fabricante. Cada raia tinha seis amostras e elas foram sequenciadas até 10 milhões de reads serem obtidos a partir de cada amostra.

3.20 Procedimentos do proteômica

As frações cromatográficas enriquecidas com atividade de β -fructosidases e α -fucosidases da hemolinfa e do intestino de *Lonomia obliqua* foram submetidas as análises proteômicas. Essa etapa foi em colaboração com o Dr. Felipe Jun Fuzita e o Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (Cefap) da Universidade de São Paulo. Essas amostras foram secas e reduzidas com 10 mM ditionitrito (30 min à temperatura ambiente), alquilados com 20 mM de iodoacetamida (60 min à temperatura ambiente no escuro) e digeridos com tripsina a noite inteira à temperatura ambiente. Após a digestão, foram adicionados ácido fórmico e DMSO (ambos a 5% v/v) para aumentar a recuperação do peptídeo. As proteínas digeridas foram analisadas em HPLC de fase reversa acoplado a um LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Os arquivos gerados a partir do MS-deconv foram então analisados pelo MASCOT (Matrix Sciences).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das carboidrases, das bactérias intestinais e avaliação do pH na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*

4.1.1 Identificação das carboidrases presentes no sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*

Inicialmente, as larvas de *Lonomia obliqua* utilizadas para a produção do soro-antilonômico eram exclusivamente alimentadas com folhas de *Mangifera indica*. Após a extração das cerdas para produção desse soro, a hemolinfa e o intestino foram coletados para a avaliação das carboidrases presentes nesses dois sistemas dessa lagarta (Figura 10).

Figura 10 - Ensaio para a determinação das atividades absolutas (A) e específicas (B) de celulase, α -fucosidase, β -glucosidase, pectinase, amilase, α -glucosidase e β -fructosidase utilizando como substratos: CMC, MUFUC, NPBGLU, PEC, AMI, NPAGLU, SAC e RAF e os pHs das reações foram: 7,0; 5,0; 7,0; 7,0; 9,0; 7,0; 7,0 e 7,0, respectivamente. Estas medidas são médias de três diferentes lotes de hemolinfia, homogenizados de amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos da *Lonomia obliqua* alimentada com folhas de *Mangifera indica*.

A hemolinfa e a fração intestinal MES1 apresentaram enzimas que melhor degradaram: a rafinose, a sacarose e o amido dentre todos os substratos avaliados. Por outro lado, no gráfico das atividades específicas das carboidrases, a fração intestinal MES2 se destacou na degradação da pectina (Figura 10).

A partir dessa análise, essas enzimas foram avaliadas na hemolinfa e nas frações intestinais de *Lonomia obliqua* quando essas lagartas eram alimentadas com folhas de diferentes espécies de plantas. Dessa forma, as enzimas foram avaliadas e caracterizadas separadamente frente às diferentes alimentações.

4.1.3 Identificação das bactérias intestinais de *Lonomia obliqua*

As enzimas avaliadas no item 4.1.1 em *Lonomia obliqua* poderiam ser sintetizadas pela microflora intestinal. Dessa forma, era fundamental a análise das bactérias presentes no intestino de *Lonomia obliqua*. Para isso, foi estabelecida uma colaboração com a Dra. Márcia Regina Franzolin, pesquisadora do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que indentificou a presença das seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* e *Bacillus* ssp.

4.1.3 Avaliação do pH dos intestinos médios e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

Foi realizada a avaliação dos valores dos pHs do conteúdo intestinal e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Os valores obtidos para o conteúdo intestinal das lagartas de *Lonomia obliqua* alimentadas nos diferentes tipos de folhas: *Alchornea* ssp (Família: Euphorbiaceae), *Eriobotrya japonica* (Família: Rosaceae), *Mangifera indica* (Anacardiaceae), *Psidium guajava* (Myrtaceae) foram de pH 9,0. O pH de hemolinfa da *Lonomia obliqua* nessas dietas foram: 7,4-7,8; 7,0-7,2; 7,4-7,8; 6,6-6,8, respectivamente.

4.2 Avaliação das despolimerases presentes no intestino e na hemolinfa de *Lonomia obliqua*

4.2.1 Presença de amilase, celulase e pectinase intestinal em *Lonomia obliqua*

As atividades de amilases, celulasas e pectinases foram detectadas nas amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos das lagartas *Lonomia obliqua* alimentadas em diferentes dietas (Figura 11).

Figura 11 - Atividade das enzimas amilases, celulases e pectinases utilizando AMI, CMC e PEC, respectivamente como substrato em amostras de frações intestinais (MES1, MES2, MES3 e MP). Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de homogeneizados dos intestinos de *Lonomia obliqua* alimentadas nas diferentes dietas.

As frações MES1 apresentaram as maiores atividades absolutas de amilases em todas as dietas em relação as demais amostras intestinais, exceto nas dietas com folhas de *Alchornea ssp* e *Eriobotrya japonica*, pois nessas dietas as maiores atividades dessa enzima concentram-se na fração MP ou estão igualmente distribuídas em MP e MES1.

Nas atividades específicas de pectinases concentram-se mais nas frações MES2, exceto as lagartas alimentadas com folhas de *Eriobotrya japonica* em relação

às demais frações intestinais quando comparadas com as lagartas alimentadas com as outras dietas (Figura 11).

Em todas as dietas as maiores atividades absolutas de pectinases e celulasas estão nas frações MP em relação às demais amostras intestinais (MES1, MES2 e MES3), porém há baixa atividade de celulase nessas amostras (Figura 11). Dessa forma, as amostras intestinais (MP) de *Lonomia obliqua* foram selecionadas para as caracterizações dessas enzimas.

Sob as mesmas condições usadas nos ensaios da Figura 11 não foi observada atividade de amilase, pectinase e celulase nos extratos foliares de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Além disso, os controles das amostras dos extratos foliares não apresentaram interferências de açúcares redutores.

4.2.2 Presença de amilase, celulase e pectinase na hemolinfa em *Lonomia obliqua*

As atividades de amilases, celulasas e pectinases foram avaliadas nas amostras de hemolinfa de lagartas de *Lonomia obliqua* alimentadas nas diferentes dietas, porém somente a atividade de amilase foi detectada (Figura 12).

Figura 12 - Atividade de amilase utilizando AMI como substrato em amostras de hemolinfa. Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa de *Lonomia obliqua* alimentadas nas diferentes dietas.

As atividades de amilase da hemolinfa das lagartas alimentadas com as diferentes espécies de folhas não apresentaram variações das medidas enzimáticas absolutas e específicas (Figura 12).

Desse modo, as amilases presentes na hemolinfa não sofrem alterações de suas atividades quando há variações nas dietas, porém a modificação das fontes alimentares resulta em interferência nas atividades das despolimerases presentes no intestino médio de *Lonomia obliqua*.

4.2.3 Quantificação de amido nas folhas das plantas de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

Para avaliar se as diferenças de atividade de amilase observadas nos intestinos da lagarta *Lonomia obliqua* estavam relacionadas à quantidade de amido nas folhas utilizadas como dieta, foi realizada a quantificação de amido presente nas folhas de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* (Figura 13) em dois horários distintos.

Figura 13 - Quantidade de amido (%) nas folhas de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Psidium guajava* e *Mangifera indica* às 10 h e 18 h. O cálculo da quantidade de amido nas folhas em porcentagem foi baseado na razão mg de amido por mg de peso seco de cada folha. As barras são as médias aritméticas $\pm$ erros padrões das médias.

As maiores concentrações de amido nas folhas de *Psidium guajava* e *Mangifera indica* ocorrem no período noturno, porém quantidades similares de amido independentemente do horário estão presentes nas folhas de *Alchornea ssp* e

Eriobotrya japonica. As maiores e as menores concentrações desse polímero estão presentes em *Psidium guajava* e *Alchornea* ssp, respectivamente (Figura 13).

4.2.4 Determinação dos pHs ótimos das despolimerases intestinais de *Lonomia obliqua*

4.2.4.1 DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA AMILASE DO INTESTINO DE *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades de amilases das amostras intestinais (MP) de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes espécies de folhas (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do pH sobre a atividade de amilase das amostras solúveis MP do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchornea* ssp (A), *Eriobotrya japonica* (B), *Mangifera indica* (C), *Psidium guajava* (D) utilizando AMI como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 4,0; 5,0; 6,0), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0 e 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0).

A Tabela 4 resume os picos de atividades de amilases das amostras solúveis da fração MP do intestino de *Lonomia obliqua*.

Tabela 4 - Efeito do pH sobre a atividade de amilase das amostras solúveis da fração MP do intestino de *Lonomia obliqua*. Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.

Enzima	Valores de pHs ótimos das amilases das amostras de Intestino (MP)									
	<i>Alchornea</i> sp			<i>Eriobotrya japonica</i>			<i>Mangifera indica</i>		<i>Psidium guajava</i>	
Amilase	8,0	<u>10,4</u>	11,2	8,2	10,4	<u>11,2</u>	8,0	<u>9,2</u>	8,0	<u>9,2</u>

O ensaio de efeito do pH sobre a atividade de amilase do intestino de *Lonomia obliqua* apresentou em todas as dietas dois picos de atividade, um de ordem de 8,0 e o outro de maior atividade compreendido entre 8,2 à 11,2. As amilases das lagartas que se alimentaram com folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica* apresentaram o maior pico de atividade dessa enzima no pH 10,4 e 11,2; respectivamente. Entretanto o pH 9,2 foi o pH ótimo dessa enzima nas lagartas submetidas as dietas com folhas de *Mangifera indica* e *Psidium guajava* (Figura 14).

4.2.4.2 DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA PECTINASE DO INTESTINO DE *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades de pectinases das amostras intestinais (MP) de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes espécies de folhas (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do pH sobre a atividade de pectinase das amostras solúveis MP do intestino de *Lonomia obliqua* utilizando PEC como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão glicina com ácido clorídrico (pH 2,5); 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 3,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0; 7,5; 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5 e 9,0).

A Tabela 5 resume os picos de atividades de pectinases das amostras solúveis da fração MP do intestino de *Lonomia obliqua*.

Tabela 5 - Efeito do pH sobre a atividade de pectinase das amostras solúveis da fração MP do intestino de *Lonomia obliqua*. Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.

Enzima	Valores de pHs <u>ótimos</u> das Pectinases das amostras de Intestino (MP)											
	<i>Alchornea sp</i>			<i>Eriobotrya japonica</i>			<i>Mangifera indica</i>			<i>Psidium guajava</i>		
Pectinase	5,6	<u>6,5</u>	7,8	5,6	<u>7,0</u>	8,5	5,6	<u>6,5</u>	7,8	5,6	<u>6,6</u>	<u>7,0</u>

O ensaio de efeito do pH sobre a atividade de pectinase do intestino de *Lonomia obliqua* apresentou em todas as dietas três picos majoritários de atividade, um de ordem de 6,5 e o outro de maior atividade em 7,0, entretanto também há um pico de atividade dessa enzima minoritário no pH 5,6 (Figura 15).

4.2.4.3 DETERMINAÇÃO DOS pHs ÓTIMOS DA CELULASE DO INTESTINO DE *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades de celulasas das amostras intestinais (MP) de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes espécies de folhas (Figura 16).

Figura 16 - Efeito do pH sobre a atividade de celulase das amostras solúveis MP do intestino utilizando CMC como substrato. Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 7,0 e 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pH 9,0).

O ensaio de efeito do pH sobre a atividade de celulase do intestino de *Lonomia obliqua* apresentou as maiores atividades dessa enzima concentradas em uma faixa neutra de pH (pH 7,0) em todas as dietas, exceto para as celulases das lagartas alimentada com folhas de *Psidium guajava*, pois há pouca variação dessa atividade nos três pHs avaliados (Figura 16).

Portanto, as amilases, celulases e pectinases do intestino de *Lonomia obliqua* apresentaram uma faixa de pH ótimo mais alcalino. As amilases, em relação às despolimerases analisadas, são as enzimas com pHs ótimos mais alcalinos. Os pHs ótimos das despolimerases digestivas apresentaram variações de acordo com as diferentes formas de alimentação aos quais as lagartas foram submetidas (Figuras 14, 15, 16).

4.2.5 Separação cromatográfica e géis nativos das amilases e pectinases das amostras intestinais (MP) de *Lonomia obliqua*

A separação cromatográfica (Figura 17) e o gel nativo (Figura 18) foram utilizados para revelar a presença de amilase e pectinase nas amostras intestinais MP de *Lonomia obliqua*.

Figura 17 - Separação cromatográfica das (A) amilases (AMI) e das (B) pectinases (PEC) na coluna HiTrap Q das amostras solúveis do intestino MP (-■-) de *Lonomia obliqua*, gradiente salino em degraus crescente (-). O perfil de proteína está representado por (-▲-).

As amilases e pectinases nas amostras de MP das lagartas revelaram nas separações cromatográficas a presença de uma e três isoformas dessas enzimas, respectivamente (Figura 17). Entretanto no gel nativo observamos a presença de uma isoforma de amilase com migração relativa de 11 e também uma isoforma de pectinase com migração relativa de 8 (Figura 18). Não foram visualizadas bandas da atividade de pectinase das lagartas alimentadas com folhas de *Alchornea* ssp e *Psidium guajava*.

Figura 18 - Atividade sobre AML (A) e PEC (B) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MP) de *Lonomia obliqua* das dietas: *Eriobotrya japonica* (1 e 5), *Psidium guajava* (2), *Mangifera indica* (3 e 6) e *Alchornea* ssp (4). Todas as amostras continham valores similares na quantidade de proteína.

O reunido das frações 15 e 16 da HiTrap Q do intestino (MP) de *Lonomia obliqua* (Figura 17) foram aplicadas na coluna de gel filtração Superdex G-75 para estimar a massa molecular da pectinase (Figura 19).

Figura 19 - Atividades de pectinases (-■-) e proteína (-▲-) nas frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir do reunido das frações 15 e 16 da HiTrap Q do intestino (MP) (-■-) de *Lonomia obliqua*. Após os ensaios de atividades os volumes de retenções das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

As pectinases intestinais (MP) de *Lonomia obliqua* apresentaram uma molecular de 42 kDa (Figura 19).

4.2.6 Efeitos de diferentes concentrações do substrato AMI sobre a atividade da amilase do intestino (MP) de *Lonomia obliqua*

Os efeitos de diferentes concentrações dos substratos AMI sobre a atividade da amilase do intestino (MP) da *Lonomia obliqua* (Figura 20) isolada das frações 5 e 6 da HiTrap Q FF (Figura 17) foram avaliados.

Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações de AMI sobre a atividade do reunido ativo do intestino (MP) de *Lonomia obliqua* após fracionamento em cromatografia de interação iônica na coluna HiTrap Q FF.

O valor de afinidade (K_m) da amilase intestinal de *Lonomia obliqua* utilizando AMI como substrato foi de: $K_m = 0,48 \pm 0,06\%$ (Figura 20).

4.2.7 Efeito da presença de íons sobre as atividades das amilases de *Lonomia obliqua*

As atividades de amilases foram avaliadas na presença do: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de magnésio (MgCl_2) nas frações de MP de *Lonomia obliqua* (Figura 21).

Figura 21 - Efeito da presença de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂) e cloreto de magnésio (MgCl₂) sobre as atividades absolutas de amilase em amostras de MP utilizando AMI como substrato. Foram utilizados dois controles: amostra do homogeneizado do conteúdo e membrana peritrófica antes da diálise (AD) e amostra do homogeneizado do conteúdo e membrana peritrófica após diálise (DD). Estas medidas são médias e os respectivos desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de homogeneizados dos intestinos de *Lonomia obliqua*. O cinza escuro e cinza claro referem-se às condições de diálises que foram submetidas às amostras de MP, ou seja, a diálise contra tampão e a diálise contra EDTA, respectivamente.

As amilases de *Lonomia obliqua* apresentaram uma perda de atividade após a diálise quando comparado com o controle sem diálise. Isso possivelmente pode estar relacionado com a presença de algum estabilizador da enzima, que foi removido durante a diálise ou a eventos de proteólise durante a diálise devido a presença de enzimas proteolíticas.

As amilases das frações de MP de *Lonomia obliqua* apresentaram poucas variações de suas atividades na presença de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂) e cloreto de magnésio (MgCl₂). Essas enzimas apresentaram uma discreta elevação de sua atividade nas concentrações crescentes de NaCl e em baixas concentrações de cloreto de cálcio, porém há uma pequena inibição na atividade dessa enzima na presença do cloreto de magnésio.

4.2.8 Sequências das amilases de *Lonomia obliqua*

A análise dos dados do transcriptoma indicaram a presença de 2 transcritos completos e distintos que codificam as amilases de *Lonomia obliqua*. O alinhamento dessas sequências com as sequências dessa enzima em *Tenebrio molitor* (TM), *Bombax mori* (BM), *Mus musculus* (MM) e *Homo sapiens* (HS) foi realizado a fim de compará-las com os diferentes resíduos envolvidos na catálise e os sítios de ligação a íons (Figura 22).

	10	20	30	40	50
TM	-----	-----	-QKDNFASG	RNSIVHLFEW	KWNDDIADECE
BM	--MFRYILLL	SAVT---LAL	AYKNPHYASG	RTTMVHLFEW	KWDDIAAECE
HS	---MKLFWLL	FTIG---FCW	AQYSSNTQQG	RTSIVHLFEW	RWVDIALECE
MM	---MKFFLLL	SLIG---FCW	AQYDPHTQYG	RTAIVHLFEW	RWVDIAKECE
LO1	--MFRYILLL	SAVT---LAI	AYRNPHYASG	RSTMVHLFEW	KWDDIAAECE
LO2	MRMYRKLLLI	CITLNSVLCD	HHDRTNQLPD	RSAIVHLFEW	KWRDIADECE
	60	70	80	90	100
TM	RFLQPQGFGG	VQISPPNEYL	VADG----RP	WWERYQPVS-	-YIINTRSGD
BM	RFLGPRGFGG	IQVSPPNENL	VIWSRN--RP	WWERYQPIS-	-YRLVTRSGN
HS	RYLAPKGFGG	VQVSPPNENV	AIHNPF--RP	WWERYQPVS-	-YKLCSTRSGN
MM	RYLAPNGFAG	VQVSPPNENI	VVHSPS--RP	WWERYQPIS-	-YKICSRSGN
LO1	RFLGPRGYGG	IQISPPNENL	VIWSRN--RP	WWERYQPIS-	-YRLVTRSGN
LO2	RFLAPKGYGG	VQISPPSENV	IIHLSDGTRP	WYERYQVMS-	-YKIATRSGN
	110	120	130	140	150
TM	ESAFTDMTRR	CNDAGVRIYV	DAVINHMT--	GMN--GVGTS	GSSADHDGMN
BM	ENQFSNMVRR	CNNVGVRIYV	DAIINHMT--	GTWNENVGTG	GSTANFENWH
HS	EDEFNRNMVTR	CNNVGVRIYV	DAVINHMCN	AVSAGTSSTC	GSYFNPGRSD
MM	EDEFNRNMVTR	CNNVGVRIYV	DAVINHMCN	GAQAGQSSTC	GSYFNPNNRD
LO1	EQQFSNMVRR	CNNVGVRIYV	DAIINHMT--	GTWNENVGTG	GSTANFGEWS
LO2	REDFLNMTTR	CNKVGVRIYA	DVVINHMT--	ADNKENIGTG	GSTADFQNYD
	160	170	180	190	200
TM	YPAVPYSGSD	FHSP-CEVNN	--YQD---AD	NVRNCELV--	--GLRDLNQG
BM	YPAVPYGRND	FNWPHCVITG	--SDYNCCPD	RVRNCELS--	--GLKDLNQG
HS	FPAVPYSGWD	FNDGKCKTGS	GDIENYNDAT	QVRDCRLS--	--GLLDLALG
MM	FPGVPYSGFD	FNDGKCRITAS	GDIENYQDAA	QVRDCRLS--	--GLLDLALE
LO1	YPSVPYGRND	FNWPNCVISG	--NDYGCCAD	RVRNCELS--	--GLKDLNQG
LO2	YPGVPYRREH	FHYPCFIDN	--YMD---AV	KIRVCDLV--	--GLKDLNHG
	210	220	230	240	250
TM	SDYVRGVLLD	YMNHMDLGV	AGFRVDAAKH	MSPGDLSVIF	SGLKNLNTDY
BM	SDYVRQQILN	YMNRLIDMGV	AGFRIDAACH	MWPHDLRVIY	DRLRNLNTAH
HS	KDYVRSKIAE	YMNHLIDIGV	AGFRIDASKH	MWPGDIKAIL	DKLHNLNSNW
MM	KDYVRTKVAD	YMNHLIDIGV	AGFRIDASKH	MWPGDIKAIL	DKLHNLNTKW
LO1	TEYVRQQIVN	YMNRLIDMGV	AGFRIDAACH	MWPHDLRVIY	DRLHNLNTGH
LO2	IPHVRDKIIE	FLNELISLGV	AGFRIDAACH	MWPNDLKIIY	DGLSLDLSDF
	260	270	280	290	300
TM	GFADGARPFI	YQEVIDLGGE	AISKNEYTGF	-GCVLEFQFG	VSLGNAFQGG
BM	GFPGARPYI	YQEVIDLGGE	AISRNEYTPL	-AAVTEFRFG	LELSQAFQRR
HS	-FPEGSKPFI	YQEVIDLGGE	PIKSSDYFGN	-GRVTEFKYG	AKLGTVIRKW
MM	-FSQGSRPFI	YQEVIDLGGE	AVSSNEYFGN	-GRVTEFKYG	AKLGKVMRKW
LO1	GFSSGARPYI	YQEVIDLGGE	AITRDEYTPL	-APVTEFRFG	MELSRAFQRG
LO2	GFEQKTRPYI	YQEVIIYGNE	PIKHSEYIPL	-GDVTEFRVG	IELKPVFLGN

