



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DANIELLE ARAGÃO PEREIRA

PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES EM LÁTEX VEGETAL E
INTESTINO DE LAGARTAS: ASPECTOS SOBRE RESISTÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE DAS PLANTAS ALVO

FORTALEZA-CE

2014

DANIELLE ARAGÃO PEREIRA

**PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES EM LÁTEX VEGETAL E
INTESTINO DE LAGARTAS: ASPECTOS SOBRE RESISTÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE DAS PLANTAS ALVO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- P49p Pereira, Danielle Aragão.
 Proteases e inibidores de proteases em látex vegetal e intestino de lagartas: aspectos sobre resistência e suscetibilidade das plantas alvo / Danielle Aragão Pereira – 2014.
 115 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
 Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Plantas lactíferas. 2. Mecanismos de Defesa. 3. Atividade enzimática. 4. Lagarta. I. Título.

DANIELLE ARAGÃO PEREIRA

PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES EM LÁTEX VEGETAL E
INTESTINO DE LAGARTAS: ASPECTOS SOBRE RESISTÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE DAS PLANTAS ALVO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Tese aprovada em: 23 / Junho / 2014

BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Cleverson Diniz T. de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dra. Ana Lúcia Pontes Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Frederico Bruno Mendes B. Moreno
Universidade de Fortaleza - UNIFOR



Dra. Ana Cristina de O. M. Moreira
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.

João 3:16

Dedico este trabalho
aos meus avós, Gerardo
Vasconcelos Aragão e Maria
Alves Torres (ambos *in*
memorian).

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Universidade de Fortaleza (Unifor), através do laboratório de Desenvolvimento de Fármacos.

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do fornecimento da bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, por toda atenção dispensada, pelo interesse e competência na orientação do trabalho. Agradeço ainda sua paciência frente as minhas limitações, os conselhos, o apoio e a preocupação demonstrada durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas** pelas ideias, conselhos, presteza em tirar dúvidas e por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao **Frederico Bruno Mendes Batista Moreno** (Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos – Unifor) pelo auxílio nos experimentos relativos ao isolamento das proteases e espectrometria de massas. Além disso, por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.

À Profa. **Dra. Ana Lúcia Pontes Freitas** e à **Prof. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira** por terem aceitado participar da banca examinadora. Suas sugestões foram importantes para melhorar a qualidade do trabalho.

Ao **Prof. Dr Jeanlex S. Sousa** e a bolsista de pós-doutorado **Luciana M. R. Alencar**, ambos do Laboratório de Microscopia Avançada (UFC), por tornarem possível as análise da membrana peritrófica através de Microscopia de Força atômica

A todos os colegas do laboratório de Biologia e Bioquímica de Proteínas Laticíferas. À **Carolina Viana** pela imensa ajuda em todas as etapas deste trabalho. À **Raquel Sombra** pela ajuda com experimentos de biologia molecular. À **Ayrles Brandão, Diego Pereira, Eliane Silva, Beatriz Nishi, Bárbara Jéssica, Maria Zelândia, Wallace da Cruz, Natalia Fernandes, Mayara Matos, Felipe Sousa e Juliany Fátima** pela ajuda, amizade e apoio tão preciosos. Agradeço a todos os estudantes deste laboratório, simplesmente todos me ajudaram em alguma etapa. Quem nunca preparou um gel para mim? Quem? Sem a ajuda de vocês, eu não

teria conseguido. À **Lídia Maria** (*in memoriam*) por sua amizade e ajuda nos experimentos, um pedaço desta tese é sua. Sentimos a ausência desta pessoa querida.

A todos os colegas que fazem parte do curso do Doutorado em Bioquímica, pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia. Principalmente, às minhas grandes amigas **Camila Barbosa** e **Jacilane Ximenes**, além do meu amigo **Tiago Lustosa**.

Ao meu amado marido **Herbenildo de Souza**, pelo amor, companheirismo e apoio para vencer os obstáculos do dia-a-dia. Agradeço ainda à família do meu marido, que agora também é minha, representada pela minha sogra **Anatália de Souza Andrade**, por ter cuidado dos meus filhos com tanto amor e carinho, sem a sua ajuda eu não teria conseguido concluir este trabalho.