	310	320	330	340	350
TM	N-----QLK	NLANWGPEWG	LLEGLDAVV-	FVDNHDNQRT	GGG---QILT
BM	N-----QLR	WLVNWGPQWG	LLASGDALT-	FIDNHDNQRG	HGAG-GNILT
HS	NGE-----KMS	YLKNWGEWG	FMPSDRALV-	FVDNHDNQRG	HGAGGASILT
MM	DGE-----KMS	YLKNWGEWG	LMPSDRALV-	FVDNHDNQRG	HGAGGASILT
LO1	N-----QLR	WLVNWGPQWG	LLASDVALT-	FIDNHDNQRG	HGAG-GNILT
LO2	N-----PLK	WLVSWGEAWN	LSPSENVLV-	FIDNHDTQRA	N-----EVL
	360	370	380	390	400
TM	YK-----	---NPKPYKM	AIAFMLAHPY	GTTRIMSSFD	FT-DNDQGP-
BM	YK-----	---QSRQYKG	AIAFMLAHPY	GYPQLMSSFA	FT-DTEAGP-
HS	FW-----	---DARLYKM	AVGFMLAHPY	GFTRVMSSYR	WPRYFENGKD
MM	FW-----	---DARLYKM	AVGFMLAHPY	GFTRVMSSYR	WPRNFQNGKD
LO1	YK-----	---QSKQYKG	AIAFMLAHPY	GEPQLMSSFD	FH-DTEAGP-
LO2	YK-----	---MSRPYKA	AIAFMAHTY	GEPRIMSSYF	FN-AFDRGP-
	410	420	430	440	450
TM	-----PQDG	SGNLISPGIN	DDNTCSNGYV	CEHRWRQVYG	MVGFRNAVEG
BM	-----PMNS	RGDITSPTIN	ADNSCGNGWI	CEHRWRQIHN	MVVFRTAGN
HS	VNDWVGPPND	NGVTKEVTIN	PDTTCGNDWV	CEHRWRQIRN	MVNFRNVVDG
MM	VNDWVGPPNN	NGKTKEVSIN	PDSTCGNDWI	CEHRWRQIRN	MVAFRNVVNG
LO1	-----PMDS	SGNIISPSIN	SDNSCGNGWI	CEHRWRQISN	MVAFRNVAGN
LO2	-----PSDC	DGNILSPDIN	EDDTCNGWV	CEHRWRQIYQ	MVAFRNAVVD
	460	470	480	490	500
TM	TQVENWWSND	D-----	-----	-----N	QIAFSRGSQG
BM	GALTNWWDNG	S-----	-----	-----N	QIAFCRGNQA
HS	QPFNTWYDNG	S-----	-----	-----N	QVAFGRGNRG
MM	QPFANWWDND	S-----	-----	-----N	QVAFGRGNKG
LO1	TNINDWWDNG	S-----	-----	-----N	QIAFCRGGQG
LO2	SKIENWWDNG	N-----	-----	-----N	QMAFSRGNKG
	510	520	530	540	550
TM	FVAFTNGG-D	LNQN----LN	TGLPAGTYCD	VISGELSGGS	CTGKSVTVGD
BM	FIAFNNDAWD	MDQT----LQ	TCLPAGTYCD	IISGARSGNR	CTGKSIVVGS
HS	FIVFNNDWWT	FSLT----LQ	TGLPAGTYCD	VISGDKINGN	CTGIKIYVSD
MM	FIVFNNDWDA	LSET----LQ	TGLPAGTYCD	VISGDKVDGN	CTGIKVYVGN
LO1	FIAFNNDYWD	LNQT----LQ	TCLPAGTYCD	VISGEKSGNR	CTGKSVVVG
LO2	FILFNVEGRN	LNEN----LQ	TGLPQGKYCD	VISGKIHNNS	CTGKTITVGS
	560	570	580		
TM	NGSADISLGS	AEDDGVLAIH	VN--AKL---		
BM	DGRALIIHRS	NEYDMMVAIH	RGADSRL---		
HS	DGKAHFSISN	SAEDPFIAIH	AESKL-----		
MM	DGKAHFSISN	SAEDPFIAIH	AESKI-----		
LO1	DGRAHISLGA	NEYDMILAIH	RGDESRL---		
LO2	DGRANISLPE	NVEDLHIAIH	IGKESRLLS-		

Figura 22 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de amilases de *Tenebrio molitor* (TM), *Bombxy mori* (BM), *Homo sapiens* (HM), *Mus musculus* (MM), sequência 1 de *Lonomia obliqua* (LO1) e sequência 2 de *Lonomia obliqua* (LO2). Seguindo a numeração de *Tenebrio molitor*, os resíduos destacados em amarelo correspondem a tríade catalítica (Asp 185, Glu 222 e Asp 287), os destacados em verde indicam os resíduos envolvidos com a interação com os íons cloreto e os destacados em rosa com os íons cálcio.

Os alinhamentos das sequências de amilases de *Lonomia obliqua* comparando com as sequências dessa enzima de diferentes organismos indicam que os resíduos são conservados tanto na tríade catalítica (Asp 185, Glu 222 e Asp

287), quanto nos resíduos relacionados aos sítios de ligação a íons cloreto (Arg 183 e Asn 285) e cálcio (Asn 98, Arg 146, Asp 155 e His 189) (Figura 22).

O pI teórico e a massa molecular e das sequências de amilases LO1 e LO2 de *Lonomia obliqua* foi estimado em: 56,5 kDa e 6,28; 57,2 kDa e 5,87, respectivamente. A identidade entre as duas sequências foi de 57%.

4.3 Presença de β -glucosidase na hemolinfa e no intestino médio de *Lonomia obliqua*

As atividades de β -glucosidases foram detectadas na hemolinfa e nas amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos das lagartas de *Lonomia obliqua* alimentadas em diferentes dietas (Figura 23).

Figura 23 - Ensaios para a determinação de atividade β -glucosidase utilizando NPBGLU como substrato. Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa (H) e homogeneizados das amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos de *Lonomia obliqua* em diferentes dietas.

As β -glucosidases digestivas, independentemente da dieta na qual as lagartas foram alimentadas, apresentaram maior atividade absoluta nas porções solúveis do epitélio do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*. Entretanto, na alimentação com

folhas de *Alchornea* ssp e *Mangifera indica* a atividade específica é maior em MES2. A β -glucosidase da hemolinfa das lagartas alimentadas com as diferentes espécies de folhas não apresentou variações das medidas enzimáticas absolutas e específicas. Portanto, perfis distintos das variações enzimáticas somente ocorreram nas amostras intestinais (Figura 23).

Sob as mesmas condições usadas nos ensaios da Figura 23 não foi observada atividade de β -glucosidase nos extratos foliares de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Dessa forma, as atividades das β -glucosidases descritas na Figura 23 são de *Lonomia obliqua*.

4.3.1 Determinação do pH ótimo das β -glucosidases de *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades de β -glucosidases da hemolinfa e das amostras MES1 dos intestinos das lagartas *Lonomia obliqua* alimentadas nas diferentes dietas (Figura 24), pois essas amostras apresentavam maiores atividades absolutas dessa enzima em relação as demais amostras intestinais.

Figura 24 - Efeito do pH sobre a atividade β -glucosidase das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchornea ssp* (A), *Eriobotrya japonica* (B), *Mangifera indica* (C), *Psidium guajava* (D) e das amostras de hemolinf (E). Os tampões utilizados para o ensaio enzimático foram: 0,2 M de tampão glicina com ácido clorídrico (pH 2,5); 0,2 M de tampão citrato fosfato (pHs: 3,0; 4,0; 4,2; 4,5; 4,8; 5,0; 5,2; 5,5; 6,0; 6,2; 6,5), 0,2 M de tampão fosfato de sódio (pHs: 6,8; 7,0; 7,2; 7,5; 7,7; 8,0) e 0,2 M de tampão glicina com hidróxido de sódio (pHs: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0).

A Tabela 6 resume os picos de atividades de β -glucosidases das amostras de hemolinf e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua*.

Tabela 6 - Efeito do pH sobre a atividade de β -glucosidase das amostras de hemolinf e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua*. Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.

Enzima	Valores de pHs ótimos das β -glucosidases das amostras de Intestino (MES1)										Hemolinf				
	<i>Alchomea</i> sp			<i>Eriobotrya japonica</i>			<i>Mangifera indica</i>			<i>Psidium guajava</i>					
β -glucosidase	-	5,8	7,2	4,4	6,2	8,0	5,2	6,2	7,1	4,4	5,8	7,9	5,5	6,8	7,3

Há uma ampla faixa de atividades de β -glucosidases presentes no intestino e na hemolinfa variando entre 4,4 a 8,0 de *Lonomia obliqua*. As atividades majoritárias ocorrem em pH entre 7,1 a 8,0 e essas enzimas presentes no intestino apresentam um pH ótimo tendendo mais para condições mais alcalinas. As lagartas alimentadas com folhas de *Alchornea* ssp apresentaram dois picos de atividade de pHs ótimos para a β -glucosidase, entretanto nas demais dietas há a presença majoritária de três picos dessa atividade. Os pHs ótimos das β -glucosidases da hemolinfa das lagartas alimentadas por diferentes dietas não apresentaram variações. Portanto, esses resultados são de uma média geral nas amostras da hemolinfa de *Lonomia obliqua* (Tabela 6).

4.3.2 Separação cromatográfica, géis nativos e determinação da massa molecular das β -glucosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

A separação cromatográfica (Figura 25) e gel nativo (Figura 26) foram realizados para comprovar a presença das β -glucosidases e a separação das isoformas dessa enzima na hemolinfa e no intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*.

Figura 25 - Separação cromatográfica da β -glucosidase na coluna HiTrap Q da hemolinfa (-□-) e das amostras solúveis do intestino MES1 (-■-) de *Lonomia obliqua*, gradiente salino em graus crescente (-). O perfil de proteína está representando por (-▲-).

Figura 26 - Atividade sobre MUBGLU após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MES1) de *Lonomia obliqua* nas dietas: *Eriobotrya japonica* (1), *Psidium guajava* (2), *Mangifera indica* (3) e *Alchornea* ssp (4). Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteína.

Na hemolinfa e nas amostras intestinais (MES1) de *Lonomia obliqua* os géis nativos apresentam a presença de uma isoforma de β -glucosidase, porém a migração relativa dessa enzima na hemolinfa ($MR = 0,5$) é diferente das amostras intestinais ($MR = 0,2$ e $0,3$) (Figura 26).

As amostras de hemolinfa bruta e o reunido das frações 9, 10 e 11 da HiTrap Q do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua* (Figura 25) foram aplicadas na coluna de gel filtração Superdex G-75 para estimar as massas moleculares dessa enzima (Figura 27).

Figura 27 - Atividades de β -glucosidases nas frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir da hemolinfa (A) (-□-) e do intestino (B) (-■-) de *Lonomia obliqua*. O perfil de proteína está representando por (-▲-). Após os ensaios de atividades os volumes de retenções das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

Tanto na hemolinfa como no intestino (MES1) as β -glucosidases apresentaram mesma massa molecular de 111 kDa (Figura 27) mesmo quando a cromatografia é realizada em alta força iônica.

4.4 Presença de β -fructosidases na hemolinfa e no intestino médio de *Lonomia obliqua*

Os resultados prévios obtidos pelo nosso grupo indicavam a presença de uma enzima na hemolinfa da *Lonomia obliqua* capaz de hidrolisar a sacarose adicionada ao meio de cultura, sendo que as quantidades finais de glicose eram superiores as condições iniciais do experimento (MARANGA et al., 2003).

Dessa forma, resolvemos investigar quais enzimas são responsáveis por esse fato na hemolinfa e também nas amostras intestinais (MES1, MES2, MES3, MP) de *Lonomia obliqua* quando submetidas a diferentes dietas. Para isso, utilizamos além da sacarose (SAC), substratos adicionais para responder a essa pergunta. Por meio dos dados obtidos com os diferentes substratos e as respectivas medidas de proteína, foi possível calcular as atividades absolutas (mU/mL) e as atividades específicas (mU/mg) das enzimas encontradas nas hemolinfas e nos homogeneizados dos intestinos médio de *Lonomia obliqua* (Figura 28). Como a sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose ela poderia ser clivada tanto por α -glucosidase como pela β -fructosidase (Tabela 1). Para fazermos esta distinção utilizamos também o substrato rafinose. Por sua vez, a rafinose pode ser

hidrolisada pela β -fructosidase ou por uma α -galactosidase (Tabela 1). Para a distinção das enzimas todos os substratos foram testados.

Figura 28 - Enzimas que hidrolisam a SAC, NPAGLU e RAF quantificadas por atividade absoluta (mU/mL) na hemolinfa (H) nos homogeneizados do intestino médio sob a influência de diferentes dietas da *Lonomia obliqua*. As medidas de atividade específica foram feitas e refletem o mesmo resultado que a atividade absoluta.

A rafinose poderia ser hidrolisada pela ação cruzada das β -fructosidases e das α -galactosidases, mas não foi observada atividade de α -galactosidase sobre NPAGAL sob as mesmas condições usadas nos ensaios dos outros substratos. Dessa forma, a ausência de atividade dessa enzima indica que a atividade sobre rafinose verificada está relacionada à β -fructosidase.

As α -glucosidases e β -fructosidases são responsáveis pela hidrólise da sacarose em *Lonomia obliqua*, pois a SAC foi hidrolisada pela ação cruzada dessas enzimas tanto no sistema circulatório como no digestório dessa lagarta nas diferentes dietas (Figura 28).

Independentemente das dietas, nas amostras das hemolinfas não verificamos alterações nas atividades específicas e absolutas das α -glucosidases e β -

fructosidases. Entretanto alterações alimentares levaram a mudanças no perfil enzimático dessas enzimas no sistema digestório (Figura 28).

A maior atividade específica e absoluta da β -fructosidase intestinal ocorreu nas lagartas alimentadas com folhas de *Eriobotrya japonica*. Por outro lado, a presença da β -fructosidase foi praticamente nula nas lagartas que se alimentaram com folhas de *Alchornea* ssp e, portanto, a hidrólise da sacarose nessa dieta ocorreu possivelmente pela ação da α -glucosidase (Figura 28).

As amostras MES1 em todas as alimentações apresentaram maiores atividades enzimáticas absolutas e específicas de α -glucosidase e β -fructosidase em relação às demais amostras intestinais (Figura 28). Portanto, as hemolinfas e as amostras MES1 foram selecionadas para as etapas de purificação e caracterização das β -fructosidases.

Sob as mesmas condições usadas nos ensaios da Figura 28 não foi observada atividade de α -glucosidase e β -fructosidase nos extratos foliares de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Dessa forma, as α -glucosidases e β -fructosidases da Figura 28 devem ser produzidas pela *Lonomia obliqua*.

4.4.1 Quantificação de glicose, frutose, rafinose e sacarose nas folhas das plantas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*

A quantidade de glicose, frutose, rafinose e sacarose presentes nas folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* são demonstradas na Figura 29.

Figura 29 - Quantidades de µg de glicose, frutose, sacarose e rafinose por mg de extração das folhas de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* as 10h e 18h. As barras são as médias aritméticas $\pm$ erros padrões das médias.

A sacarose foi o carboidrato majoritário nas folhas de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Essas espécies não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos estoques de sacarose nos diferentes horários, exceto *Psidium guajava* (Figura 29).

4.4.2 Determinação do pH ótimo das β -fructosidases de *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades: α -glucosidases e β -fructosidases da hemolinfa e das amostras MES1 dos intestinos das diferentes dietas (Figura 30).

Figura 30 - Efeito do pH sobre a atividade α -glucosidases (NPAGLU e SAC) e β -fructosidases (SAC e RAF) das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchornea ssp* (A, G e K), *Eriobotrya japonica* (B, H e L), *Mangifera indica* (C, I e M), *Psidium guajava* (D, J e N) e das amostras de hemolinfa (E, F e O). As barras são as médias aritméticas de triplicatas das amostras de hemolinfa e intestino (MES1) $\pm$ erros padrões.

A Tabela 7 resume os picos de atividades de α -glucosidases e β -fructosidases das amostras de hemolinfa e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua*.

Tabela 7 - Efeito do pH sobre a atividade α -glucosidases e β -fructosidases de amostras de diferentes tecidos de lagartas de *Lonomia obliqua* alimentada em diferentes dietas. Os números que aparecem sublinhados referem-se aos picos de atividades enzimáticas nos diferentes pHs ótimos.

Otimos:															
Enzima	MES1												Hemolinfa		
	Alchornea sp			Eriobotrya japonica			Mangifera indica			Psidium guajava					
NPAGLU	-	<u>6,4</u>	7,8	4,7	5,7	<u>6,7</u>	<u>6,2</u>	7,2	8,7	-	6,2	<u>7,0</u>	4,3	5,9	<u>6,7</u>
SAC	4,3	<u>6,7</u>	<u>7,2</u>	4,3	<u>7,2</u>	8,7	4,3	6,1	<u>7,2</u>	4,3	<u>6,7</u>	8,7	<u>6,2</u>	7	8,5
RAF	4,4	<u>7,0</u>	8,5	4,5	<u>7,0</u>	8,9	-	<u>7,0</u>	8,5	4,5	<u>7,0</u>	8,5	5,4	6,2	<u>6,8</u>

O substrato RAF foi hidrolisado pelas β -fructosidases intestinais e da hemolinfa e apresentaram atividades ótimas nos pHs próximos de 7,0. Para a SAC há uma atuação mista das α -glucosidases e das β -fructosidases, pois as duas enzimas são capazes de hidrolisar esse substrato (Figura 30). Por outro lado, as α -glucosidases intestinais de *Lonomia obliqua* apresentaram diferentes valores de pHs ótimos, sendo mais ácidas que as β -fructosidases do intestino dessa lagarta. Portanto, corroborando os resultados anteriores que indicam duas enzimas distintas os pHs ótimos de α -glucosidases é diferente do valor de pH ótimo da β -fructosidase (Tabela 7).

Os pHs ótimos das α -glucosidase e das β -fructosidases da hemolinfa das lagartas alimentadas por diferentes dietas não apresentaram variações. Portanto, esses resultados são de uma média geral nas amostras da hemolinfa de *Lonomia obliqua* (Figura 30).

A partir da determinação do pH ótimo das enzimas, ficou estabelecido que o pH utilizado para as etapas de caracterização da β -fructosidase seria o Tampão Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,0 e as amostras da hemolinfa e do intestino provenientes das lagartas que se alimentaram com folhas de *Mangifera indica*.

4.4.3 Separação cromatográfica e géis nativos das α -glucosidases e das β -fructosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

Com o intuito de comprovar a presença das α -glucosidases e das β -fructosidases nas amostras de MES1 do intestino e da hemolinfa foram realizados experimentos de géis de atividades nativos (Figura 31) e de separações cromatográficas (Figura 32) que demonstram migrações distintas dessas duas enzimas.

Figura 31 - Atividade sobre MUAGLU (A) e RAF (B) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos intestinos (MES1) de *Lonomia obliqua* das dietas: *Eriobotrya japonica* (1), *Psidium guajava* (2), *Mangifera indica* (3) e *Alchornea* ssp. Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteínas.

As enzimas α -glucosidases e β -fructosidases apresentaram migrações relativas distintas nos géis de atividades nativos nos dois sistemas de *Lonomia obliqua*. Os géis nativos dessas duas enzimas nas amostras solúveis dos intestinos (MES1) provenientes das diferentes dietas apresentaram duas bandas majoritárias, entretanto na hemolinfa somente uma (Figura 31).

Figura 32 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Q da hemolinfa (-□-) e das amostras solúveis do intestino MES1 (-■-) de *Lonomia obliqua* e gradiente salino em degraus crescentes (--).

Para identificar e purificar as enzimas, as amostras solúveis de MES1 e da hemolinfa foram aplicados na coluna HiTrap Q previamente equilibrada com 20 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e eluídas sob gradiente salino em degraus crescentes no mesmo tampão contendo de 0-1 M NaCl. As atividades das frações foram testadas e as frações mais ativas (14 e 15) contra os substratos SAC e RAF da HiTrap Q foram reunidas (Figuras 32) e aplicadas na coluna hidrofóbica HiTrap Fenil FF (Figura 33).

Figura 33 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Fenil FF a partir de frações ativas sobre sacarose e rafinose após cromatografia em coluna HiTrap Q da amostra de hemolinfa ($\square$ -) e das amostras dos solúveis do intestino MES1 ($\blacksquare$ -) de *Lonomia obliqua*. Gradiente salino em degraus decrescentes (---).

Todas as frações da cromatografia da HiTrap Fenil FF foram testadas contra: NPAGLU, RAF e SAC. Nas frações 19, 20 e 21 a α -glucosidase não foi capaz de hidrolisar o substrato NPAGLU tanto nas amostras da hemolinfa e do intestino, portanto as atividades detectadas contra os substratos: RAF e SAC podem ser atribuídas realmente à presença de uma β -fructosidase nessas frações. As etapas de cromatografia foram as mesmas para obter a β -fructosidase isolada em termos de atividade tanto a partir de hemolinfa como no intestino e essas frações contendo β -fructosidase foram reunidas e denominadas como β fru1. Outra isoforma da β -fructosidase, β fru2, é eluída juntamente com a presença de uma α -glucosidase nas frações de 14-18 (Figura 33).

Para a determinação da massa molecular das frações enriquecidas em α -glucosidases e β -fructosidases após cromatografia hidrofóbica de amostras de homogeneizado do intestino médio (MES1) e da hemolinfa foi utilizada uma cromatografia de gel filtração (Superdex G-75) (Figura 34).

Além disso, as frações 19 e 20 da HiTrap Fenil FF da hemolinfa de *Lonomia obliqua* (Figura 33) foram reunidas e submetidas a SDS-PAGE no qual foi possível estimar a massa molecular da β -fructosidase. A partir da regressão linear

correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrões com a distância percorrida no gel (Figura 35).

Figura 34 - Atividades de α -glucosidases e β -fructosidases em frações obtidas após filtração em gel na coluna Superdex G-75 realizada a partir das frações ativas após combinação de cromatografias de troca iônica e hidrofóbica que tiveram como amostra inicial a porção solúvel do homogenizado do intestino (MES1) (-■-) e da hemolinfa (-□-) de *Lonomia obliqua*. Após os ensaios de atividades os volumes de retenção das enzimas em estudo foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

Figura 35 - (A) Eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS para preparação da β -frutosidase isolada a partir da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Como padrão foi utilizado a mistura pré-corada *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). (B) Regressão linear das massas moleculares e da migração relativa de proteínas padrão massa molecular da β -frutosidase (□).

As α -glucosidases tanto na hemolinfa como do intestino apresentaram uma massa molecular de: 228 kDa e 87 kDa, enquanto a β -fructosidase apresentou 68 kDa nos dois sistemas. A massa molecular da β -fructosidase da hemolinfa no gel de SDS-PAGE foi semelhante a da gel filtração (Figura 35).

4.4.4 Efeitos do substrato RAF e SAC sobre a atividade da β -fructosidase da hemolinfa (β fruH) e do intestino (MES1) (β frul) de *Lonomia obliqua*

Os efeitos de diferentes concentrações dos substratos RAF e SAC sobre a atividade da β -fructosidase da hemolinfa (β fruH) e do intestino (MES1) (β frul) de *Lonomia obliqua* (Figura 36) isolada das frações 19 e 20 da HiTrap Fenil FF (Figura 33) foram avaliados, os valores obtidos estão na Tabela 8.

Figura 36 - Efeito da concentração de RAF (A e C) e SAC (B e D) sobre a atividade do reunido ativo da hemolinfa (A e B) e de intestino (MES1) (C e D) das β -fructosidases de *Lonomia obliqua*. O valor do coeficiente de correlação linear (R) de todos os plots de Lineweaver-Burk é de 0,999.

Tabela 8 - Efeito da concentração dos substratos RAF e SAC sobre a atividade de β -frutosidase isoladas da hemolinfa (β fruH) e do intestino MES1 (β frul).

Substratos	β -frutosidase					
	β fruH			β frul		
	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}/K_m (min ⁻¹)	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}/K_m (min ⁻¹)
RAF	5,2 $\pm$ 0,6	14,6 $\pm$ 0,3	2,8	51,4 $\pm$ 7,6	13,4 $\pm$ 0,8	0,3
SAC	5,0 $\pm$ 0,7	15,4 $\pm$ 0,5	3,1	3,0 $\pm$ 0,3	41,2 $\pm$ 1,1	14,0

Os valores de K_m indicam que a afinidade da β frul pelo substrato SAC é maior que o RAF. Por outro lado, a β fruH não apresenta diferença de afinidade por esses dois substratos. A β fruH apresenta uma razão SAC/RAF de 1,1 (Tabela 8), indicando uma mesma eficiência de hidrólise para os dois substratos. A β frul apresenta uma maior eficiência de hidrólise sobre SAC dado que a razão SAC/RAF de 46 vezes (Tabela 8).

4.4.5 Efeito do Tris, da frutose e da glicose sobre a atividade de β -fructosidase da hemolinfa (β fruH) e do intestino (MES1) (β frul) de *Lonomia obliqua*

Os experimentos de inibição demonstraram que o Tris, a frutose e a glicose são inibidores da β fruH e β frul de *Lonomia obliqua* (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de IC₅₀ sobre a atividade de β fruH e β frul parcialmente isoladas de *Lonomia obliqua* utilizando como inibidores a glicose, a frutose e o Tris.

	IC 50					
	β fruH			β frul		
	Frutose (mM)	Glicose (mM)	Tris (mM)	Frutose (mM)	Glicose (mM)	Tris (mM)
RAF	10 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 0,5	12 $\pm$ 0,8	10 $\pm$ 0,7	28 $\pm$ 0,5
SAC	18 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,8	8 $\pm$ 0,2	8 $\pm$ 0,6	8 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 0,4

A β fruH é mais inibida do que a β frul pelo Tris, tanto para RAF como para SAC. Da mesma forma, na presença de RAF, a frutose e a glicose inibem mais a β fruH do que a β frul. Por outro lado, observa-se o inverso na presença de SAC e desses inibidores (Tabela 9).

Os experimentos de inibição das β -frutosidases dos diferentes sistemas de *Lonomia obliqua* demonstraram que o Tris é um inibidor não competitivo do tipo misto (Figura 37).

Figura 37 - Inibição da atividade de β -fructosidase por Tris: (A) β fruH com RAF ($\blacklozenge$) controle, ($\blacksquare$) 2,5 mM de inibidor, ($\blacktriangle$) 5 mM de inibidor, ($\times$) 7,5 mM de inibidor, ($\ast$) 10 mM de inibidor; ($\bullet$) 15 mM de inibidor; (B) β fruH com SAC ($\blacklozenge$) controle, ($\blacksquare$) 2,5 mM de inibidor, ($\blacktriangle$) 5 mM de inibidor, ($\times$) 7,5 mM de inibidor, ($\ast$) 11 mM de inibidor; (C) β frul com RAF ($\blacklozenge$) controle, ($\blacksquare$) 10 mM de inibidor, ($\blacktriangle$) 20 mM de inibidor, ($\times$) 27 mM de inibidor, ($\bullet$) 34 mM de inibidor, ($\bullet$) 40 mM de inibidor; (D) β frul com SAC ($\blacklozenge$) controle, ($\blacksquare$) 5 mM de inibidor, ($\blacktriangle$) 10 mM de inibidor, ($\times$) 20 mM de inibidor, ($\ast$) 40 mM de inibidor.

Os experimentos de inibição da β fruH e β frul com Tris contra RAF apresentou o valor do $K_i = 1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ e $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente e contra SAC apresentou o valor do $K_i = 2,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e $1,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 37).

4.4.6 Análise do proteômica e do transcriptoma para as sequências de β -fructosidase

As análises dos dados do transcriptoma indicaram a presença de dois transcritos completos e distintos que codificam as β -fructosidasas em *Lonomia obliqua*. O alinhamento dessas sequências com as sequências dessa enzima em *Bifidobacterium longum* (BM), *Arabidopsis thaliana* (AT), *Bacillus subtilis* (BS), *Thermotoga maritima* (TM), *Daucus carota* (DC), *Operophtera brumata* (OB), *Manduca sexta* (MS) foi realizado a fim de compará-las com os diferentes resíduos envolvidos na catálise e os sítios de ligação a íons (Figura 38).

	10	20	30	40	50
BL	-----	--MTDFTPET	PVLTPIRDHA	AELAKAEAG-	-----VAE
AT	---MTKEVCS	NIG-----LW	LLLTLLIGNY	VVNLEASHHV	YKRLTQSTNT
BS	-----	--MKKRLIQV	MIMFTLLLT	AFSADAADS-	-----
TM	-----	-----	-----	-----	-----
DC	MGVTIRNRNY	DHGSLPFLQS	LLAILLVTTT	TLHINGVEAF	HEIHYNLQSV
OB	-----	---MALRSLV	ILLCVFAAAQ	PKILKQSSYA	KEELEQYIAN
MS	-----	--MAAWISSL	LFLCVIASVH	LKYLSEDEDA	KRELAEYIQE
βFru1	-----	--MADVITTL	VFLCAIALSH	TKTLR-NNNA	ERDLEEYITA
βFru2	-----	--MKLIFTLN	LFTLCLCSCE	ACVKR-----	-----
	60	70	80	90	100
BL	MAAKRNNRWY	PKYHIASNGG	WINDPNGLCF	YKGRWHVIFYQ	LHPYGT-QWG
AT	KSPSVNQPYR	TGFHFQPPKN	WMNDPNGPMI	YKGIYHLIFYQ	WNPKGAVWG
BS	--SYDDEDYR	PQYHFTPEAN	WMNDPNGMVY	YAGEYHLIFYQ	YHPYGL-QWG
TM	-----MFK	PNYHFFPITG	WMNDPNGLIF	WKGKYHMFYQ	YNPRKP-EWG
DC	GAENVKQVHR	TGYHFQPKQN	WINDPNGPMY	YKGVYHLIFYQ	WNPKGAVWG
OB	TRPELNLRYR	LHYHVAPPVG	WMNDPNGFSY	YKGEYHLIFYQ	FYPYDS-VWG
MS	TKKSINPRWR	LHYHVIAPPV	WMNDPNGFSY	YKGEYHLFFQ	YYPYDS-VWG
βFru1	KQTEINPRYR	LHYHIAPPVG	WMNDPNGFSY	FKGEYHMFYQ	FYPYDS-VWG
βFru2	-----RYY	PRYHLAPPCG	WMNDPNGLIY	FNGEYHLIFYQ	HNPVTSQDPG
	110	120	130	140	150
BL	PMHWGHVSST	DMLNWKREPI	MFAPSLEQEK	DGVFSGSAVI	DDNGDLRFYY
AT	NIVWAHSTST	DLINWDPHPP	AIFPSAPFDI	NGCWSGSATI	LPNGKPVILY
BS	PMHWGHAVSK	DLVTWEHLPV	ALYPDE---K	GTIFSGSAVV	DKNNTSGFQT
TM	NICWGHAVSD	DLVHWRHLPV	ALYPDD--ET	HGVFSGSAVE	K-DGKMFLVY
DC	NIVWAHSVST	DLINWTPLEP	AIFPSKPFDK	YGCRSGSATI	LPGNKPVILY
OB	PMHWGHSSSP	DLVNWKTLPT	ALLPDQ----	EQCFSGSAIV	D-GDTMILMY
MS	PMHWGHVSVP	NLVDWRELPT	ALAPDE----	EMCFSGSALV	D-GDKLVLMY
βFru1	PMHWGHVVSP	NLVDWNQLPT	ALVPDE----	EMCFSGSAIV	D-GDYLVLMY
βFru2	IAHWGNAVSS	DLFCWKHLPI	ALYPDEPYDR	TGAFSGSAIE	D-NGEINIFY
	160	170	180	190	200
BL	TGHRWA-NGH	DNTGGDWQVQ	MTALPDNDEL	TSATKQGMII	DC-PTDKVDH
AT	TGID---PKN	QQVQNIAEPK	NLSDPYLREW	KKSPNLPLMA	PDAVNGINAS
BS	GKEKPLVAIY	TQDREGHQVQ	SIAYSNDKGR	TWTKYAGNPV	IP---NPGKK
TM	TYRDP-THN	KGEK---ETQ	CVAMSE-NGL	DFVKYDGNPV	ISKPPPEGTH
DC	TGIVEGPPKN	VQVQNYAIPA	NLSDPYLRKW	IKPDNNPLVV	AN--NGENAT
OB	TGHEIT-DKE	PYYN---ETQ	FLAFSD-DGV	AFTKYAGNPV	LP-AAPNGSP
MS	TGRLNT-DTD	PFYN---ETQ	YLAUSD-DGV	NFYKYEGNPV	LA-RTPDGAY
βFru1	TAHIIT-DTD	PFFN---QTQ	YLAKSD-DGV	EFVKYEGNPV	LP-SAPNGSP
βFru2	TGNVNT-SDS	LSKR---QYQ	ALATST-DGI	NVTKYSDNPV	II-AEEY-QP
	210	220	230	240	250
BL	HYRDPKVWKT	G--DTWYMTF	G-VSSADKRG	QMWLFSSKDM	VRWEYERVLF
AT	SFRDPTTAWL	GQDKKWRVVI	G--SKIHRRG	LAITYTSKDF	LKWEKSPEPL
BS	DFRDPKVFWY	EKEKKWVMVL	A-----AGD	RILIYTSKNL	KQWTYASEFG
TM	AFRDPKVNRS	N--GEWRMVL	G-SGKDEKIG	RVLLYTSDDL	FHWKYEGVIF
DC	AFRDPPTAWL	DKSGHWKMLV	G--SKRNRRG	IAYLYRSKDF	IKWTKAKHIP
OB	DFRDPKVWKH	G--KHVYVVL	G-SKTDDNRG	RVLLYRSFDL	IEWEFLRVLG
MS	DFRDPKIWKY	G--DYWYVVI	G-SSTHDARG	RVLLYRSQNL	YDWEFLTVLG
βFru1	DFRDPKIWRY	G--DHWYVVI	G-SKTADERG	RILLYRSLDM	ISWEFLNILG
βFru2	NIRDPKVWKH	G--DTYYMVL	GNSFKNNTLG	RVLLFASKNR	IDWEKVSTLG

	260	270	280	290	300
BL	QHPDPDV FML	ECPDFFP IKD	KDGNEKVVIG	FSAMGSKPSG	FMNRNVSNAG
AT	HYDDG-SGMW	ECPDFFPVTR	FGSNGVETSS	FGEPNEILKH	VLKISLDDTK
BS	QDQGS HGGVW	ECPDFLFELPV	D-----GNP	NQKKWVMQVS	VGNGAVS GGS
TM	EDETT--KEI	ECPDLVRIGE	-----KDILI	YS-----	--ITSTNSVL
DC	HSQAN-TGMW	ECPDFFPVSL	KGLNGLDTSV	TGES---VKH	VLKVS L DLTR
OB	ESTGDLGYMW	ECPDFFELGG	-----KHVLL	WSPQGM EPNG	DRYKNLHQ TG
MS	ESNGELGYMW	ECPDFFELDG	-----KYILL	MSPQGLEPQG	DRYKNTHQ TG
βFru1	ESEGDMGYMW	ECPDFFELNG	-----KFILL	FSPQGM EPRE	DRYKNTHQ TG
βFru2	ESDGFLGYMW	ECPDFFELNG	-----YYILL	FSPQGMKAQG	DKYRNLYQCG
	310	320	330	340	350
BL	---YMIGTWE	PG-GEFKPET	EFRLWDCG--	---HNYYP AQ	S---FNVDG-
AT	HDYYTIGTYD	RVKDKFVPDN	GFKMDGTAPR	YDYGKY YASK	TF--FDSA KN
BS	GMQYFVGDFD	GTHFKNENPP	NKVLWTDYG-	---RDFYAAV	SWSDIPSTDS
TM	---FSMGELK	EGKLNVE---	KRGLLDHG--	---TDFYAAQ	T---FFGTD-
DC	YEYYTVGTYL	TDKDRYIPDN	TSVDGWAGLR	YDYGNFYASK	TF--FDPSKN
OB	---FIIGNFN	YNNFEFVQET	KFQELDYG--	---HDFYASQ	T---MEKDG-
MS	---YIIGSFN	YETFEFVPEV	DFQELDFG--	---HDFYATQ	T---LDADG-
βFru1	---YYIGDFN	YDTFEFVSDL	EFQELDYG--	---HDFYATQ	T---NEFDG-
βFru2	---YIVGNFS	YDTLKF TPLT	KFKELDHG--	---RHFYASQ	TT--LDSRG-
	360	370	380	390	400
BL	RQIVYGWMS P	FVQP--IPME	DDGWC GQLTL	PREITLGDDG	---DVVTAPV
AT	RRILWGW TNE	SSSV--EDDV	EKGWSGIQTI	PRKIWLDRSG	K--QLIQWPV
BS	RRLWLGWMSN	WQYAN--DVP	TSPWRSATSI	PRELKLKAFT	EGVRVVQTPV
TM	RVVVGWLQS	WLRTGLYPTK	REGWNGVMSL	PRELYVENN-	---ELKV KPV
DC	RRILWGWANE	SDST--AHDV	AKGWAGIQLI	PRTLWLDP SG	K--QLMQWPI
OB	KRYVVAWFNM	WEVP--HPEE	VDGWAGAMTI	IRELVLVGD-	---RVLQKPL
MS	KRIVAGWFSM	WELP--HPED	VDGWAGAITI	MRELKLSGN-	---RL LQQPL
βFru1	KRVVVGWFGM	WDVP--HPED	EDGWAGALTI	VRELDLVGN-	---RILMKPI
βFru2	RRIMFAWMDM	WGDV--LPER	NDGWTGQMTL	PRQLLLSSNL	---EIIQKPV
	410	420	430	440	450
BL	AEMEGLREDT	LDHGSVTLDM	DGEQIIADDA	EAVEIEMTID	LAASTAER--
AT	REVERLR TKQ	VKNLRNKVLK	SGSRLEVYGV	TAAQADVEVL	FKVRDLEKAD
BS	KELETIRGTS	KKWKNLTISP	ASHN-----V	LAGQSGDAYE	INAEFKVS--
TM	DELLALRK RK	VFETAKSGTF	L-----	-LDVKENSYE	IVCEFSGE--
DC	EELETLRGSK	VKFSRKQDLS	KGILVEVKGI	TAAQADVEVT	FSFKSLAKRE
OB	DKMISLRDES	VINGQVDENQ	V-----I	ELGH-TGEII	ISGDLEKK--
MS	DEMLSLRNGS	VHNGSFNKDE	S-----L	VFEK-TGELI	INGDLEQK--
βFru1	DEIKQLRLDQ	VLLGDLNTNQ	V-----I	ELEQ-TGEII	INGDLEQN--
βFru2	KEVDGIIVKK	LHSGKAKAGA	S-----V	QLEDNAGRVQ	VRGGNF GD--
	460	470	480	490	500
BL	-----	-----	-----	-AGLKI HATE	DGAYTYV---
AT	VIEPSWT--D	PQLICSKMN V	SVKSGLG PFG	LMVLASKNLE	EYTSVYFRIF
BS	-----	-----	-----PGS	AAEFGFKVRT	GENQFTKVG-
TM	-----	-----	-----	-IELRMGNES	EEVVITK---
DC	PFDPKWLEYD	AEKICSLKGS	TVQGGVG PFG	LLTLASEKLE	EYTPVFFRVF
OB	-----	-----	-----	-IELLVEGRN	GGGQALL---
MS	-----	-----	-----	-IELEIAGTN	GGNNIWI---
βFru1	-----	-----	-----	-IELLITGEQ	GGDEIRI---
βFru2	-----	-----	-----	-FQVGIESSN	KTSDVII---
	510	520	530	540	550
BL	-----AYD	GQIGRVV VDR	QAMANGDRGY	RAAPLTDAEL	ASGKLDLRVF
AT	KARQNSNKYV	VLMCSDQSRS	SLKEDNDKTT	YGAFVDIN--	PHQPLSLRAL
BS	-----YDRRN	AKLFVDRSES	GNDTFNPAFN	TGKETAPLKP	VNGKVKLRI F
TM	-----SRD	ELIVDTTRSG	VSGGEVRKST	VED-----	-EATNRIRAF
DC	KAQ---NTHK	VLMCSDATRS	SLKEGLYRPS	FAGFVDVDLA	TDKKISLRSL
OB	-----RWD	PEVGKVV VDR	AG--DVRQVE	WSP-----	-IGSHSWRLF
MS	-----RWE	PEVKKVV VDR	GG--DVRQVE	WSP-----	-IGSRSWRLF
βFru1	-----KWD	PDVRKVV VDR	LG--DIRQVE	WSP-----	-LGSETWQMF
βFru2	-----SYN	FQQGHVTVYQ	DGQTN SRRTK	WRP-----	-IGKLFWTIY

		560	570	580	590	600
BL	VDRGSVEVYV	NGGHQVLSSY	SYAS-----EG	PRAIKLVAES	GSLKVDLKL	
AT	IDHSVVESFG	GKGRACITSR	VYPKLAIGKS	SHLFAFNIGY	QSVLDVNLNA	
BS	VDRSSVEVFG	NDGKQVITDI	ILPD-----RS	SKGLELYAAN	GGVKVKSITI	
TM	LDSCSVEFFF	N-DSIAFSFR	IHP-----EN	VYNILS-VKS	NQVKLEVFEL	
DC	IDNSVVESFG	AKGKTCISSR	VYPTLAVYEN	AHLYVFNNGS	ETITVENLDA	
OB	LDASSLELFC	GEGEVVFSSR	VYP-----DG	EWNLTN-LSP	QTLNVEAYKL	
MS	LDASSLELFC	GEGEVVFSTR	FYP-----DG	DLRVNS-FSD	QSLNVEAHKL	
βFru1	LDASSLELFC	GEGEVVLSSR	VYP-----IG	EWRTN-LST	QTLHAEVYKL	
βFru2	IDASSIEMFC	GSGEVTFSNR	YFP-----EG	PIVVRIGNCS	DAEFTVYTI	
		610	620	630	640	650
BL	HHMKSIGLE-	-----	-----	-----	-----	-----
AT	WSMNSAQIS-	-----	-----	-----	-----	-----
BS	HPLKKVWGTT	PFMSNMTGWT	TVNGTWADTI	EGKQGRSDGD	SFILSSASGS	
TM	ENIWL-----	-----	-----	-----	-----	-----
DC	WSMKKPLRMN	-----	-----	-----	-----	-----
OB	KRSVPL----	-----	-----	-----	-----	-----
MS	RRSVPV----	-----	-----	-----	-----	-----
βFru1	RRSVPE----	-----	-----	-----	-----	-----
βFru2	NPTVKHPVFE	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 38 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de β-fructosidases de *Bifidobacterium longum* (BM), *Arabidopsis thaliana* (AT), *Bacillus subtilis* (BS), *Thermotoga maritima* (TM), *Daucus carota* (DC), *Operophtera brumata* (OB), *Manduca sexta* (MS), *Lonomia obliqua* (βfru1 e βfru2). Seguindo a numeração de *Bifidobacterium longum* (BL), os resíduos destacados em rosa são os nucleófilos catalíticos e os destacados em verde indicam os resíduos envolvidos na catálise ácido-base.

Os alinhamentos das sequências de β-fructosidases de *Lonomia obliqua* comparando com as sequências dessa enzima de diferentes organismos indicam que os resíduos são conservados tanto no nucleófilo como nos resíduos relacionados a catálise ácido-base (Figura 38). Posteriormente, o reunido das frações 19 e 20 (βfru1) e as frações 14 à 18 (βfru2) da HiTrap Fenil FF das amostras de βfruH e a βfrul foram submetidas as análises proteômicas (Figura 39).

Figura 39 - Sequência de β -fructosidase indetificada no transcriptoma de lagartas inteiras de *Lonomia obliqua*. A sequência completa foi identificada no transcriptoma e as sequências grifadas em azul e destacadas em cinza são os peptídeos identificados no proteoma. Análise por espectrometria de massas e identificação de peptídeos a partir de amostras de: (A) beta-fructosidase – β fru1 no intestino médio, (B) beta-fructosidase – β fru2 no intestino médio, (C) beta-fructosidase – β fru1 na hemolinfa de *Lonomia obliqua*.

A identificação de dois transcritos que codificam a β -fructosidase no transcriptoma do corpo da lagarta foram confirmadas com as sequências peptídicas obtidas na análise proteômica das proteínas presentes nas frações enriquecidas dessas enzimas provenientes do intestino médio e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. A análise proteômica permitiu identificar no intestino: 12 peptídeos da β fru1, 1 da β fru2 e 1 peptídeo da β fru1 na hemolinfa dessa lagarta (Figura 39). O gene da β fru1 e β fru2 apresentam um frame de leitura de 1458 e 1440 oligonucleotídeos e a massa molecular foi estimada em 56,31 kDa e 54,81 kDa e o pI estimado em 4,48 e 6,28; respectivamente.

4.4.7 Análise da expressão das β -fructosidases em diferentes tecidos de *Lonomia obliqua* por RT-PCR

Para avaliar a expressão e localização dos transcritos da sequência de β -fructosidase foi necessário desenhar os iniciadores (Tabela 3) e analisar por meio de RT-PCR semi-quantitativa os diferentes tecidos de *Lonomia obliqua* (Figura 40).

Figura 40 - Gel de agarose 1% do produto de PCR utilizando os iniciadores específicos para amplificação de: β fru1, β fru2 e actina (gene endógeno) a partir do cDNA de: carcaça (C), hemolinfa (H), intestino médio total (IT), intestino médio anterior (IA), intestino médio posterior (IP) e túbulos de Malpighi (TM) de *Lonomia obliqua*. Quantidades iguais de (5 μ g) de RNA extraídos desses tecidos, tratados com DNase e posteriormente utilizados como molde para a reação da transcriptase reversa (RT). O padrão utilizado foi GeneRuler (M) 1 kb DNA Ladder.

Foi observada amplificação da β fru1 no intestino médio total (IT) e nos túbulos de Malpighi (TM). Um estudo mais detalhado mostra que a amplificação ocorre tanto na região anterior do intestino médio quanto na região posterior do intestino médio. Entretanto, aparentemente há uma maior amplificação na região anterior (IA). Por outro lado, a β fru2 foi transcrita somente nos túbulos de Malpighi (TM). Nenhuma dessas sequências foram amplificadas pela carcaça (C) e hemolinfa (H) de *Lonomia obliqua* (Figura 40).

4.5 Presença de α -fucosidase na hemolinfa e no intestino médio de *Lonomia obliqua*

A atividade de α -fucosidase foi detectada na hemolinfa e nas amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos das lagartas de *Lonomia obliqua* alimentadas nas diferentes dietas (Figura 41).

Figura 41 - Ensaios de atividade de α -fucosidase utilizando MUFUC como substrato em amostras de porções distintas do intestino e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em pelo menos três diferentes lotes de hemolinfa (H) e homogeneizados das amostras MES1, MES2, MES3 e MP dos intestinos das diferentes dietas de *Lonomia obliqua*.

Nas dietas de *Eriobotrya japonica* e *Psidium guajava* a atividade absoluta de α -fucosidase é maior nas amostras solúveis de MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* em relação às demais amostras intestinais. Porém, nas dietas com folhas de *Alchornea ssp* e *Mangifera indica*, a maior atividade absoluta dessa enzima está presente nas amostras do conteúdo intestinal. Apesar disso, a maior atividade específica é encontrada em MES2 para lagartas alimentadas em todas as dietas. As atividades de α -fucosidases da hemolinfa das lagartas alimentadas com as diferentes espécies de folhas não apresentaram variações das medidas enzimáticas, absolutas e específicas. Portanto, perfis distintos das variações enzimáticas somente ocorreram nas amostras intestinais (Figura 41).

Sob as mesmas condições usadas nos ensaios da Figura 41 não foi observada atividade de α -fucosidase nos extratos foliares de *Alchornea ssp*, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*. Dessa forma, as α -

fucosidases descritas na Figura 41 são produzidas no sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*.

Após a detecção da α -fucosidase em *Lonomia obliqua*, a etapa posterior se concentrou na caracterização dessa enzima na hemolinfa e também no intestino dessa lagarta. Para isso, amostras solúveis do intestino (MES1) provenientes das lagartas que se alimentaram com folhas de *Psidium guajava* foram selecionadas, pois essas amostras apresentavam a maior atividade absoluta dessa enzima em relação às outras dietas.

4.5.1 Determinação do pH ótimo da α -fucosidase presente na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*

Foram realizados os ensaios do efeito do pH sobre as atividades de α -fucosidases da hemolinfa (α fucH) e das amostras MES1 dos intestinos (α fucI) das lagartas alimentadas nas diferentes dietas (Figura 42).

Figura 42 - Efeito do pH sobre a atividade α -fucosidase das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchornea ssp* (A), *Eriobotrya japonica* (B), *Mangifera indica* (C), *Psidium guajava* (D) e das amostras de hemolinfa (E).

A α fucI nas diferentes dietas não demonstraram nenhuma alteração nos valores de pHs ótimos, sendo indentificado um pH ótimo de 5,1. A atividade máxima de α fuchH foi observada em pH 5,3. Entretanto, a comparação entre os perfis do efeito do pH para α fuchH e a α fucI são bastante distintos, sendo observado um pico mais largo para a atividade de α -fucosidase em hemolinfa (Figura 42). Em todas as dietas, nas α -fucosidases intestinais dessa lagarta nota-se a presença de um pico minoritário no pH 8,8 que pode ser atribuído a α -glucosidase (Figura 42), pois as α -glucosidases, além das α -fucosidases, também poderiam hidrolisar o substrato MUFUC (Tabela 1).

4.5.2 Separação cromatográfica e géis nativos das α -glucosidases e das α -fucosidases das amostras intestinais (MES1) e da hemolinfa de *Lonomia obliqua*

Além das α -fucosidases, as α -glucosidases também poderiam hidrolisar o substrato MUFUC. Diante disso separações cromatográficas (Figura 43) e géis nativos (Figura 44) foram realizados para comprovar a presença da α fucH e α fucL de *Lonomia obliqua*.

Figura 43 - Separação cromatográfica das atividades da α -fucosidase e da α -glucosidase em coluna HiTrap Q FFa partir das amostras da hemolinfa (-□-) e das amostras da porção solúvel do epitélio do intestino MES1 (-■-) de *Lonomia obliqua*. Gradiente salino em degraus crescente (--).

Observa-se que nas frações 5 e 6 da HiTrap Q FF a partir de amostras da hemolinfa e da porção solúvel do epitélio do intestino médio (MES1) de lagartas de *Lonomia obliqua* somente o substrato MUFUC foi hidrolisado indicando que nestas frações temos atividade exclusiva de α -fucosidase (Figura 43). Para o isolamento da α fucH foi necessário mais um passo cromatográfico para o enriquecimento dessa enzima. Então, as frações 5 e 6 da HiTrap Q foram reunidas (Figuras 43) e aplicadas na coluna hidrofóbica HiTrap Fenil FF (Figura 44).

Figura 44 - Separação cromatográfica das glicosidases na coluna HiTrap Fenil FF da hemolinfa (-□-) de *Lonomia obliqua* e gradiente salino em degraus decrescentes (--).

Todas as frações da cromatografia da HiTrap Fenil FF foram testadas contra: NPAGLU e MUFUC, porém não houve atividade de α -glucosidase, somente de α -fucosidase nas amostras da hemolinfa. Esse último passo de cromatografia revelou a presença de quatro isoformas dessa enzima e para as etapas de caracterização as frações 15 e 16 foram reunidas (Figura 44).

A presença de uma fucosidase distinta das α -glucosidases também foi corroborada nas separações em eletroforese em condições nativas (Figura 45).

Figura 45 - Atividade sobre MUAGLU (1 e 3) e MUFUC (2 e 4) após separação em eletroforese em condições nativas das amostras: hemolinfa (H) e da porção solúvel do homogenizado dos epitélios dos intestinos médios (MES1) de *Lonomia obliqua* provenientes das dietas: *Eriobotrya japonica* (A), *Psidium guajava* (G), *Mangifera indica* (M) e *Alchornea* ssp. (T). Todas as amostras continham valores similares de quantidade de proteínas.

Nos géis nativos, as migrações relativas das α -fucosidases diferem das α -glucosidases tanto nas amostras de hemolinfa como das preparações específicas de

intestino (MES1) provenientes das lagartas alimentadas nas diferentes dietas. Na hemolinfa a presença da α -fucosidase e da α -glucosidase é evidenciada por uma banda, enquanto nas amostras MES1 dos intestinos das diferentes dietas as α -glucosidases apresentam pelo menos 2 bandas em relação a única banda das α -fucosidases (Figura 45).

Amostras da hemolinfa bruta e as frações 5 e 6 da HiTrap Q das amostras do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua* (Figura 43) foram aplicadas na coluna de gel filtração Superdex G-75 para estimar as massas moleculares das α -fucosidases nos dois sistemas (Figura 46).

Figura 46: Separação em filtração em gel coluna Superdex G- 75 a partir de amostra bruta da hemolinfa (-□-) e de reunidos ativos após cromatografia em coluna de troca iônica (Figura 43) da porção solúvel do epitélio do intestino médio (MES1) (-■-) de *Lonomia obliqua*. (A) Atividades de α -glucosidases utilizando NPAGLU como substrato e (B) atividade de α -fucosidases utilizando MUFUC como substrato. Após os ensaios de atividades os volumes de retenção das enzimas em estudos foram comparados com a curva padrão para as determinações de suas massas moleculares. Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

Na hemolinfa e no intestino (MES1) da *Lonomia obliqua* as α -glucosidases apresentaram uma massa molecular de: 228 kDa e 87 kDa, enquanto as α -fuch apresentaram 228 kDa e 141 kDa e a α -fucI somente 141 kDa (Figura 46).

4.5.3 Efeitos de diferentes concentrações do substrato MUFUC sobre a atividade da α -fucosidase da hemolinfa (α -fuch) e do intestino (MES1) (α -fucI) de *Lonomia obliqua*

O efeito de diferentes concentrações de substrato MUFUC sobre a atividade α -fuch e α -fucI de *Lonomia obliqua* foi avaliado (Figura 47).

Figura 47: Efeito da concentração de MUFUC sobre a atividade do reunido ativo da hemolinfa (α fuchH) (A) e do intestino (α fucl) (B) de *Lonomia obliqua* após fracionamento em cromatografia de troca aniônica na coluna HiTrap Q FF.

Os valores de afinidades das α fuchH e α fucl de *Lonomia obliqua* utilizando MUFUC como substrato foram de: $K_m = 64,0 \pm 8,5 \mu\text{M}$ e $K_m = 50,5 \pm 7,1 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 47).

4.5.4 Efeito de fucose e fuconojirimicina sobre a atividade de α -fucosidase da hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua*

Experimentos preliminares de inibição demonstraram que a fucose e a fuconojirimicina são inibidores da α fuchH e α fucl (Figura 48).

Figura 48 - Inibição da α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconojirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de *Lonomia obliqua*: pela fucose (C) e pela fuconojirimicina (D).

Os valores de IC 50% da α fuch e α fucI foram $495 \pm 1,0 \mu\text{M}$ e $551 \pm 7,0 \mu\text{M}$ para a fucose e sobre as atividades de α fuch e α fucI foram $90 \pm 1 \text{ nM}$ e $50 \pm 1 \text{ nM}$ para a fuconoijirimicina, respectivamente (Figura 48).

Os experimentos de inibição demonstraram que a fucose é um inibidor competitivo em baixas concentrações, mas comporta-se em altas concentrações como um inibidor não competitivo para a α fuch e α fucI de *Lonomia obliqua* e a deoxifuconoijirimicina são inibidores não competitivos das α -fucosidases nos dois sistemas dessa lagarta (Figura 49).

Figura 49 - Determinação do modo de inibição α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconoijirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de *Lonomia obliqua*: pela fucose (C) e pela fuconoijirimicina (D).

Figura 50 - Inibição da α -fucosidase da hemolinfa: pela fucose (A) e pela fuconojirimicina (B) e α -fucosidase do intestino de *Lonomia obliqua*: pela fucose (C) e pela fuconojirimicina (D).

Os experimentos de inibição da α fuchH e da α fucI com fucose contra MUFUC apresentou o valor do $K_i = 86 \mu M$ e $224 \mu M$, respectivamente e contra deoxifuconojirimicina apresentou o valor de $0,06 \mu M$ e $0,09 \mu M$, respectivamente (Figura 50).

4.5.5 Análise proteômica e do transcriptoma para as sequências de α - fucosidase

As análises dos dados do transcriptoma indicaram a presença de um transcrito completo que codifica a α -fucosidase em *Lonomia obliqua*. O alinhamento dessa sequência (α FULO) com a sequência dessa enzima em: *Thermotoga maritima* (TM), *Homo sapiens* (HS), *Drosophila melanogaster* (DM), *Mus musculus* (MM), *Spodoptera litura* (SL), *Bombxy mori* (BM) foi realizado a fim de compará-las para verificar os resíduos envolvidos na catálise (Figura 51).

	10	20	30	40	50
TM	-----	-----	-----MI	SMKP-----	-----RYKP
HS	MRAPGMRSRP	AGPALLLLLL	FLGAAESVRR	AQPP-----	-----RRYTP
DM	-----MAIS	AWMPLLVALI	VVWISAAEVD	AQVPGP----	-----RTRYQP
MM	-----	--MLLLLLLL	LVAAAQAV--	ALAP-----	-----RRFTP
SL	-----MR	LLIFSIFICL	AYAKIREISV	FKSENNVLDT	GFNDGKGYRP
BM	-----MK	SFFLVFLFGF	VNGAIHNRRD	HSSHNKILNK	-----RYSF
αFULO	-----MR	IYILLTFACL	VNASKYQL--	FQDENDLIDS	-ESEYKKFRP
	60	70	80	90	100
TM	DWESLREHTV	PKWFDKAKFG	IFIHWGIYSV	PGWATPTGEL	GKVPMDAWFF
HS	DWPSLDSRPL	PAWFDEAKFG	VFIHWGVFSV	PAWGS-----	-----EWFV
DM	NWASLDQRPL	PQWYDDAKVG	IFLHYGVYSV	PSFGS-----	-----EWFV
MM	DWQSLDSRPL	PSWFDEAKFG	VFVHWGVFSV	PAWGS-----	-----EWFV
SL	NWRDLDKRPL	PEWYDRAKIG	IFLHWGVYAV	PSFGS-----	-----EWFV
BM	DWNDLDTRPL	PEWYDKAKIG	IFLHWGVYSV	PGFGS-----	-----EWFV
αFULO	DWKDLDTKRL	PAWYDKAKIG	IFLHWGVYCV	PSFGS-----	-----EWFV
	110	120	130	140	150
TM	QNPYAEWYEN	SLRIKESPTW	EYHVKTYGEN	FEYEKFADLF	TAEKWDPQEW
HS	WHWQGEGRPQ	YQRFMR----	----DNYPPG	FSYADFGPQF	TARFFHPEEW
DM	TNWKNLRNPE	YVQFMQ----	----RNYKPD	FTYQEFASQF	TAEELFNATKW
MM	WHWQGDRMPA	YQRFMT----	----ENYPPG	FSYADFAPQF	TARFFHDPDQW
SL	MNWK--TNVTK	YVNFMD----	----KNYPPN	FTYQQFAPMF	TAEFFDPAAW
BM	SNWK--GGNRQ	CIDFMT----	----KNYPPG	FTYQEFAPAF	KAFFFDPKDW
αFULO	SNWE--GGSAAE	CKNFMD----	----KNYRPG	FTYQEFAPMF	TAEFFDPAQW
	160	170	180	190	200
TM	ADLFKKAGAK	YVIPTTKHHD	GFCLWG--TKY	TDFNSVKRGP	KRDLVGDLAK
HS	ADLFQAAGAK	YVVLTTKHHE	GFTNWPSPV	WNWNSKDVGP	HRDLVGELGT
DM	ALLFKDSGAR	YVVLTSKHHD	GFTLWPSKNS	YGNWNSMDVGP	KRDLVKGELAA
MM	AELFQAAGAK	YVVLTTKHHE	GFTNWPSPV	WNWNSKDVGP	HRDLVGELGA
SL	AQLFAEAGAK	YVVLTSKHHE	GFTLFPSKRS	FSWNAVVDVGP	KRDLVGELSA
BM	ADLFVKAGAK	YVVLTSKHHE	GFTLFPSKRS	FSWNSVEVGP	KRDLVGDLAK
αFULO	AQLFAKSGAN	YIVLTSKHHE	GFTLFPSKRS	YSWNSVEVGP	KRDLVGELAD
	210	220	230	240	250
TM	AVREAG--LRF	GVYYSGGGLDW	RFTTEPIRYP	EDLSYIRPNT	YEYADYAYKQ
HS	ALRKRN--IRY	GLYHS-----	LLEWFHPLYL	LDKKNNGFKTQ	HFVSAKTMPE
DM	AIRKESDLRF	GLYYS-----	LFEFWNPPLWT	DDKLHLLMQQ	HFVERKVRPE
MM	AVRKRN--IRY	GLYHS-----	LLEWFHPLYL	LDKKNNGFKTQ	HFVRAKTMPE
SL	AVRKRK--LKF	GVYHS-----	LYEWFNPIYL	QDRNASFETH	TFVDTKLWPD
BM	AVRNTS--LKF	GVYHS-----	LYEWFNPIYE	EDKRKAFKTQ	TYVDTKLWPD
αFULO	AVRNEG--MKF	GVYHS-----	LYEWFNPIYT	GDRDLSFLTQ	TYVDTKLWPD
	260	270	280	290	300
TM	VMELVDLYLP	DVLVNDMGWP	EKGKED--LKY	LFAYYYNKHP	EG---SVNDR
HS	LYDLVNSYKP	DLIWSGDGEWE	CPDTYWNSTN	FLSWLYNDSP	VKDEVVVNDR
DM	QMELVQQYLP	EIIWSGDGEWE	APAKYWRSEE	FIWLYNDSP	VRDVTVTNDR
MM	LYDLVNSYKP	DLIWSGDGEWE	CPDTYWNSTS	FLAWLYNDSP	VKDEVIVNDR
SL	LKQIIHDYKP	SVIWSGDGEWE	APDDYWRSTD	LLAWLYNNSP	VREEVVVNDR
BM	IKQIVHDYKP	SVIWSGDGEWE	ANDTYWRSTE	LLAWLYNDSP	VKDEVVVNDR
αFULO	IKQLVNDYKP	SVLWSGDGEWE	AHDTYWKSTE	LLAWLYNDSP	VKDEVIVNDR
	310	320	330	340	350
TM	WGVPHWDFKT	AEYHVN---Y	PGDLPGYKWE	FTRGIG--LSF	GYNRNEGPEH
HS	WGQNCSCHHG	GYNCEDKFK	PQSLPDHKWE	MCTSIDKFSW	GYRRDMALSD
DM	WGFGTACMHG	DFYNCADRFN	PGVLQAHKWE	NAFTLDRTSW	GQRFVSLSD
MM	WGQNCSCHHG	GYNCQDKYK	PQSLPDHKWE	MCTSMDRASW	GYRKDMTMST
SL	WGKDIPGHHG	DFFNHADRFN	PGKLLDHKWE	NAFTVDKVS	GYRRNMKIGE
BM	WGIGIPGKHG	DFYNHQDRFN	PGVLLHHKWE	NAFTVDSGSW	GYRRNMQIRE
αFULO	WGIDIPGKHG	DFFNHADRFN	PGVLLDHKWE	NAFTVDGKSW	GYRRNMQISE

	360	370	380	390	400
TM	MLSVEQLVYT	LVDVVS	SKGGN	LLLN	VGPKGD
HS	VTEESEIISE	LVQTVS	LGGN	YLLN	IGPTKD
DM	FMTSKEVIKE	IITTVS	CNGN	VLIN	VGPTKF
MM	IAKENEIIEE	LVQTVS	LGGN	YLLN	IGPTKD
SL	IMSDSQLLFQ	VVSTVS	CGGN	ALIN	VGPTKE
BM	ILTIEELLQQ	IVTTVS	CGGN	ALIN	VGPTKE
αFULO	ILNTTELLKQ	VITTVS	CGGN	ALIN	VGPTKE
	410	420	430	440	450
TM	YGDAIYGTSV	WERCCA	KTED	GTEIRF	TRKC
HS	NGEAIYASKP	WRVQWE	KNTT	--SVWY	TSKG
DM	NGEGYGSVP	WIYQND	TING	--NVWY	TRQK
MM	NGEAIYASKP	WRVQSE	KNKT	--VVWY	TTKN
SL	NGEAIYDSSP	WFSQND	TVNG	--KVWY	TCTK
BM	NGEAIYSSSP	WEYQND	TLNG	--KVWY	TCSI
αFULO	NGEAIYNSSP	WIAQND	TANG	--DVWY	TCQR
	460	470	480	490	500
TM	----IFVIFL	GIP----	TGE	KIVIED	LNLS-
HS	----VYAIFL	HWP----	ENG	VLNLES	PIT-
DM	--ITIYAFVL	EYPYDT	NELD	IYPLGK	DINI
MM	----VYATFL	YWP----	ENG	IVNLKSP	KT-
SL	----IYAIAL	EWP----	KDN	WLTGLD	ITS-
BM	----IYAILL	EWP----	SDN	RLSVRS	ITN-
αFULO	----IYAMIL	KWP----	SDN	TLDIRD	VTS-
	510	520	530	540	550
TM	-SAGTVRHFL	TGERLS	SFKNV	GKN-LEI	TVP
HS	STTKITMLGI	QG-DLKW	STD	PDKGLF	ISLP
DM	QSTEVVMLGM	EDTKIK	WNAD	HNR-LHIV	FP
MM	SATKITMLGL	EG-DLSW	TQD	PLEGVL	ISLP
SL	GTYQVELLGN	KGVYLT	WKIS	NGK-VAI	QLP
BM	RYNQLEMLGN	EGTYLN	NWKIT	NGD-VEI	ELP
αFULO	GNYKVEMLGN	EGQYLN	NWIK	NGD-AEI	KLP

Figura 51 - Alinhamento utilizando o programa ClustalW das sequências de α-fucosidases de *Thermotoga maritima* (TM), *Homo sapiens* (HS), *Drosophila melanogaster* (DM), *Mus musculus* (MM), *Spodoptera litura* (SL), *Bombxy mori* (BM), *Lonomia obliqua* (αFULO) os resíduos destacados em amarelo são os nucleófilos catalíticos e os destacados em rosa indicam os resíduos relacionados a catálise ácido-base. Os resíduos destacados em verde correspondem aos bolsos hidrofóbicos, os resíduos destacados em cinza são os de interação com o substrato e os resíduos destacados em vermelho alteram o valor do pKa e participam da catálise.

Os alinhamentos das sequências de α-fucosidases de *Lonomia obliqua* comparando com as sequências dessa enzima de diferentes organismos indicam que os resíduos são conservados: no nucleófilo, em um dos bolsos hidrofóbicos e nos resíduos envolvidos com a interação com o substrato (Figura 51). Posteriormente, as frações cromatográficas enriquecidas com atividade de α-fucosidase da hemolinfa e do intestino (MES1) de *Lonomia obliqua* foram submetidas as análises proteômicas (Figura 52).

A

```

1  MRIYILLTFA CLVNASKYQL FQDENDLIDS ESEYKKFRPD WKDLDTKLP AWYDKAKIGI FLHWGVYCVF SFGSEWFWSN
81  WEGGSAECKN FMDKNYRPGF TYQEFAPMFT AEFFDPKQWA QLFAKSGANY IVLTSKHHEG FTLFPSKRSY SWNSVEVGPK
161  RDIVGELADA VRNEGMEKFGV YHSLYEFNFP IYTGDRDLSF LTQTYVDTKL WPDIKQLVND YKPSVLWSDG DWEAHDYWK
241  STELLAWLYN DSPVKDEIVV NDRWGIDIPG KHGDFFNHAD RFNPGVLLDH KWENAFITVDG KSWGYYRRNQ ISEILNITTEL
321  LKQVITTVSC GGNALINVPF TKEGTIAPIF QERLLSLGEW LAINGEAIYN SSPWIAQNDT ANGDEVWYTCQ RVNYNYDNPV
401  AKPGKSDAVN AIYAMILKWP SDNTLDIRDV TSYLHSGNYK VEMLGNEGQY LNWIKNNGDA EIKLPDKATT KSEYVWTLKF
481  SLH

```

B

```

1  MRIYILLTFA CLVNASKYQL FQDENDLIDS ESEYKKFRPD WKDLDTKLP AWYDKAKIGI FLHWGVYCVF SFGSEWFWSN
81  WEGGSAECKN FMDKNYRPGF TYQEFAPMFT AEFFDPKQWA QLFAKSGANY IVLTSKHHEG FTLFPSKRSY SWNSVEVGPK
161  RDIVGELADA VRNEGMEKFGV YHSLYEFNFP IYTGDRDLSF LTQTYVDTKL WPDIKQLVND YKPSVLWSDG DWEAHDYWK
241  STELLAWLYN DSPVKDEIVV NDRWGIDIPG KHGDFFNHAD RFNPGVLLDH KWENAFITVDG KSWGYYRRNQ ISEILNITTEL
321  LKQVITTVSC GGNALINVPF TKEGTIAPIF QERLLSLGEW LAINGEAIYN SSPWIAQNDT ANGDEVWYTCQ RVNYNYDNPV
401  AKPGKSDAVN AIYAMILKWP SDNTLDIRDV TSYLHSGNYK VEMLGNEGQY LNWIKNNGDA EIKLPDKATT KSEYVWTLKF
481  SLH

```

Figura 52 - Sequência da (A) α -fucosidase – afuch na hemolinfa, (B) α -fucosidase - afucl no intestino médio identificada no transcriptoma (Illumina) e no proteoma (*Shotgun mass spectrometry*) da hemolinfa e do intestino médio de *Lonomia obliqua*. A sequência completa foi identificada no transcriptoma e as sequências grifadas em azul e destacadas em cinza são os peptídeos identificados no proteoma.

A identificação de um transcrito que codifica a α -fucosidase no transcriptoma do corpo da lagarta foi confirmada com a sequência peptídica obtida na análise proteômica das proteínas presentes nas frações enriquecidas dessa enzima provenientes da hemolinfa e do intestino médio de *Lonomia obliqua*. A análise proteômica permitiu identificar na hemolinfa e no intestino: 1 peptídeo da afuch e afucl (Figura 52). O gene da α -fucosidase de *Lonomia obliqua* apresenta um frame de leitura de 1466 oligonucleotídeos e a massa molecular foi estimada em 55,86 kDa; o pI estimado em 5,27.

5 DISCUSSÃO

5.1 Carboidrases presentes na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*

As carboidrases das diferentes fases da vida dos insetos são extremamente necessárias para o suprimento da demanda energética, o crescimento, a longevidade e a reprodução desses organismos. Os insetos herbívoros digerem os carboidratos presentes nas plantas, especialmente o amido e os glicosídeos, através das atividades de diferentes carboidrases reduzindo-os em monômeros, como a glicose, para serem absorvidos pelo epitélio das células intestinais (SHARIFLOO et al., 2016).

A questão primordial desse trabalho era identificar em *Lonomia obliqua* as principais carboidrases que estão presentes na hemolinfa e no intestino médio. Algumas dessas enzimas no sistema digestório são bastante estudadas, porém as carboidrases presentes na hemolinfa de insetos são pouco conhecidas e caracterizadas. A descrição a seguir aborda as principais carboidrases presentes nos dois sistemas desta lagarta.

As amilases, as celulasas e as pectinases foram as principais despolimerases intestinais identificadas em *Lonomia obliqua*. Essas enzimas estão relacionadas à hidrólise de polissacarídeos e concentram-se no espaço endoperitrófico nos insetos (NAKONIECZNY; MICHALCZK; KEDZIORSKI, 2006). Isso corrobora os resultados obtidos nesse trabalho, pois essas enzimas estão mais concentradas no lúmen do sistema digestório de *Lonomia obliqua* (Figura 10). Embora as amilases de *Lonomia obliqua* concentrem-se mais nas frações do epitélio intestinal (MES1, MES2 e MES3) do que em relação a MP (Figura 10), isso pode estar correlacionado com a presença de inibidores de amilases no espaço endoperitrófico oriundos da folha das plantas o que acarretaria em medidas subestimadas no MP (FRANCO et al., 2002). Além disso, já foi descrito que os Lepidoptera apresentam formas solúveis e formas ligadas à membrana do epitélio intestinal de amilase, o que é condizente com os dados descritos neste trabalho para *Lonomia obliqua* (JORDÃO et al., 1999).

As amilases são uma das classes mais importantes das enzimas digestivas dos insetos, pois hidrolisam o amido das folhas das plantas em oligossacarídeos, que, por sua vez, são hidrolisados a glicose pelas glucosidases (KAUR; KAUR; GUPTA, 2014).

A amilase foi a única despolimerase presente na hemolinfa desta lagarta (Figura 10). A presença de despolimerases fora do sistema digestório foi descrita em outros Lepidoptera tais como: *Bombxy mori*, *Antheraea mylitta* e *Naranga aenescens* (ABRAHAM; NAGARAJU; DALTA, 1992; ASADI et al., 2010; NAGARAJU; ABRAHAM, 1995). Essas lagartas, assim como a *Lonomia obliqua*, apresentaram atividade de amilase na hemolinfa.

Até o presente momento a função fisiológica da amilase na hemolinfa de Lepidoptera não está elucidada. A hipótese mais provável é que essa enzima no sistema circulatório degrade o glicogênio do corpo gorduroso do inseto durante o período de muda (NGERNYUANG et al., 2011; WYATT, 1967).

A expressão gênica da amilase ocorreu somente no intestino de *Bombxy mori*, mas a presença dessa enzima também ocorreu na hemolinfa dessa lagarta e essas amilases apresentam comportamentos cinéticos distintos. Essas diferenças podem ser decorrentes de modificações pós traducionais (NGERNYUANG et al., 2011).

As pectinases e celulasas presentes em *Lonomia obliqua* auxiliam na hidrólise do complexo celulolítico (Figura 10). As poligalacturonases (EC 3.2.1.15) foram as únicas enzimas responsáveis pela degradação da pectina encontradas nos insetos. A atividade dessa enzima ocorre em Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera e Tricoptera (TERRA; FERREIRA, 1994). De acordo com a literatura, poucos insetos possuem as enzimas relacionadas com a degradação da pectina. Esse polímero é o componente principal das paredes celulares das plantas e sua degradação pode ser utilizada como fonte de energia para os insetos. Os Coleoptera se destacam na síntese dessas enzimas (VATANPARAST et al., 2012). Por exemplo, a hidrólise da PEC no intestino médio do besouro *Psacotha hilaris* ocorreu devido a presença de múltiplas poligalacturonases (NODA; WATANABE; SCRIVENER, 1997).

Além das pectinases, as atividades de celulasas foram identificadas em 63 insetos fitófagos de diferentes ordens, incluindo os Lepidoptera das espécies *Anisota senatoria* e *Anisota virginensis* (Saturniidae) (OPPERT et al., 2010).

Além das despolimerases, outras enzimas são responsáveis pela digestão intermediária e final das celuloses e hemiceluloses presentes nas paredes celulares das plantas como as β -glucosidase. Essa enzima foi identificada na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua* e seu papel fisiológico no intestino de Lepidoptera é

clivar dissacarídeos e oligossacarídeos a monossacarídeos para serem absorvidos (Figura 10). Essa enzima é bastante explorada na literatura, pois em insetos fitófagos são importantes não só para a compreensão da digestão, mas também no desenvolvimento de novas estratégias no controle de pragas (YU, 1989).

As β -glucosidases também podem processar a hidrólise de glicosídeos cianogênicos presentes em algumas plantas e muitos insetos processam essas moléculas afim de detoxificá-las ou utilizá-las para benefício próprio contra seus predadores (ZAGROBELNY et al., 2004; ZAGROBELNY; BAK; MOLLER, 2008). Entretanto estes glicosídeos podem atuar como inibidores da glicose-6-fosfato desidrogenase dos insetos, por exemplo. Por outro lado, os insetos evitam essa intoxicação através da perda ou baixa da atividade de β -glucosidases ou substituição das glucosidases expressas por enzimas de diferentes especificidades (GHADAMYARI; HOSSEININAVEH; SHARIFI, 2010).

De forma geral, a ordem Lepidoptera apresenta uma baixa atividade intestinal desta enzima em relação a outros insetos (FERREIRA; TORRES; TERRA, 1998). Baixas atividades específicas das β -glucosidases usando PNBGLU como substrato foram descritas nos intestinos médios de: *Chilo suppressallis* (0,003 U/mg) e *Diatrea sachharalis* (0,021 U/mg) (AZEVEDO; TERRA; FERREIRA, 2003; ZIBAE; BANDANI; RAMZI, 2009). Por outro lado, valores mais elevados desta atividade enzimática foram encontrados no intestino médio de *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri* no terceiro dia do 5º instar e posterior a esse período larval, $0,740 \pm 0,343$ U/mg e $2,607 \pm 1,227$ U/mg, respectivamente. Além disso, corroborando esse trabalho, as β -glucosidases apresentam atividades mais altas nas porções solúveis do epitélio do intestino médio do que nas amostras solúveis de conteúdo e membrana peritrófica nos dois estágios larvais dessa lagarta (NAKONIECZNY; MICHALCZK; KEDZIORSKI, 2006). Porém ainda há dúvidas se a β -glucosidase pode estar estritamente relacionada aos hábitos alimentares ou uma estratégia alimentar que permite absorver os nutrientes e os compostos secundários das ligações β -glicosídicas das folhas (FERREIRA; TORRES; TERRA, 1998; NAKONIECZNY; MICHALCZK; KEDZIORSKI, 2006). Dessa forma, os insetos desenvolveram uma estratégia eficiente para melhorar o aproveitamento dos nutrientes.

A hidrólise dos cianogênicos tóxicos pode funcionar como uma arma biológica dos insetos contra o ataque de predadores (FRANZL; ACKERMANN; NAHRSTEDT, 1989).

O transcriptoma das glândulas de defesa de *Zygaena filipendulae* revelou um transcrito de β -glucosidase (*ZfBGD1*). Através de transcriptase reversa (RT-PCR), essa sequência amplificou predominantemente no tegumento da carcaça dessa lagarta, os quais contêm as cavidades que abrigam as glândulas de defesa. Esta enzima foi clonada e expressa em células *Sf-9*. Ensaios de atividade da enzima recombinante demonstraram que a β -glucosidase hidrolisava o substrato MUBGLU, mas não hidrolisava os glicosídeos cianogênicos. A hidrólise desses compostos só ocorre quando há mistura de secreção das glândulas de defesa com a hemolinfa, que corresponderia na natureza a um ataque de predação mais severo proporcionando a mistura das secreções (PENTZOLD et al., 2016). Portanto, a presença de β -glucosidases na hemolinfa de *Lonomia obliqua* podem estar relacionadas com papel de defesa ao utilizar os glicosídeos cianogênicos como proteção contra predação.

No intestino médio de *Lonomia obliqua* a β -glucosidase apresentou as maiores atividades enzimáticas absolutas nas amostras da membrana epitelial (MES1) do que nas outras porções (Figura 10). Entretanto, a maior atividade específica foi observada em MES2. Normalmente, as enzimas envolvidas na etapa de digestão terminal, como as β -glucosidases, α -glucosidases e as β -fructosidases estão localizadas nas membranas microvilares do epitélio intestinal (MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000; TERRA; FERREIRA, 2005). Isso corrobora a presença de α -glucosidase e de β -fructosidase principalmente nas frações intestinais MES1 e MES2 de *Lonomia obliqua*. Além disso, a presença dessas enzimas também foi detectada na hemolinfa dessa lagarta (Figura 10).

A localização das β -fructosidases intestinais de *Lonomia obliqua* é corroborada pelas β -fructosidases (*BmSUC1*) de *Bombxy mori* que também apresentaram maiores atividades enzimáticas no epitélio intestinal do que na membrana peritrófica e através de técnicas imuno histoquímica detectou-se a presença dessa enzima nas células caliciformes do epitélio intestinal. Entretanto, as células caliciformes estão envolvidas com o transporte ativo de potássio da hemolinfa para o lúmen intestinal, porém não está elucidado como as enzimas

digestivas localizadas nessas células atuam no processo de digestão e absorção dos nutrientes (DAIMON et al., 2008).

A principal função da α -glucosidase e da β -fructosidase é hidrólise da sacarose nos intestinos médios dos insetos (TERRA; FERREIRA, 2012). Entretanto, devido à ausência de α -galactosidase, a β -fructosidase é a principal responsável pela hidrólise da rafinose nos sistemas circulatórios e digestórios de *Lonomia obliqua* (Figura 10). Portanto, a sacarose do meio de cultura celular era hidrolisada pela ação conjunta da α -glucosidase e da β -fructosidase presentes na hemolinfa dessa lagarta.

A β -fructosidase, provenientes de microrganismos, é bastante utilizada na indústria, pois sua principal aplicação está relacionada à produção de um xarope com alto teor de frutose sendo utilizada em alimentos, medicamentos e bebidas, porém há pouca literatura que aborde essa enzima nos insetos (CHEN et al., 2009; ETTALIBI; BARATTI, 2001; GILL; MANHAS; SINGH, 2006; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005). Diante disso, esse trabalho concentrou-se na caracterização e no isolamento dessa enzima na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*.

Outra enzima pouco estudada em Lepidoptera é a α -fucosidase. Essa enzima está presente na hemolinfa e no sistema digestório de *Lonomia obliqua* (Figura 10). As fucosidases digestivas são bastante conhecidas em moluscos, onde estão relacionadas com a degradação do fuicodan das paredes celulares das algas (MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013). Entretanto na literatura, há poucos registros da dosagem de α -fucosidase em insetos, sendo que o registro mais importante é em Diptera (INTRA; PEROTTI; PASINI, 2011). Essa enzima também foi descrita em *Amblyomma cajennense* e em *Biomphalaria glabrata* (MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015). A α -fucosidase nos dois sistemas de *Lonomia obliqua* foi selecionada para as etapas de purificação e caracterização, pois essa enzima nunca foi descrita em Lepidoptera. Além disso, sua função nos insetos não é totalmente clara.

5.2 Avaliação das diferentes alimentações nas atividades enzimáticas das carboidrases do sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*

Esse estudo abordou também a influência das diferentes dietas nas atividades enzimáticas das carboidrases do sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*. Para isso, foram selecionadas três espécies de folhas de árvores

frutíferas (*Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava*) e uma de Mata Atlântica (*Alchornea* ssp), pois as larvas dessa espécie são polífas (MORAES, 1992). Originalmente, estas larvas alimentavam-se exclusivamente das folhas das plantas de mata nativa. Posteriormente, com o desmatamento, adaptaram-se a alimentação em folhas de árvores frutíferas (CARDOSO; HADDAD JUNIOR, 2005). Assim, as lagartas dessa espécie permanecem durante o dia no tronco dessas árvores e isso favorece o contato acidental com as pessoas.

As diferentes formas de alimentação afetaram as atividades específicas e absolutas das carboidrases das diferentes frações intestinais de *Lonomia obliqua*. Por outro lado, as carboidrases da hemolinfa dessa lagarta não apresentaram variações dessas atividades em relação a mudança das dietas (Figuras 11, 12, 23, 28 e 41). Portanto, as dietas interferiram somente na atividade das carboidrases digestivas de *Lonomia obliqua*. A explicação para essa interferência pode estar correlacionada com os diferentes tipos de carboidratos presentes nas folhas das dietas selecionadas. Provavelmente, a alteração das dietas e o conteúdo de carboidratos presentes nas folhas das dietas utilizadas induzem direta ou indiretamente uma alteração dos níveis de expressão de enzimas especificamente relacionadas à digestão destes compostos.

As maiores atividades de amilases das frações MES1 de *Lonomia obliqua* foram medidas nas lagartas alimentadas em *Psidium guajava*, as quais apresentam o maior conteúdo de amido em suas folhas. As lagartas alimentadas em *Alchornea* ssp apresentam os níveis mais baixos de amilase e as folhas dessa espécie vegetal apresenta as menores concentrações do amido (Figura 13).

Nas plantas superiores, a rafinose ocorre nas folhas, caules e órgãos de reserva, porém nas folhas o nível desse carboidrato é baixo e o da sacarose elevado (DEY; DIXON, 1986; LEMOINE, 2000; PAUCHET et al., 2010). Corroborando a quantidade desses dissacarídeos presentes nas folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* (Figura 29). As folhas fornecidas às lagartas de *Lonomia obliqua* foram coletadas às 10h, entretanto, seria esperado que no final do período de luz as quantidades de açúcares fossem distintas e, portanto, essas medidas foram também realizadas às 18h. Além disso, observamos que as lagartas dessa espécie alimentam-se preferencialmente a noite e por isso também foi realizada a avaliação da concentração dos açúcares presentes na folha também

no período noturno. O estoque de glicose, frutose, sacarose e rafinose das diferentes espécies destas folhas mantiveram-se praticamente constantes nos dois horários, sendo as folhas de *Mangifera indica* as mais estáveis nos níveis de açúcares (Figura 29). Dessa forma, as lagartas alimentadas com essa dieta aproveitariam essa fonte de energia nos dois horários. Por outro lado, o período noturno induziu o aumento de amido nas folhas de *Psidium guajava* e *Mangifera indica*, porém independentemente do horário quantidades similares desse polímero estão presentes nas folhas de *Alchornea* ssp e *Eriobotrya japonica*.

A hidrólise da sacarose nas lagartas alimentadas com folhas de *Alchornea* ssp ocorre pela ação das α -glucosidases intestinais devido à baixa atividade de β -fructosidase deste grupo de animais. Essa alteração de padrão de atividade em relação às outras dietas testadas pode ser correlacionada com a presença de um inibidor presente nessas folhas que mantém baixa ou nula atividade de β -fructosidase intestinal nessas lagartas (Figura 28).

O papel biológico das β -fructosidases no intestino médio de *Diatraea saccharalis* das lagartas e dos Coleoptero: *Sphenophorus levis* e *Psacotha hilaris* é a hidrólise da sacarose nas dietas ricas nesse dissacarídeo, porém há poucos relatos da ocorrência dessa enzima em insetos (CARNEIRO et al., 2004; NODA; WATANABE; SCRIVENER, 1997; PEDEZZI et al., 2014).

As α -glucosidases intestinais das lagartas alimentadas com as folhas de *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica* e *Psidium guajava* podem apresentar menor eficiência catalítica pela sacarose quando comparado com a β -fructosidase, entretanto não foi possível isolar em termos de atividade a α -glucosidase intestinal de *Lonomia obliqua* (Figura 28) para este tipo de caracterização.

A maior quantidade de β -fructosidase está presente nas lagartas alimentadas com folhas de *Eriobotrya japonica* e *Mangifera indica*. Entretanto, a ausência de rafinose nessa espécie vegetal e de *Mangifera indica* implica que a função da β -fructosidase intestinal de *Lonomia obliqua* é hidrolisar a sacarose nessas dietas. Por outro lado, as folhas de *Psidium guajava* concentram a maior quantidade de rafinose quando comparado com as outras plantas e as lagartas alimentadas com essa dieta apresentam a atividade de β -fructosidase mais alta em relação à α -glucosidase (Figuras 28 e 29). Isso também pode ser correlacionado a outra hipótese. Os alcaloides presentes nas folhas podem atuar como inibidores das α -glucosidases,

como no caso das folhas de amora que apresentam esses alcalóides e inibem as α -glucosidases, porém não afetam a atividade das β -fructosidases intestinais de *Bombxy mori* (DAIMON et al., 2008). Dessa forma, com a inibição da α -glucosidase, a β -fructosidase intestinal de *Lonomia obliqua* pode ser uma enzima alternativa para aumentar a eficiência do aproveitamento de sacarose, o principal carboidrato das folhas.

5.3 Interferência das diferentes alimentações nos pHs ótimos e nos géis nativos das carboidrases do sistema circulatório e digestório de *Lonomia obliqua*

As diferentes dietas fornecidas a *Lonomia obliqua* não alteraram os valores dos pHs ótimos das carboidrases do sistema circulatório dessa lagarta. Por outro lado, diferentes valores de pHs ótimos das carboidrases digestivas ocorrem quando há variações na alimentação, exceto para as α -fucosidases (Figuras 14, 15, 16, 24, 30 e 42).

Os pHs ótimos ácidos são características de diferentes α -fucosidases. Essas enzimas estão, em geral, localizadas no lisossomo, são hidrolases ácidas e estão envolvidas no catabolismo de glicoproteínas, glicolípídeos e glicosaminoglicanas (REGLERO; CARRETERO; CABEZAS, 1980; SHAIKH et al., 2013). Possivelmente a α -fucosidase da hemolinfa e do intestino de *Lonomia obliqua* situam-se nos lisossomos, pois a atividade ótima dessa enzima nos dois diferentes sistemas dessa lagarta é compatível com o pH ácido dessa organela celular. Dessa forma, as variações nas dietas pouco interferem nos valores de pHs ótimos das α -fucosidases da hemolinfa e do intestino de *Lonomia obliqua*. Valores semelhantes de pHs ótimos da α fucH (pH = 5,3) e α fucI (pH = 5,1) de *Lonomia obliqua* foram encontrados no intestino médio de *Amblyomma cajennense* e no intestino médio de *Biomphalaria glabrata*, respectivamente (MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015).

O pH intestinal de *Lonomia obliqua* não sofreu alteração nos seus valores nas diferentes fontes de alimentação. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o pH do intestino médio está mais correlacionado com a filogenia do inseto do que com a alimentação (TERRA; FERREIRA, 2012) (Tabela 10). A ordem Lepidoptera se destaca das demais ordens de insetos por apresentar as mais elevadas taxas de pH intestinal. Comumente são encontrados valores na faixa do pH 10 ± 11 , e às vezes, tão elevadas como pH 12, os quais foram registrados em

Bombxy mori e outras espécies (GRINGORTEN; CARWFORD; HARVEY, 1993). Os pHs intestinais de *Lonomia obliqua* apresentaram valores mais baixos em relação as demais espécies de Lepidoptera. Assim como em outros Lepidoptera, o pH da hemolinfa de *Lonomia obliqua* é distinto do pH alcalino verificado no intestino. Em Lepidoptera, os pHs do sistema circulatório são mais ácidos (6,6-6,8) em relação aos pHs intestinais, porém os valores de pHs da hemolinfa de *Lonomia obliqua* são mais básicos (6,6-7,8) quando comparado com as demais espécies de Lepidoptera (Tabela 10).

As principais explicações que justificam a evolução do sistema intestinal mais alcalino em Lepidoptera são: adaptação em relação aos vegetais enriquecidos em taninos (CHAPMAN, 1998), pois os taninos em pHs mais ácidos aderem as proteínas e reduzem a eficiência da digestão e assim afetariam o crescimento desses insetos (DOW, 1984) e facilitar a extração das hemiceluloses das folhas, pois extrações analíticas utilizam soluções alcalinas para esse fim (TERRA, 1988).

O pH é um dos principais fatores que afetam as enzimas, pois a conformação enzimática é mantida quando a composição dos seus grupos ionizáveis estão presentes na forma adequada. Assim, o pH pode afetar os resíduos dos aminoácidos localizados no sítio ativo das enzimas e consequentemente a eficiência catalítica (KAUR; KAUR; GUPTA, 2014).

Tabela 10: Valor do pH das amostras de hemolinfa e das amostras solúveis da fração MES1 do intestino de *Lonomia obliqua* alimentadas com diferentes dietas: *Alchorneassp* (Euphorbiaceae), *Eriobotrya japonica* (Rosaceae), *Mangifera indica* (Anacardiaceae), *Psidium guajava* (Myrtaceae) em comparação com outras Lepidoptera.

	Família	MP	Hemolinfa	Dieta	Referência
<i>Manduca sexta</i>	Sphingidae	10,8 ± 0,25	6,6 ± 0,05	Artificial	(GRINGORTEN; CRAWFORD; HARVEY, 1993)
<i>Spodoptera eridania</i>	Noctuidae	10,3 ± 0,07	6,6 ± 0,04	Artificial	(GRINGORTEN; CRAWFORD; HARVEY, 1993)
<i>Bombyx mori</i>	Bombycidae	11,2 ± 0,15	6,8 ± 0,06	Artificial	(GRINGORTEN; CRAWFORD; HARVEY, 1993)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	Tortricidae	10,5 ± 0,12	6,7 ± 0,04	Artificial	(GRINGORTEN; CRAWFORD; HARVEY, 1993)
<i>Bombyx mori</i>	Bombycidae	11,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1	Artificial	(GRINGORTEN; CRAWFORD; HARVEY, 1993)
<i>Achaea janata</i>	Noctuidae	7,3-7,9	-	Euphorbiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Hyles euphorbiae</i>	Sphingidae	7,5	-	Euphorbiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Pericallia ricini</i>	Arctiidae	8,14	-	Euphorbiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Spodoptera eridani</i>	Noctuidae	8,2	-	Euphorbiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Ergolis merione</i>	Nymphalidae	8,44	-	Euphorbiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Anisota senatoria</i>	Saturniidae	9,0-9,1	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Yponomeuta malinella</i>	Yponomeutidae	9,2	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Operophtera brumata</i>	Geometridae	9,2-9,5	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Malacosoma neustria</i>	Lasiocampidae	9,3	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Malacosoma disstria</i>	Lasiocampidae	9,3	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Datana integerrima</i>	Notodontidae	9,5	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	Lymantriidae	9,7	-	Rosaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Orthaga exuvinaea</i>	Pyalidae	8,26	-	Anacardiaceae	(BERENBAUM, 1980)
<i>Lonomia obliqua</i>	Saturniidae	8,5	7,4-7,8	Euphorbiaceae	Presente trabalho
<i>Lonomia obliqua</i>	Saturniidae	8,5	7,0-7,2	Rosaceae	Presente trabalho
<i>Lonomia obliqua</i>	Saturniidae	8,5	7,4-7,8	Anacardiaceae	Presente trabalho
<i>Lonomia obliqua</i>	Saturniidae	8,5	6,6-6,8	Myrtaceae	Presente trabalho

Dentre todos os pHs ótimos das carboidrases, as amilases intestinais de *Lonomia obliqua* apresentaram os pHs ótimos mais alcalinos. A atividade ótima dessa enzima ocorreu entre os pHs 9,2 e 11,2 e esses valores são compatíveis com o pH intestinal dessa lagarta (8,5), porém as lagartas alimentadas com diferentes dietas apresentaram distintos valores de pHs ótimos dessa enzima (Figura 14). Provavelmente isso remete a expressão de diferentes isoformas. Os pHs ótimos das amilases de *Lonomia obliqua* corroboram os pHs ótimos dessa enzima em outros Lepidoptera, os quais incluem as amilases de *Antheraea mylitta* (9,5), *Bombyx mori* (9,2), *Erinnyis ello* (9,8), *Anagasta kuehniella* (9,5), *Chilo suppressalis* (9,0), *Tecia solanivora* (9,0), *Helicoverpa armigera* (8,0-9,0), *Naranga aenescens* (8,0), *Glyphodes pyloalis* (9,0), *Pieris brassicae* (8,0) (ABRAHAM et al., 1992; ASADI et al., 2010; NAGARAJU; ABRAHAM, 1995; BAKER, 1989; KOTKAR et al., 2009; SANTOS; TERRA, 1986a; SHARIFLOO et al., 2016; VALENCIA-JIMENEZ et al., 2008; YEZDANI et al., 2010; ZIBAE et al., 2008).

Ao contrário dos pHs ótimos das amilases, as migrações relativas da atividade nativa dessa enzima no intestino de *Lonomia obliqua* foram semelhantes em todas as dietas e somente uma banda de atividade foi detectada. Dessa forma, há distintas isoformas de amilases intestinais de *Lonomia obliqua*, porém apresentam massas e cargas similares. O gel de atividade da amilase intestinal de *Antheraea mylitta* revelou a presença de cinco bandas de atividade dessa enzima com diferentes valores de migrações relativas, porém a banda mais visível e de menor migração relativa ($R_m = 18$) foi semelhante à migração relativa da amilase de *Lonomia obliqua* (NAGARAJU; ABRAHAM, 1995). As lagartas, *Helicoverpa armigera*, foram alimentadas separadamente com diferentes dietas naturais (vegetais, legumes, flores, cereais) e artificiais. O gel de atividade nativo da amilase de *Helicoverpa armigera* revelou a presença de 4 isoformas comuns em todas as dietas, porém a quantidade total de isoformas variou de acordo com a dieta (KOTKAR et al., 2009). As diferentes isoformas das amilases podem estar correlacionadas com a eficiência da conversão dos polímeros em oligômeros presentes na alimentação, sendo extremamente importante o papel digestivo das diversas isoformas para a hidrólise (LAZAREVIC et al., 2004).

As atividades ótimas das celulasas e pectinases intestinais de *Lonomia obliqua* situam-se em uma faixa de pH neutro (Figura 15 e 16). Esses valores de pHs ótimos podem estar relacionados ao fato dessas enzimas serem provenientes

da microflora, pois o *Bacillus* ssp, identificado no trato intestinal de *Lonomia obliqua*, é capaz de sintetizar essas enzimas, amilases e xilanases (ANAND et al., 2010). O pH ótimo da pectinase sintetizada pelas bactérias *Bacillus circulans*, *Pseudomonas fluorescens* e *Erwinia* ssp que habitam o intestino de *Bombxy mory* é 8,0 (ANAND et al., 2010). Portanto, cepas bacterianas intestinais que produzem essa enzima são capazes de suportar pHs alcalinos e podem estar envolvidas com a digestão das pectinas das folhas das plantas. Outro fator além dos pHs ótimos das celulasas e pectinases que pode ser uma evidência de que essas enzimas intestinais de *Lonomia obliqua* são sintetizadas pela microflora intestinal é a ausência de transcritos que codifiquem estas enzimas no transcriptoma desse inseto. Desta forma, a síntese destas despolimerases pelos *Bacillus* ssp presentes no intestino médio de *Lonomia obliqua* podem auxiliar na hidrólise dos polissacarídeos das folhas das plantas.

Há estudos que refutam a presença desses microrganismos no intestino médio de Lepidoptera, pois no intestino médio de *Parnassius apollo* folhas não maceradas ou digeridas por completo no conteúdo intestinal atravessam rapidamente o trato intestinal e os autores desse trabalho acreditam que há pouco tempo para a digestão por microrganismos, além da dissecação dos intestinos não revelarem estruturas onde os microrganismos possam sobreviver (NAKONIECZNY; MICHALCZK; KEDZIORSKI, 2006). Entretanto, isso não comprova que a microbiota intestinal presente no MP não possa ter participação direta na hidrólise da celulose e pectina. Genta et al., (2006) propõem que a microbiota intestinal das larvas de *Tenebrio molitor* auxiliam na digestão dos carboidratos e concernem na relação benéfica entre os microrganismos e os insetos, pois essa relação pode contribuir para a hidrólise de compostos tóxicos das folhas das plantas e também facilitam as adaptações de novas fontes alimentares, portanto, favorecem o crescimento e desenvolvimento dos insetos.

Por outro lado, entretanto, os avanços nos sequenciamento de genomas e transcriptomas e as análises destes tem revelado genes endógenos que expressam celulasas em insetos, como no caso dos cupins e as pectinases que são expressas em abelhas e gorgulhos. Acredita-se que a pectinase nesses insetos são resultados de uma transferência horizontal de genes bacterianos (KIRSCH et al., 2014; SHELOMI et al., 2016). Entretanto, em muitos dos genomas e transcriptomas de

Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera não foram identificados genes de poligalacturonases (CALDERON-CORTÉS et al., 2012).

As lagartas alimentadas com folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica*, *Psidium guajava* apresentaram distintos valores de pHs ótimos das β -glucosidases intestinais de *Lonomia obliqua* (pH: 7,2; 8,0; 7,1 e 7,9, respectivamente). Essas alterações nos valores de pHs ótimos dessa enzima podem estar correlacionados com variações nas dietas (ZIBAE; BANDANI; RAMZI, 2009). Por outro lado, as distintas fontes alimentares não modificaram os valores dos pHs ótimos das β -glucosidases da hemolinfa (pH 7,3). O pH ótimo da β -glucosidase da hemolinfa é compatível com o pH do sistema circulatório de *Lonomia obliqua* (Tabela 10).

Os distintos valores dos pHs ótimos (Tabela 6), perfis ótimos (Figura 24) e migrações relativas (Figura 26) das β -glucosidases presentes no intestino médio nas diferentes dietas e na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, sugerem que possivelmente há distintas β -glucosidases atuando nos dois sistemas dessa lagarta.

Assim como o pH ótimo de β -glucosidase da hemolinfa, o pH ótimo da α -glucosidase (pH 6,7) e da β -fructosidase (pH 6,8) da hemolinfa são compatíveis com o pH do sistema circulatório de *Lonomia obliqua* (Tabela 10).

Os valores dos pHs ótimos de α -glucosidases (pH: 6,4; 6,7; 6,2 e 7,0; respectivamente) e β -fructosidases (pH 7,0 em todas as dietas) intestinais de *Lonomia obliqua* submetidas as dietas com folhas de *Alchornea* ssp, *Eriobotrya japonica*, *Mangifera indica*, *Psidium guajava* permitiram a comparação com outros Lepidoptera encontrados na literatura. Os pHs ótimos dessas enzimas do intestino médio de *Erinnyis ello* (Spingidae) foram: 5,8 e 6,0, respectivamente (SANTOS; TERRA, 1986b). Semelhantemente, no intestino médio de *Heliothis zea* (Noctuidae) os pHs ótimos da β -fructosidase foi de: 6,5 e distintos das α -glucosidases que apresentavam valores: 5,5 e 6,0 respectivamente (BURTON, 1975; BURTON; STARKS; SAUER, 1976).

Os pHs ótimos e as migrações relativas da α -glucosidase, da β -fructosidase e da α -fucosidase digestivas são distintas entre si e se diferenciam das migrações relativas dessas enzimas na hemolinfa de *Lonomia obliqua* (Figuras 31 e 45). Isso indica que possivelmente são distintas α -glucosidases, α -fucosidases e β -fructosidases que atuam nos dois sistemas dessa lagarta e que estas atividades na hemolinfa não resultam de uma contaminação durante a dissecação. Apesar destas

diferenças as enzimas nos dois sistemas podem ser produtos de um único gene que sofre modificações pós-traducionais distintas no sistema digestório e na hemolinfa.

Tanto a α -glucosidase como a β -fructosidase atuam de forma sinérgica para a hidrólise da sacarose (PEDEZZI et al., 2014; NODA; WATANABE; SCRIVENER, 1997; TERRA; FERREIRA, 1994). Em *Lonomia obliqua*, as primeiras bandas do gel nativo de β -fructosidases intestinais das diferentes dietas estão possivelmente correlacionadas com a função digestiva dos oligossacarídeos da *Lonomia obliqua* (Figura 31).

5.4 Isoformas e massas moleculares das carboidrases de *Lonomia obliqua*

A massa molecular da pectinase intestinal identificada em *Lonomia obliqua* (42 kDa) (Figura 19) difere da encontrada para esta enzima do besouro *Xanthogaleruca luteola*, pois a massa molecular dessa foi estimada no valor de 125 kDa nesse inseto (VATANPARAST et al., 2012).

A massa molecular das β -glucosidases da hemolinfa e do intestino de *Lonomia obliqua* (111 kDa nos dois sistemas dessa lagarta) é semelhante à massa molecular da forma oligomérica da β -glucosidase de outros Lepidoptera. A β -glucosidase do intestino médio da lagarta *Spodoptera frugiperda* foi submetida a cromatografia em coluna de gel filtração em duas diferentes condições: baixa e alta força iônica. Nessas condições, as massas moleculares estimadas foram de: 120 kDa e 66 kDa, respectivamente. A reaplicação das frações contendo atividade de β -glucosidases após cromatografia em alta força iônica em condições de baixa força iônica revelou um pico de 125 kDa, indicando a formação de oligômeros dependentes da força iônica (MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000). A massa molecular estimada da β -glucosidase por gel filtração do homogeneizado do corpo inteiro da lagarta *Thaumetopoea pityocampa* foi de 74 kDa (PRATVIEL-SOSA et al., 1987). A β -glucosidase da membrana peritrófica da lagarta *Spodoptera frugiperda* foi estimada por gel filtração e um único pico registrou a presença de duas subunidades com mesma massa molecular no valor de 65 kDa (FERREIRA et al., 1994).

As massas moleculares de α -glucosidases (228 kDa e 87 kDa) e da β -fructosidase (68 kDa) estimadas por cromatografia de filtração em gel diferem, corroborando a hipótese de que estas atividades são enzimas diferentes atuando na hidrólise da sacarose nos dois sistemas de *Lonomia obliqua*. As α -glucosidases e as β -fructosidases foram isoladas das lagartas de *Erinnyis ello* (SANTOS; TERRA,

1986a). As duas isoformas de α -glucosidase apresentaram massas moleculares de 151 kDa e 34 kDa. Em condições alcalinas verifica-se apenas a forma de 34 kDa, indicando que a isoforma de maior massa molecular é resultado da formação de um oligômero. Corroborando resultados desse trabalho, a β -fructosidase desta lagarta apresentou uma massa de 78 kDa (SANTOS; TERRA, 1986a). A β -fructosidase e α -glucosidase isoladas do intestino médio da lagarta *Diatraea saccharalis* apresentaram 45 kDa e 54 kDa, respectivamente (CARNEIRO et al., 2004).

Na determinação da massa molecular da α -fucosidase da hemolinfa notam-se dois picos na hidrólise do MUFUC. O primeiro pode ser atribuído a α -glucosidase e o segundo a α -fucosidase ou pode ser resultado da formação de oligômeros dessa enzima no processo de gel filtração corroborando os dados do pH ótimo da α fuch. Portanto, a α fuch de *Lonomia obliqua* apresenta 141 kDa. As massas moleculares de α -fucosidases na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua* (141 kDa) corroboram os valores da α -fucosidase do intestino médio de *Amblyomma cajennense* (140 kDa) e no intestino médio de *Biomphalaria glabrata* (141 kDa) (MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015).

A presença de diferentes isoformas também pode ser observada nos perfis de atividades de pectinases, α -fucosidases e β -glucosidases de *Lonomia obliqua* das frações das cromatografias de troca iônica e hidrofóbica. Entretanto, para algumas enzimas o número de isoformas após as cromatografias não parece compatível, principalmente, se compararmos com o número de sequências obtidas nas análises dos transcriptomas. Algumas possíveis explicações para a profusão de isoformas aparentes nos perfis cromatográficos são: formações de oligômeros, pois as interações proteicas podem ser induzidas pela força iônica causada pelo sal e normalmente são ligações de natureza não covalentes; a presença de enzimas proteolíticas, pois os picos menos abundantes dessa enzima podem ser resultado da degradação destas enzimas; as distintas isoformas também podem ser resultados das diferentes proteínas glicosiladas provenientes de modificações pós-traducionais, que afetam as características termodinâmicas, cinéticas, biofísicas e estruturais dessas proteínas e ao “splicing alternativo” (AMIN et al., 2014; PERLER, 2005; SHENTAL-BECHOR; LEVY, 2008).

Corroborando nossos resultados (Figura 33), o passo final do enriquecimento da β -fructosidase de *Sphenophorus levis* também detectou dois picos de atividade contra RAF e SAC (PEDEZZI et al., 2014).

As frações da HiTrap Fenil FF da hemolinfa e do intestino enriquecidas de β -fructosidase de *Lonomia obliqua* eram ativas por 20 dias quando armazenadas à 4 °C. Por outro lado, quando congeladas essa enzima perdia a atividade. A perda de atividade também ocorreu para a β -fructosidase isolada das células de cenoura, pois essa enzima desnaturava quando submetida a temperaturas muito baixas e não era estável à 4 °C por 24h (LEE; STURM, 1996).

Os perfis cromatográficos e as massas moleculares das α -glucosidases, das α -fucosidases, das β -glucosidases e das β -fructosidases foram semelhantes na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*. Portanto, essas enzimas nesses dois sistemas dessa lagarta podem apresentar características estruturais em comum.

5.5 Relação do K_m das amilases, α -fucosidases e β -fructosidases de *Lonomia obliqua* com os substratos específicos dessas enzimas

O valor de afinidade da amilase intestinal de *Lonomia obliqua* pelo amido ($K_m = 0,48 \pm 0,06\%$) está entre os valores já descritos para as amilases de: *Anagasta kuehniella* ($K_m = 0,037 \pm 0,004\%$), *Antheraea mylitta* ($K_m = 0,113\%$), *Glyphodes pyloalis* ($K_m = 0,56\%$), *Pieris brassicae* ($K_m = 1,37\%$) (BAKER, 1989; NAGARAJU; ABRAHAM, 1995; SHARIFLOO et al., 2016; YEZDANI et al., 2010).

A α fucI ($K_m = 50,5 \pm 7,1 \mu\text{M}$) apresenta uma maior afinidade pelo substrato MUFUC do que α fucH ($K_m = 64,0 \pm 8,5 \mu\text{M}$). Isso pode estar correlacionado a distintas funções fisiológicas, pois na hemolinfa essa enzima pode estar relacionada com papel de defesa, enquanto no intestino pode estar relacionada a digestão. Os dados cinéticos da α fucH e da α fucI pelo substrato MUFUC, reforçam que são distintas α -fucosidases presentes na hemolinfa e intestino de *Lonomia obliqua*. Os valores de afinidade das α -fucosidases de *Lonomia obliqua* utilizando MUFUC como substrato estão de acordo com os dados obtidos para as α -fucosidases do intestino médio de *Amblyomma cajennense* ($K_m = 45,0 \pm 14 \mu\text{M}$); do intestino médio de *Biomphalaria glabrata* ($K_m = 48,4 \pm 5,8 \mu\text{M}$); do fígado do rato ($K_m = 60,0 \mu\text{M}$); do fígado humano ($K_m = 58,0 \pm 3,3 \mu\text{M}$) e de *Drosophila melanogaster* ($K_m = 125 \pm 25 \mu\text{M}$) (INTRA; CENNI; PEROTTI, 2006; KRESS et al., 1980; LAURY-KLEINTOP, DAMJANOV; ALHADEFF, 1985; MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015).

A β fruH de *Lonomia obliqua* ($K_m = 5,2 \pm 0,6 \text{ mM}$ para RAF e $K_m = 5,0 \pm 0,7 \text{ mM}$ para SAC) apresenta uma especificidade semelhante às β -fructosidases

isoladas do intestino médio de *Diatraea saccharalis* e *Erinnyis ello*, as quais apresentam uma razão de ligação RAF/SAC de 1 (*Diatraea saccharalis* $K_m = 3,8$ mM para RAF e $3,34$ mM para SAC e *Erinnyis ello* $K_m = 32$ mM para RAF e $K_m = 30$ mM para SAC) (CARNEIRO et al., 2004; SANTOS; TERRA, 1986b). Entretanto, a β frul apresenta uma característica peculiar com uma razão de ligação RAF/SAC = 0,06. Isto é, esta enzima apresenta melhor ligação à SAC do que a RAF, diferente do observado para outras β -fructosidases. Portanto, as comparações cinéticas da β fruH e da β frul pelos substratos SAC e RAF reforçam que são distintas β -fructosidases presentes na hemolinfa e intestino de *Lonomia obliqua*.

O papel fisiológico das β -fructosidases na digestão parece muito claro (TERRA; FERREIRA, 2012). Novas enzimas intestinais envolvidas na hidrólise de sacarose foram descobertas em *Bombyx mori*, *Trilocha varians* e *Samia cynthia ricin*, e suas ações cruzadas juntamente com a β -fructosidase são apontadas como as responsáveis pela digestão da sacarose nesses animais (WANG et al., 2015). Entretanto, além da α -fucosidase também desconhecemos o papel fisiológico das β -fructosidases na hemolinfa e para isso são necessários mais estudos. A realização de experimentos através do uso do PCR em tempo real permitirá a amplificação e quantificação do DNA dos hemócitos de *Lonomia obliqua* bem como a detecção dos transcritos de β -fructosidase e α -fucosidase. Uma vez identificados, o silenciamento genico responsável pela tradução dos transcritos de β -fructosidases e α -fucosidases podem auxiliar na elucidação da função dessas enzimas no sistema circulatório de *Lonomia obliqua*.

5.6 Relação das α -fucosidases e β -fructosidases de *Lonomia obliqua* com seus respectivos inibidores

Os inibidores da α -fucosidase são de extrema importância para a caracterização da especificidade e do sítio ativo das α -fucosidases além de alguns destes serem fundamentais no desenvolvimento de novos fármacos (PERRELLA et al., 2015). Em casos específicos, um inibidor pode diminuir a infecção no estômago causada pela *Helicobacter pylori*, pois essa bactéria aumenta a atividade desta enzima (MORENO-CLAVIJO et al., 2013). Outros estudos demonstraram que derivados de fuconojirimicina apresentam diferentes tipos de inibições sobre as α -fucosidases de *Thermotoga maritima* e *Homo sapiens* (HO et al., 2006), sendo que

um dos seus derivados são potentes inibidores competitivos da α -fucosidase de *Homo sapiens* (WINCHESTER et al., 1990).

A α -fucosidase da hemolinfa ($K_i = 0,06 \mu\text{M}$) e do intestino ($K_i = 0,09 \mu\text{M}$) de *Lonomia obliqua* é inibida pela fuconojirimicina, bem como a α -fucosidase de: *Amblyomma cajennense* ($\text{IC } 50\% = 0,042 \mu\text{M}$); *Biomphalaria glabrata* ($K_i = 0,02 \mu\text{M}$); *Pecten maximus* ($K_i = 0,026 \mu\text{M}$); bovino ($K_i = 0,027 \mu\text{M}$) e humano ($K_i = 0,01 \mu\text{M}$) (BERTEAU et al., 2002; FLEET et al., 1985; LEGLER; STÜTZ; IMMICH, 1995; MORETI; PERRELLA; LOPES, 2013; PERRELLA et al., 2015).

Dependendo das concentrações de fucose há alterações dos modos de inibições das α -fucosidases da hemolinfa e do intestino de *Lonomia obliqua*, pois em baixas e altas concentrações de fucose, esse inibidor apresentou um padrão competitivo e não competitivo, respectivamente para as α -fucosidases presentes nos dois sistemas dessa lagarta (Figura 49). Por outro lado, a fucose apresentou somente o padrão de inibição competitivo para a α -fucosidase intestinal de *Biomphalaria glabrata* sendo que essa enzima teve sua atividade reduzida em 70% na presença de 1 mM de fucose (PERRELLA et al., 2015). A atividade das α -fucosidases de *Lonomia obliqua* foi diminuída em 70% com aproximadamente 0,21 mM de fucose (Figura 48). A α -fucosidase de *Pecten maximus* foi inibida pela fucose e apresentou um valor de $K_i = 240 \mu\text{M}$ muito semelhante ao K_i de αfucl ($224 \mu\text{M}$) de *Lonomia obliqua* (BERTEAU et al., 2002). Os diferentes valores da constante de inibição das α -fucosidases de *Lonomia obliqua* utilizando os inibidores fucose ($K_i = 86 \mu\text{M}$ e $224 \mu\text{M}$, respectivamente) e fuconojirimicina ($K_i = 0,06 \mu\text{M}$ e $0,09 \mu\text{M}$, respectivamente) indicam que são distintas α -fucosidases presentes nos dois sistemas dessa lagarta.

Da mesma forma, os valores da constante de inibição da βfrucH e a βfrucI de *Lonomia obliqua* divergiram para o inibidor Tris (Tabela 9). Esses valores intensificam a hipótese que a β -fructosidase da hemolinfa é distinta da β -fructosidase do intestino de *Lonomia obliqua*.

5.7 Sequências das amilases, α -fucosidases e β -fructosidases de *Lonomia obliqua*

As sequências da amilase LO1 e LO2 obtidas através do transcriptoma foram alinhadas com as sequências dessa enzima descritas na literatura. O alinhamento permitiu a comparação entre importantes regiões das sequências de amilase de

Lonomia obliqua. Os transcritos LO1 e LO2 apresentam resíduos de aminoácidos conservados na tríade catalítica e também nos sítios de ligações aos íons cálcio e cloreto (Figura 22). Entretanto, as amilases intestinais de *Lonomia obliqua* não apresentaram um padrão claro de ativação ou inibição na presença dos íons cloreto, cálcio, sódio, magnésio e potássio (Figura 21). Isso difere dos dados apresentados na literatura, pois as amilases de *Chilo suppressalis*, *Naranga aenescens*, *Glyphodes pyloalis* e *Pieris brassicae*, são metaloproteínas e na presença dos íons Ca^{+2} há um aumento de suas atividades (ASADI et al., 2010; SHARIFLOO et al., 2016; YEZDANI et al., 2010; ZIBAE et al., 2008). Vários estudos apontam que as amilases dos insetos são metaloenzimas, pois esses íons metálicos são essenciais para a atividade, a estabilidade e integridade estrutural (KAUR; KAUR; GUPTA, 2014; TERRA; FERREIRA, 2012). Além do íon cálcio, o sódio também funcionou como um ativador da amilase intestinal de *Naranga aenescens*, pois a atividade dessa enzima aumentou nas diferentes concentrações desse sal. Entretanto, esse sal foi um inibidor da amilase de *Chilo suppressalis* (ASADI et al., 2010; ZIBAE et al., 2008). O íon potássio, dependendo da concentração, pode funcionar como um ativador ou inibidor, entretanto para a amilase de *Naranga aenescens* foi um ativador (ASADI et al., 2010). Porém, esse íon e o magnésio foram inibidores das amilases intestinais de *Chilo suppressalis* e *Glyphodes pyloalis* (YEZDANI et al., 2010; ZIBAE et al., 2008).

A diminuição da atividade da amilase de *Lonomia obliqua* após diálise (Figura 21) corrobora os dados encontrados na literatura, que indicam que as atividades das amilases intestinais de *Antheraea mylitta* e *Pieris brassicae* decresceram quando dialisado contra tampão (NAGARAJU; ABRAHAM, 1995; SHARIFLOO et al., 2016).

O estudo da influência dos íons sobre as amilases e o desenvolvimento de plantas que apresentem inibidores para essas enzimas nos insetos são essenciais, pois isso influencia diretamente no crescimento e na sobrevivência dos herbívoros. Por outro lado, as amilases dos insetos sofreram mutações e são menos afetadas pelos inibidores presentes nos vegetais (STROBL, S. et al., 1998; YEZDANI et al., 2010).

Devido ao importante papel das amilases no desenvolvimento do inseto, qualquer estratégia que prejudique a atividade dessa enzima é essencial no controle desses animais e por isso a amilase de diferentes insetos é densamente abordada na literatura como peça chave no desenvolvimento de plantas transgênicas mais

resistentes a herbivoria e consequentemente a diminuição do uso de pesticidas químicos.

Apesar da importância dos estudos de indução ou inibição das enzimas digestivas em Lepidoptera, pouco se avançou sobre os mecanismos moleculares relacionados com esse processo. A indução de amilases, pectinases e celulasas sobre os fatores envolvidos de detecções dos inibidores ou ativadores dessas enzimas no sistema digestório e a expressão gênica dessas enzimas ainda é um alvo para ser explorado.

O GenBank permitiu a comparação da sequência de α -fucosidase de *Lonomia obliqua* com outros animais, sendo essas mais similares com as fucosidases de outros Lepidoptera (Figura 50). Em destaque, uma das maiores identidades da sequência dessa enzima de *Lonomia obliqua* é a sequência de α -fucosidase de *Spodoptera litura* que foi de 69%. O gene da α -fucosidase de *Spodoptera litura* apresenta um frame de leitura de 1461 oligonucleotídeos, a massa molecular foi estimada em 56,3 kDa e alta expressão gênica dessa enzima ocorre durante os períodos de pré-pupa e pupa (LUO et al., 2013).

A presença de um transcrito de α -fucosidase de *Lonomia obliqua* está de acordo com a presença de um gene dessa enzima em *Spodoptera litura*, *Papilio machaon* e *Papilio xuthus* (LI et al., 2015; LUO et al., 2013).

As análises transcriptômicas, proteômicas e *in silico* das sequências da α -fucosidase revelou que essa enzima em *Lonomia obliqua* apresenta aminoácidos conservados com os membros da família GH 29, o qual é representado pelas α -fucosidases de *Thermotoga maritima* (SULZENBACHER et al., 2004). O Asp-239 da α -fucosidase de *Lonomia obliqua* é equivalente ao Asp-224 da bactéria *Thermotoga maritima* e deve agir como um nucleófilo catalítico (SULZENBACHER et al., 2004).

A análise proteômica identificou somente um peptídeo de α -fucosidase na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*. Entretanto, não foi possível amplificar a α -fucosidase: na carcaça, na hemolinfa, no intestino médio total, no intestino médio anterior, no intestino médio posterior e nem nos túbulos de Malpighi dessa lagarta utilizando a PCR convencional. Para analisar e verificar a amplificação dessa enzima nos diferentes tecidos desse animal é necessário substituir o PCR convencional por PCR em tempo real, uma vez que a qPCR é mais sensível e reproduz os resultados tanto qualitativamente como quantitativamente (Figura 52).

A atividade de β -fructosidase foi reportada em Lepidoptera (CARNEIRO et al., 2004; SANTOS; TERRA, 1986b; SUMIDA; YUAN; MATSUBARA, 1994). A primeira sequência de cDNA dessa enzima foi identificada no intestino médio de *Helicoverpa armigera* e posteriormente no genoma de *Bombxy mori* dois genes de β -fructosidases (*BmSuc1* e *BmSuc2*) foram obtidos (PAUCHET et al., 2008). O gene *BmSuc1* foi altamente expresso no intestino médio e glândulas salivares, entretanto a expressão do gene *BmSuc2* não foi detectada em nenhum tecido dessa lagarta (DAIMON et al., 2008). Esse resultado é semelhante ao verificado em *Lonomia obliqua* na qual foram identificados dois transcritos de β -fructosidases e somente um delas está presente no intestino médio (Figura 40).

O GenBank permitiu a comparação das sequências de β -fructosidases de *Lonomia obliqua* com outros animais, sendo essas mais similares com as β -fructosidases de outros Lepidoptera (Figura 38). A identidade da sequência de β fru1 com as sequências de β -fructosidases de *Operophtera brumata* e *Manduca sexta* foi de 69% e da β fru2 foi de 58% com a sequência dessa enzima de *Amyelois transitella*.

A análise dos transcriptomas, proteômicas e *in silico* das sequências da β fru1 e β fru2 revelou que essas enzimas em *Lonomia obliqua* apresentam aminoácidos conservados com os membros da família GH 32, o qual é representado pelas β -fructosidases de *Bifidobacterium longum* (BUJACZ et al., 2011). O Asp-61 da β fru1 e Asp-40 da β fru2 de *Lonomia obliqua* é equivalente a Asp-54 da bactéria *Bifidobacterium longum* e deve agir como um nucleófilo catalítico (BUJACZ et al., 2011). O Glu-233 da β fru1 e Glu-217 da β fru2 de *Lonomia obliqua* é equivalente a Glu-235 dessa bactéria e provavelmente está relacionado com a catálise ácido-base (BUJACZ et al., 2011).

A amplificação da β fru1 e da β fru2 nos túbulos de Malpighi pode ser resultado de uma contaminação acidental com partes do intestino médio posterior de *Lonomia obliqua* (Figura 40). Além disso, a análise proteômica identificou a presença de um peptídeo da β fru 2 no intestino, porém há a predominância da β fru 1 no intestino, uma vez que foram identificados mais peptídeos da β fru1 (12) em relação a β fru2 (1) (Figura 39). A análise proteômica também permitiu a identificação somente de 1 peptídeo de β fru1 na hemolinfa dessa lagarta (Figura 39).

Acredita-se que as β -fructosidase de Lepidoptera são resultados de uma transferência horizontal de genes das bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus*

licheniformis (DAIMON et al., 2008; LI et al., 2011). Entretanto mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

5.8 Contribuições desse trabalho

O contato acidental com as cerdas venenosas da lagarta da espécie *Lonomia obliqua* acarretam em problemas de saúde pública (SPADACCI-MORENA et al., 2016). Por isso, os trabalhos concentram-se mais nas cerdas desses animais. Entretanto, poucos estudos abordavam sobre a fisiologia digestiva e circulatória desse inseto. Diante disso, esse estudo contribuiu para a identificação e caracterização das principais carboidrases presentes na hemolinfa e no intestino de *Lonomia obliqua*.

A escolha do estudo de enzimas relacionadas à degradação dos carboidratos nos dois sistemas de *Lonomia obliqua* foi baseado em dois fatores. O primeiro era a identificação das enzimas da hemolinfa responsáveis pela hidrólise da sacarose presentes no meio de cultivo celular, pois nosso grupo de pesquisa identificou novas proteínas anti-virais no sistema circulatório desse inseto e perceberam a existência de enzimas desse sistema que hidrolisavam a sacarose em glicose e consequentemente aumentava a viabilidade do cultivo em relação ao controle (MARANGA et al., 2003). O segundo fator está correlacionado com a importância das carboidrases em Lepidoptera, pois essas enzimas são as principais responsáveis pela manutenção das funções vitais desses insetos (SHARIFLOO et al., 2016).

Diante da importância das carboidrases e o fato da *Lonomia obliqua* ser polífaga, resolvemos também avaliar a influência das dietas nas atividades dessas enzimas tanto no sistema digestório como no sistema circulatório dessa lagarta. Como demonstrado, as variações das dietas foliares fornecidas as lagartas dessa espécie antes da extração das cerdas para produção do soro anti-lonômico afetam diretamente os perfis de atividades das carboidrases intestinais e isso pode resultar na alteração da digestão e consequentemente na absorção dos nutrientes. Desta forma, a alteração das fontes alimentares pode impactar diretamente o veneno dessa lagarta e conseguinte a qualidade do soro anti-lonômico. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese, uma vez que as mudanças das dietas não afetaram as atividades das carboidrases presentes na hemolinfa.

Esse estudo confirmou a presença algumas carboidrases na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, porém o seu papel ainda não é claro, embora fique evidente que são enzimas distintas das isoformas identificadas no intestino destes animais. Entretanto, há uma hipótese de que essas enzimas podem ter participação no processo de intoxicação humana pelo veneno desse animal, pois acredita-se que a hemolinfa está correlacionada com o envenenamento (SPADACCI-MORENA et al., 2016; VEIGA; BLOCHTEIN; GUIMARÃES, 2001).

A caracterização detalhada da catálise nas carboidrases estudadas bem como a obtenção de suas estruturas e de interações com substratos e inibidores poderão permitir o desenho de novas moléculas e o avanço de estratégias para o controle desse inseto, juntamente com o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a predação.

As carboidrases identificadas nesse trabalho, observando os substratos em que atuam e suas especificidades poderiam ser propostas como enzimas de aplicação biotecnológica como são os casos das fucosidases que poderiam ser aplicadas em kits de diagnósticos dada a associação destas enzimas com diversos tipos de patologias incluindo câncer; das amilases na indústria têxtil e alimentícia; das celulasas no caso do desenvolvimento de fontes alternativas de energia e de biocombustíveis. Entretanto, o uso real de uma enzima para aplicações biotecnológicas não depende de suas especificidades, mas sim de sua eficiência catalítica em comparação com outras fontes destas mesmas atividades e custo de produção. Portanto, este trabalho é o primeiro passo na identificação de *Lonomia obliqua* como fonte de diversas carboidrases. Os próximos passos seriam a produção heteróloga destas enzimas e estudos de viabilidade e melhoramento da eficiência catalítica.

Portanto, para que isso ocorra é necessário o incentivo de mais pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir das carboidrases de *Lonomia obliqua* e também mais estudos que investiguem a elucidação dessas enzimas nos processos fisiológicos desse animal e isso auxiliará nos fatores relacionados ao controle desse inseto e consequentemente a diminuição dos casos de acidentes no Brasil relacionados à *Lonomia obliqua* bem como a produção de veneno e soro pelo Instituto Butantan.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que:

- uma série de carboidrases foi identificada tanto na hemolinfa quanto no intestino de *Lonomia obliqua*, as quais participam da digestão inicial, intermediária e final de carboidratos. São elas:
- o pH ótimo das carboidrases de *Lonomia obliqua* é compatível com o pH ótimo destas carboidrases já descritas nos demais Lepidoptera;
- em geral, as enzimas apresentaram pH ótimo compatível com o seu local de atividade;
- as carboidrases indicam que além do papel essencial na digestão já descrito para enzimas presentes em outros Lepidoptera, algumas dessas carboidrases presentes na hemolinfa podem apresentar outros papéis fisiológicos. Uma possível hipótese seria o de processamento de açúcares presente em microrganismos adquirindo um papel de defesa;
- dois grupos de glicosídeo hidrolases estão envolvidos na hidrólise da sacarose presente em meio de cultura celular quando a hemolinfa de *Lonomia obliqua* é adicionada a estes meios: α -glucosidases (EC 3.2.1.20) e β -fructosidases (EC 3.2.1.26);
- as despolimerases envolvidas na digestão inicial estão presentes majoritariamente no conteúdo luminal e membrana peritrófica iniciando a digestão de carboidratos complexos como amido, celulose e pectina;
- as enzimas da hemolinfa não apresentaram variações das suas atividades comparativamente quando os animais foram alimentados em diferentes dietas. Já as enzimas intestinais sofrem alterações de acordo com a dieta, com exceção da α -fucosidase;
- as atividades de β -fructosidases e α -fucosidases foram isoladas do sistema digestório e da hemolinfa e a caracterização cinética das enzimas parcialmente isoladas indicam diferenças de afinidade e eficiência catalítica destas enzimas nos dois sistemas de *Lonomia obliqua*;
- as sequências protéicas das frações enriquecidas com β -fructosidases e α -fucosidase nos diferentes sistemas da *Lonomia obliqua* foram confirmadas com as sequências do transcriptoma do corpo inteiro da lagarta.

REFERÊNCIAS^{1*}

- ABRAHAM, E. G.; NAGARAJU, J.; DATTA, R.K. Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 8, p. 867-873, 1992.
- ALI, S. et al. Leukocyte extravasation: an immunoregulatory role for alpha-L-fucosidase? **Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2407-2413, 2008.
- ALVAREZ FLORES, M. P. et al. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 4, p. 1216-1223, 2006.
- AMARAL, L. I. V. D. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, p. 425-431, 2007.
- AMIN, S. et al. Protein aggregation, particle formation, characterization and rheology. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 438-449, 2014.
- ANAND, A. A. et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 107, 2010.
- ASADI, A. et al. Biochemical characterization of midgut, salivary glands and haemolymph α -amylases of *Naranga aeneascens*. **Bulletin of Insectology**, v. 63, n. 2, p. 175-181, 2010.
- AZEVEDO, T. R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Purification and characterization of three beta-glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 81-92, 2003.
- BAEVA, M.; PANCHEV, I. Investigation of the retaining effect of a pectin-containing edible film upon the crumb ageing of dietetic sucrose-free sponge cake. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 343-348, 2005.
- BAKER, J. E. Interaction of partially-purified amylases from larval *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) with amylase inhibitors from wheat. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 93, n. 2, p. 239-246, 1989.
- BAKER, J. E.; WOO, S. M. β -Glucosidases in the rice weevil *Sitophilus oryzae*: purification, properties and activity levels in wheat and legume-feeding strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 495-504, 1992.

¹ *De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BERENBAUM, M. Adaptive Significance of Midgut pH in Larval Lepidoptera. **The American Naturalist**, v. 115, n. 1, p. 138-146, 1980.

BERGER, M. et al. *Lonomia obliqua* venomous secretion induces human platelet adhesion and aggregation. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 30, n. 3, p. 300-310, 2010.

BERTEAU, O. et al. Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 273-282, 2002.

BEYENBACH, K. W. The plasticity of extracellular fluid homeostasis in insects. **The Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 17, p. 2596, 2016.

BORGES DE MELO, E.; GOMES, A.S.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006.

BOWMAN, C. E. Digestion in the soil predatory mite *Pergamasus longicornis* (Berlese) (Acari: Mesostigmata: Parasitidae)—Detectable hydrolases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 385-391, 1987.

BRAGATTO, I. et al. Characterization of a beta-1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to beta-glucan-binding proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 12, p. 861-872, 2010.

BUJACZ, A. et al. Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. **FEBS Journal**, v. 278, n. 10, p. 1728-1744, 2011.

BURTON, R. L. Carbohydrate digestion in the adult moth *Heliothis zea*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 11, p. 1855-1857, 1975.

BURTON, R. L.; STARKS, K.J.; SAUER, J.R. β -fructosidase activity in the silk glands of *Heliothis zea*. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, n. 8, p. 1045-1048, 1976.

CALDERON-CORTÉS, N. et al. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.43, p. 45-71, 2012.

CARDOSO, A. E. C.; HADDAD JUNIOR, V. Acidentes por lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 571-578, 2005.

CARMO, A. C. V. et al. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Research**, v. 94, n. 2, p. 126-130, 2012.

CARNEIRO, C. N. et al. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 11, p. 1093-1101, 2004.

CARRIJO-CARVALHO, L. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The venom of the *Lonomia* caterpillar: An overview. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 741-757, 2007.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DE SANTA CATARINA. CITSC. Santa Catarina. Disponível em:< <http://www.cit.sc.gov.br> >. Acesso em: 07 de nov. 2016.

CHAN, S.Y.; CHOO, W.S. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3752-3758, 2013.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**: Cambridge University Press, Cambridge, U.K., Nova York, 1998.

CHARARAS, C. et al. Purification of three cellulases from the xylophageous larvae of *Ergates faber* (Coleoptera:Cerambycidae). **Insect Biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 213-218, 1983.

CHEN, H.Q. et al. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1206-1212, 2009.

DAIMON, T. et al. Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 22, p. 15271-15279, 2008.

DE CAMARGO, A. J. A.; BECKER, V. O. Saturniidae (Lepidoptera) from the Brazilian Cerrado: Composition and Biogeographic Relationships1. **Biotropica**, v. 31, n. 4, p. 696-705, 1999.

DEY, P.M; DIXON, R.A. **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**. Londres: Royal Holloway College, 1986.

DOW, J. A. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. **The American Journal of Physiology**, v. 246, n. 4, p. 633-636, 1984.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ENDO, T. et al. Purification and Characterization of an α -L-Fucosidase from *Pomacea canaliculata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 302, n. 1, p. 152-160, 1993.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Rev**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, n. 7-8, p. 596-601, 2001.

EVANS, W. A. L.; PAYNE, D. W. Carbohydrases of the alimentary tract of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 5, p. 657-674, 1964.

FENG, C. et al. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 2, p. 139-146, 2008.

FERREIRA, A. H. P. et al. Purification, molecular cloning, and properties of a β -glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 11, p. 1065-1076, 2001.

FERREIRA, C. et al. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, n. 4, p. 631-640, 1994.

FERREIRA, C.; TORRES, B.B.; TERRA, W.R. Substrate Specificities of Midgut β -Glycosidases from Insects of Different Orders. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, n. 1, p. 219-225, 1998.

FLEET, G. W. J. et al. Synthesis from D-glucose of 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol, a potent [small α]-L-fucosidase inhibitor. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 13, p. 841-842, 1985.

FRANCO, O. L. et al. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.

FRANZL, S.; ACKERMANN, I.; NAHRSTEDT, A. Purification and characterization of a β -glucosidase (linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii* Esper, 1783 (Insecta, Lepidoptera). **Experientia**, v. 45, n. 8, p. 712-718, 1989.

GARCIA, C. M. **Estudo dos acidentes com a lagarta *Lononia obliqua* Walker, 1855 no Paraná - período 1989-2001**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Curso de Pós-Graduação em Geografia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

GENTA, F. A. et al. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 6, p. 593-601, 2006.

GENTA, F. A.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Action pattern, specificity, lytic activities, and physiological role of five digestive beta-glucanases isolated from *Periplaneta americana*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 33, n. 11, p. 1085-1097, 2003.

GHADAMYARI, M.; HOSSEININAVEH V.; SHARIFI M. et al. Partial biochemical characterization of alpha- and beta-glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 3, p. 197-204, 2010.

GILL, P. K.; MANHAS, R. K.; SINGH, P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 7, p. 894-902, 2006.

GOMES DE SIQUEIRA, C. et al. Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

GRECO, K. N. et al. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Research**, v. 84, n. 1, p. 84-90, 2009.

GRINGORTEN, J. L. Ion regulation in the larval lepidopteran midgut and the response to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Pesticide Science**, v. 55, p. 604-606, 1999.

GRINGORTEN J. L.; CRAWFORD D. N.; HARVEY W. R. High pH in the ectoperitrophic space of the larval lepidopteran midgut. **Journal of Experimental Biology**, v. 183, p. 353-359, 1993.

GROSSMANN, G. A.; TERRA, W. R. Alpha-galactosidases from the larval midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 1, p. 109-122, 2001.

HANDKE, B. et al. The hemolymph proteome of fed and starved *Drosophila* larvae. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 67208-67218, 2013.

HO, C. W. et al. Discovery of different types of inhibition between the human and *Thermotoga maritima* alpha-fucosidases by fuconojirimycin-based derivatives. **Biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 5695-5702, 2006.

HOTTA, C. T. et al. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75-87, 2010.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 3, p. 215-223, 2004.

INTRA, J.; CENNI F.; PEROTTI, M.E. An alpha-L-fucosidase potentially involved in fertilization is present on *Drosophila* spermatozoa surface. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, n. 9, p. 1149-1158, 2006.

INTRA, J.; PEROTTI, M.E.; PASINI, E. Cloning, sequence identification and expression profile analysis of α -L-fucosidase gene from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Journal of Insect Physiology**, v.57, p. 452-461, 2011.

IRSHAD, M. et al. Biotechnological valorization of pectinolytics and their industrial applications: a review. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1649-1654, 2014.

JENG, W. Y. et al. Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **Journal Structural Biology**, v. 173, n. 1, p. 46-56, 2011.

JORDÃO, B. P. et al. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, n. 1, p. 29-37, 1999.

KAUR, R.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. et al. Structural features, substrate specificity, kinetic properties of insect alpha-amylase and specificity of plant alpha-amylase inhibitors. **Pestic Biochemistry Physiology**, v. 116, p. 83-93, 2014.

KAWAHARA, A. Y.; BREINHOLT, J. W. Phylogenomics provides strong evidence for relationships of butterflies and moths. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1788, 2014.

KIRSCH, R. et al. Horizontal gene transfer and functional diversification of plant cell wall degrading polygalacturonases: Key events in the evolution of herbivory in beetles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 0, p. 33-50, 2014.

KOTKAR, H. M. et al. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 8, p. 663-670, 2009.

KRESS, B. C. et al. Purification and characterization of I-cell disease alpha-L-fucosidase. **Journal Biological Chemistry**, v. 255, n. 3, p. 955-961, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAURY-KLEINTOP, L. D.; DAMJANOV I.; ALHADEFF J. A. et al. Characterization of mouse liver alpha-L-fucosidase. Demonstration of unusual basic isoelectric forms of the enzyme that appear to be developmentally regulated. **Biochemical Journal**, v. 230, n. 1, p. 75-82, 1985.

LAZAREVIC, J. et al. Effects of rearing density on larval growth and activity of digestive enzymes in *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Folia Biologica (Krakow)**, v. 52, n. 1-2, p. 105-112, 2004.

LEE, H. S.; STURM, A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. **Plant Physiology**, v. 112, n. 4, p. 1513-1522, 1996.

LEGLER, G.; STÜTZ, A. E.; IMMICH, H. Synthesis of 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-arabinitol (5-nor-L-fuco-1-deoxynojirimycin) and its application for the affinity purification and characterisation of α -L-fucosidase. **Carbohydrate Research**, v. 272, n. 1, p. 17-30, 1995.

LEMOINE, R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1465, n. 1-2, p. 246-262, 2000.

LI, X. et al. Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-10, 2015.

LI, Z. W. et al. Pathogen-origin horizontally transferred genes contribute to the evolution of Lepidopteran insects. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 341-356, 2011.

LISTINSKY, J. J.; SIEGAL, G.P.; LISTINSKY, C.M. The emerging importance of α -L-fucose in human breast cancer: a review. **American Journal Translational Research**, v. 3, n. 4, p. 292-322, 2011.

LIU, S. W. et al. Identification of essential residues of human alpha-L-fucosidase and tests of its mechanism. **Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 110-120, 2009.

LIU, T. W. et al. Role for alpha-L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 34, p. 14581-14586, 2009.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Reserach**, v. 42, n. Database issue, p. 490-495, 2014.

LORINI, L. M.; CORSEUIL, E. Aspectos Morfológicos de *Lononia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 373-379, 2001.

LUO, W. et al. Cloning and expression profiling of genes involved in glycometabolism in the midgut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Entomologica Sinica**, v. 56, n. 9, p. 965-973, 2013.

MARANA, S. R. et al. Investigation of the substrate specificity of a beta-glycosidase from *Spodoptera frugiperda* using site-directed mutagenesis and bioenergetics analysis. **European Journal Biochemistry**, v. 271, n. 21, p. 4169-4177, 2004.

MARANA, S. R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Purification and properties of a beta-glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 12, p. 1139-1146, 2000.

MARANGA, L. et al. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 1, p. 58-63, 2003.

MARTIN, M. M. Cellulose digestion in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 75, n. 3, p. 313-324, 1983.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, R. H. P. **Lepidóteros Brasileiros de Importância Médica**. 2th. ed. Rio de Janeiro: Sarvier, p.227-235, 1992.

MORAES, R. H. P. **Lagartas urticantes**. *Biológico*, São Paulo, v. 59, n. 2, p. 21-25, 1997

MORENO-CLAVIJO, E. et al. Exploring a Multivalent Approach to α -L-Fucosidase inhibition. **European Journal of Organic Chemistry**. v. 32, n. 1, p. 7328-7336, 2013.

MORETI, R.; PERRELLA, N. N.; LOPES, A. R. Carbohydrate digestion in ticks and a digestive α -L-fucosidase. **Journal Insect Physiology**, v. 59, n. 10, p. 1069-1075, 2013.

MORGAN, M. R. J. A qualitative survey of the carbohydrases of the alimentary tract of the migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 5, p. 1045-1053, 1975.

MUKESH, K. D. J. et al. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.

NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 1, p. 201-209, 1995.

NAKONIECZNY, M.; MICHALCZYK, K.; KEDZIORSKI, A. Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of *Apollo* butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, n. 10, p. 765-774, 2006.

NGERNYUANG, N. et al. Cloning and expression analysis of the *Bombyx mori* α -amylase gene (Amy) from the indigenous Thai silkworm strain, Nanglai. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 38, 2011.

NODA, H.; WATANABE, H.; SCRIVENER, A. M. et al. Diet and carbohydrate digestion in the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotheta hilaris*. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 11, p. 1039-1052, 1997.

OCHIAI, M.; NIKI, T.; ASHIDA, M. Immunocytochemical localization of Beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. **Cell and Tissue Research**, v. 268, n. 1, p. 431-437, 1992.

OPPERT, C. et al. Prospecting for cellulolytic activity in insect digestive fluids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 2, p. 145-154, 2010.

PADRO, M. et al. Cytotoxicity and enzymatic activity inhibition in cell lines treated with novel iminosugar derivatives. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, n. 2, p. 277-285, 2010.

PANKOKE, H.; BOWERS, M.D.; DOBLER, S. Influence of iridoid glycoside containing host plants on midgut β -glucosidase activity in a polyphagous caterpillar, *Spilosoma virginica* Fabricius (Arctiidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 12, p. 1907-1912, 2010.

PAUCHET, Y. et al. Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. **Journal Biological Chemistry**, v. 284, n. 4, p. 2214-2224, 2009.

PAUCHET, Y. et al. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. **Journal Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1629-1639, 2008.

PAUCHET, Y. et al. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 61-75, 2010.

PEDEZZI, R. et al. A novel β -fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a β -fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, n. 10, p. 31-38, 2014.

PENTZOLD, S. et al. Lepidopteran defence droplets - a composite physical and chemical weapon against potential predators. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22407-22418, 2016.

PERLER, F. B. Protein splicing mechanisms and applications. **IUBMB Life**, v. 57, n. 7, p. 469-476, 2005.

PERRELLA, N. N. et al. Characterization of α -L-fucosidase and other digestive hydrolases from *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 141, n. Parte A, p. 118-127, 2015.

PINTO, A. F. M. et al. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1103-1112, 2010.

POLLOCK, C. J. et al. The metabolism of sugars based upon sucrose. **BIOS Scientific Publishers**, v. 1, p. 47-60, 1999.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of beta-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 32, n. 6, p. 679-690, 2002.

PRATVIEL-SOSA, F. et al. Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pityocampa* larvae. Part I. Purification and some properties of an α -glucosidase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 77-81, 1986.

PRATVIEL-SOSA, F. et al. Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pityocampa* larvae—II. Purification and some properties of a broad specificity β -d-glucosidase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 173-178, 1987.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008.

REGIER, J. C. et al. A Large-Scale, Higher-Level, Molecular Phylogenetic Study of the Insect Order Lepidoptera (Moths and Butterflies). **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 58568-58591, 2013.

REGIER, J. C. et al. Toward reconstructing the evolution of advanced moths and butterflies (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 280, 2009.

REGLERO, A.; CABEZAS, J. A. Glycosidases of molluscs. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Chamelea gallina* L. **European Journal Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 379-387, 1976.

REGLERO, A.; CARRETERO, M. I.; CABEZAS, J. A. Increased serum alpha-L-fucosidase and beta-N-acetylglucosaminidase activities in diabetic, cirrhotic and gastric cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 103, n. 2, p. 155-158, 1980.

REIS, C. V. et al. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. **Biochemical Journal**, v. 398, n. 2, p. 295-302, 2006.

REIS, C. V. et al. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. **Thrombosis Research**, v. 102, n. 5, p. 427-436, 2001.

ROCHA, I. F. et al. Proteomic profile of hemolymph and detection of induced antimicrobial peptides in response to microbial challenge in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 2, p. 511-516, 2016.

SÁNCHEZ-FERRER, Á. et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1247, n. 1, p. 1-11, 1995.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G.; Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SANTOS, C. D.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 9, p. 707-714, 1983.

SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. **Insect Biochemistry**, v. 16, n. 4, p. 691-700, 1986a.

SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. Midgut α -glucosidase and β -fructosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes: Physical and kinetic properties. **Insect Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 819-824, 1986b.

SANTOS, S. F. D. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de tecnologia do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2007.

SCANLIN, T. F.; GLICK, M. C. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 241-253, 1999.

SHAIKH, F. A. et al. Identifying the Catalytic Acid/Base in GH29 α -L-Fucosidase Subfamilies. **Biochemistry**, v. 52, n. 34, p. 5857-5864, 2013.

SHARIFLOO, A. et al. Characterization of a Digestive alpha-Amylase in the Midgut of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). **Frontiers Physiology**, v. 7, p. 96, 2016.

SHELOMI, M. et al. Horizontal Gene Transfer of Pectinases from Bacteria Preceded the Diversification of Stick and Leaf Insects. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26388, 2016.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8256-8261, 2008.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. SINAN. Brasília. Disponível em : <[http:// portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan](http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan)>. Acesso em 07 nov. 2016.

SLAYTOR, M. Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 775-784, 1992.

SMITH, P.K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 76-85, 1985.

SOUZA, A. P. et al. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 2005.

SOUZA, P. M. D.; MAGALHÃES, P. R. D. O. E. Application of microbial α -amylase in industry - A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SPADACCI-MORENA, D. D. et al. The urticating apparatus in the caterpillar of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Toxicon**, v. 119, p. 218-224, 2016.

STROBL, S. et al. Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 3, p. 617-628, 1998.

STROBL, S. et al. A novel strategy for inhibition of alpha-amylases: yellow meal worm alpha-amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 7, p. 911-921, 1998.

SULZENBACHER, G. et al. Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. **Journal Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13119-13128, 2004.

SUMIDA, M.; YUAN, X.L.; MATSUBARA, F. Purification and some properties of soluble β -fructofuranosidase from larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 2, p. 273-284, 1994.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 4, p. 675-734, 1988.

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

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L.I., IATROV, K., GILL, S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. 4th ed. San Diego: Elsevier Oxford, 2005. p. 174-224.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: L. I. GILBERT (Ed.). **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 365-418.

THAKUR, B. R. et al. Chemistry and uses of pectin--a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

TONELOTTO, M. **Produção de celulasas, purificação e caracterização bioquímico-cinética da β-galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica**. 2012. 175 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 338-394, 2007.

VALENCIA-JIMENEZ, A. et al. Digestive alpha-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 6, p. 575-579, 2008.

VATANPARAST, M. et al. Pectinase and cellulase activity in the digestive system of the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 4, p. 555-561, 2012.

VEIGA, A. B.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J. A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1343-1351, 2001.

WANG, H. et al. A novel sucrose hydrolase from the bombycid silkworms *Bombyx mori*, *Trilocho varians*, and *Samia cynthia ricini* with a substrate specificity for sucrose. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 61, n. 1, p. 46-52, 2015.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual Review Entomology**, v. 55, p. 609-632, 2010.

WIKIMEDIA COMMONS. Estados Unidos. Disponível em:< <https://commons.wikimedia.org>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

WILLEMS, P. J. et al. Spectrum of mutations in fucosidosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, n. 1, p. 60-67, 1999.

WINCHESTER, B. et al. Inhibition of alpha-L-fucosidase by derivatives of deoxyfuconojirimycin and deoxymannojirimycin. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 1, p. 277-282, 1990.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**. 2016.

WOLFF, J. L. C. et al. Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n. 3, p. 137-145, 2002.

WU, H.J. et al. Structural Basis of α -Fucosidase Inhibition by Iminocyclitols with K_i Values in the Micro- to Picomolar Range. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 2, p. 337-340, 2010.

WYATT, G. R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 4, p.287-360, 1967.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

XU, W. et al. Property of midgut alpha-amylase from *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and its responses to potential inhibitors in vitro. **Journal Insect Science**, v. 14. p. 277-282, 2014.

YAPO, B. M. et al. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1356-1364, 2007.

YEZDANI, E. et al. Enzymatic properties of alpha-amylase in the midgut and the salivary glands of mulberry moth, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 1, p. 17-22, 2010.

YU, S. J. β -Glucosidase in four phytophagous Lepidoptera. **Insect Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 103-108, 1989.

ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; MOLLER, B. L. Cyanogenesis in plants and arthropods. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1457-1468, 2008.

ZAGROBELNY, M. et al. Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 293-306, 2004.

ZIBAE, A. et al. Characterization of α -amylase in the midgut and the salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 11, n. 4, p. 201-205, 2008.

ZIBAE, A.; BANDANI, A. R.; RAMZI, S. Enzymatic properties of α - and β -glucosidases extracted from midgut and salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 332, n. 7, p. 633-641, 2009.