Aos meus irmãos **Junior**, **Gledson**, **Tiago** e **Mikaelle** que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram. E aos meus pais **Carlos e Socorro**, que são os meus principais exemplos de força, determinação, honestidade e humildade. Ao meu avô Gerardo e minha avó Maria (mainha) pela imensa lição de vida que deixaram. Amo vocês!

Principalmente, ao **Senhor Jesus** por me dar forças para seguir em frente e nunca desistir.

SUMÁRIO

| Item | Título | Página |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | Látex | 18 |
| 1.1.1 | Composição bioquímica do látex | 19 |
| 1.1.2 | Látex e defesa vegetal contra herbivoria | 19 |
| 1.1.2.1 | Proteínas de fluidos laticíferos envolvidas na defesa contra insetos | 20 |
| 1.1.2.1.1 | Proteases de fluidos laticíferos | 21 |
| 1.1.2.1.2 | Inibidores de proteases | 23 |
| 1.2 | Descrição das espécies vegetais estudadas | 24 |
| 1.2.1 | <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br. | 24 |
| 1.2.2 | <i>Cryptostegia Grandiflora</i> R.Br | 27 |
| 1.2.3 | <i>Plumeria rubra</i> Linn. | 29 |
| 1.3 | Estratégias de adaptação de insetos às plantas laticíferas | 30 |
| 1.4 | Membrana Peritrófica (MP) | 33 |
| 1.4.1 | Composição química e estrutura de MP | 36 |
| 1.4.1.1 | Proteínas de MP | 37 |
| 1.5 | Espécies de insetos estudadas | 39 |
| 1.5.1 | <i>Danaus plexippus</i> L. – monarca | 39 |
| 1.5.2 | <i>Pseudosphinx tetrio</i> L. | 41 |
| 2 | OBJETIVOS | 43 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 44 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 | Reagentes | 46 |
| 4.2 | Material Animal | 46 |
| 4.3 | Material Vegetal | 47 |
| 4.4 | Coleta e fracionamento do látex | 47 |
| 4.5 | Manutenção da <i>D. plexippus</i> em laboratório | 47 |
| 4.6 | Obtenção dos extratos intestinais | 48 |
| 4.7 | Caracterização bioquímica do extrato intestinal de <i>P. tetrio</i> (EIPt) | 48 |

| | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7.1 | Eletroforese em gel de poliacrilamida | 48 |
| 4.7.2 | Zimograma para detecção de atividade proteolítica | 49 |
| 4.7.3 | Ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato | 49 |
| 4.7.4 | Ensaio de atividade proteolítica utilizando BANA como substrato | 49 |
| 4.7.5 | Ensaio de atividade proteolítica utilizando BApNA como substrato | 50 |
| 4.7.6 | Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica | 50 |
| 4.7.7 | Ensaio de inibição de proteases utilizando azocaseína como substrato | 51 |
| 4.8 | Digestão das proteínas de látex (PL) por proteases intestinais de <i>P. tetrio</i> | 51 |
| 4.9 | Bioensaio | 52 |
| 4.9.1 | Preparação da dieta artificial | 52 |
| 4.9.2 | Efeito das frações PL sobre o desenvolvimento de <i>D. plexippus</i> | 54 |
| 4.10 | Purificação de proteases cisteínicas do látex de <i>C. procera</i> (PCCp) | 54 |
| 4.11 | Parcial caracterização das PCCps | 55 |
| 4.11.1 | Determinação dos pontos isoelétricos de PCCp | 56 |
| 4.11.2 | Análise das PCCps com solução reveladora de glicoproteínas (Schiff) | 57 |
| 4.12 | Ensaio de inibição de proteases pelas frações PL aquecidas (PL-AQ) | 57 |
| 4.13 | Efeito das frações PL-AQs sobre o desenvolvimento de <i>D. plexippus</i> | 58 |
| 4.14 | Ensaio de inibição de proteases pelos extratos intestinais aquecidos (EI-AQ) | 58 |
| 4.15 | Análise da membrana peritrófica (MP) de <i>D. plexippus</i> | 59 |
| 4.15.1 | Excisão da MP | 59 |
| 4.15.2 | Extração de proteínas da MP | 59 |
| 4.15.3 | Detecção de glicoproteínas na MP | 60 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.15.4 | Análise proteômica da MP | 60 |
| 4.15.5 | Análise <i>in vivo</i> da degradação de proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> | 61 |
| 4.15.6 | Análise <i>in vitro</i> da degradação de proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> | 61 |
| 4.15.7 | Microscopia de força atômica da MP de <i>D. plexippus</i> | 62 |
| 4.16 | Análise estatística | 63 |
| 5 | RESULTADOS | 64 |
| 5.1 | Caracterização da atividade proteolítica do extrato intestinal de <i>P. tetrio</i> (EIPt) | 64 |
| 5.2 | Digestão de proteínas do látex por proteases intestinais de <i>P. tetrio</i> | 67 |
| 5.3 | Desenvolvimento de larvas de <i>D. plexippus</i> alimentadas com dieta artificial adicionadas de proteínas do látex | 69 |
| 5.4 | Purificação e caracterização de proteases cisteínicas do látex de <i>C. procera</i> (PCCp) | 70 |
| 5.5 | Inibição da atividade proteolítica dos extratos intestinais pelas frações PL-AQ | 73 |
| 5.6 | Inibição de proteases pelos extratos intestinais de <i>D. plexippus</i> e <i>P. tetrio</i> | 74 |
| 5.7 | Análise das proteínas da membrana peritrófica (MP) de <i>D. plexippus</i> | 78 |
| 5.8 | Efeito de proteínas de látex sobre a MP de <i>D. plexippus</i> | 82 |
| 6 | DISCUSSÃO | 90 |
| 7 | CONCLUSÃO | 104 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| Número | Título | Página |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Aspectos gerais de <i>Calotropis procera</i> (A). Detalhes da flor (B), fruto (C) e semente (D). | 25 |
| 2 | Aspectos gerais de <i>Cryptostegia grandiflora</i> (A). Detalhes da flor (B), fruto (C) e semente (D). | 28 |
| 3 | Figura 3 - Aspectos gerais (A) de <i>Plumeria rubra</i> . Detalhes das flores brancas (B), róseas (C) e vermelhas (D). | 30 |
| 4 | Corte da nervura central (A/C) em laticíferos não articulados e trincheiras em laticíferos articulados (B/D). | 31 |
| 5 | Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos | 33 |
| 6 | Microscopia eletrônica de varredura do trato digestório de <i>Diatraea grandiosella</i> (Lepidoptera: Crambidae). | 34 |
| 7 | Rede de quitina da MP com regular (A) e irregular (B) organização. | 36 |
| 8 | Fases do ciclo de vida de <i>Danaus plexippus</i> | 40 |
| 9 | Trincheira circular feita por larvas de <i>D. plexippus</i> no primeiro estágio de vida. | 40 |
| 10 | Ciclo de vida de <i>Pseudosphinx tetrio</i> . | 42 |
| 11 | Corte da nervura central da folha de <i>P. rubra</i> por larvas de <i>P. tetrio</i> . | 42 |
| 12 | Eletroforese (A) em gel de poliacrilamida (12,5%) e zimograma (B) para detecção de proteases do extrato intestinal de <i>P. tetrio</i> (5º estágio). | 64 |
| 13 | Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de <i>P. tetrio</i> utilizando azocaseína (◇), BApNA (■) e BANA (▲) como substratos. | 65 |
| 14 | Termo estabilidade da atividade proteolítica do extrato intestinal de <i>P. tetrio</i> | 66 |
| 15 | Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas de <i>P. tetrio</i> (5º estágio) | 67 |
| 16 | Digestão de BSA, PLCp, PLCg e PLPr pelo extrato intestinal de larvas de <i>P. tetrio</i> (5º estágio). | 68 |
| 17 | Desenvolvimento de larvas de <i>D. plexippus</i> alimentadas com | 69 |

| | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | dieta artificial contendo 1% de PLCg (Δ) ou PLPr (\diamond) e dieta controle (\circ). | |
| 18 | Purificação de isoformas de proteases cisteínicas do látex de <i>C. procera</i> (PCCp) | 71 |
| 19 | Eletroforese bidimensional das proteases cisteínicas de <i>C. procera</i> (PCCp) 1, 2 e 3. | 72 |
| 20 | Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% das PCCps com revelação para glicoproteínas | 73 |
| 21 | Efeito de PLCp-AQ, PLCg-AQ e PLPr-AQ sobre a atividade proteolítica dos extratos intestinais de <i>D. plexippus</i> (\bullet), <i>P. tetrio</i> (\blacktriangle), papaína (\blacklozenge) e tripsina (\blacksquare) | 75 |
| 22 | Desenvolvimento de larvas de <i>D. plexippus</i> alimentadas com dieta artificial contendo 1% de PLCp-AQ (\square), PLCg-AQ (Δ) e PLPr-AQ (\diamond) e dieta controle (\circ) | 76 |
| 23 | Efeito de EIDp-AQ e EIPt-AQ sobre a atividade proteolítica de PLCp (\square), PLCg (\diamond), PLPr (Δ), papaína (\blacklozenge) e tripsina (\blacksquare). | 77 |
| 24 | Inibição de proteases purificadas do látex de <i>C. procera</i> (PCCp \blacksquare) por EIDp-AQ e EIPt-AQ | 78 |
| 25 | Extração de proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> (5 ^o estágio larval de desenvolvimento) | 79 |
| 26 | SDS-PAGE da MP de <i>D. plexippus</i> com revelação de glicoproteínas | 79 |
| 27 | Proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> (5 ^o estágio) | 80 |
| 28 | Análise in vivo da degradação de proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> pelas frações PLs | 82 |
| 29 | Análise da degradação de proteínas da MP por proteases serínicas e cisteínicas. | 83 |
| 30 | Análise da degradação das proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> pelas frações PLs | 84 |
| 31 | Análise da degradação das proteínas da MP de <i>D. plexippus</i> por PCCp1, 2 e 3. | 85 |
| 32 | Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de MPs de <i>D. plexippus</i> (5 ^o estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala | 86 |

- 50 μm).
- 33 Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de MPs de *D. plexippus* (5^o estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 30 μm). 87
- 34 Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de MPs de *D. plexippus* (5^o estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 20 μm). 88
- 35 Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de MPs de *D. plexippus* (5^o estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 10 μm). 89

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Título | Página |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1. | Ingredientes da dieta artificial de <i>D. plexippus</i> (larvas) | 53 |
| 2. | Composição da mistura de vitaminas utilizada na dieta artificial da larva monarca | 54 |
| 3. | Pontos isoeletricos dos spots observados nas eletroforeses bidimensionais de PCCps | 72 |
| 4. | Proteínas identificadas da MP de <i>D. plexippus</i> (5º estágio) | 81 |

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

| | |
|-------|-------------------------------------------------------|
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| BANA | N-benzoil-arginina-naftitilamida |
| BApNA | α -benzoil-DL-arginina- p -nitroanilida |
| Da | Dalton |
| DMACA | 4-(dimetilamino)-cinamaldeído |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EI | Extrato intestinal |
| EI-AQ | Extrato intestinal - aquecido |
| EIDp | Extrato intestinal de <i>Danaus plexippus</i> |
| EIPt | Extrato intestinal de <i>Pseudosphinx tetrio</i> |
| E-64 | Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidido)-butano |
| IAA | Iodoacetamida |
| nm | Nanômetro |
| PL | Proteínas do Látex |
| PL-AQ | Proteínas do látex - aquecida |
| PLCg | Proteínas do Látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i> |
| PLCp | Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i> |
| PLPr | Proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i> |
| PMSF | Fenilmetilsulfonil flúor |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| TCA | Ácido tricloro acético |
| Tris | Tris-hidroxiaminometano |
| UA | Unidade de Atividade |

RESUMO

Proteases e inibidores de proteases em látex vegetal e intestino de lagartas: aspectos sobre resistência e suscetibilidade das plantas alvo

O látex vegetal é produzido e estocado em sistemas de canais formados por células altamente especializadas, os laticíferos. Uma característica marcante destes fluidos é a presença de sistemas proteolíticos complexos. Muitos estudos relatam que proteínas de defesa contra insetos e fungos são encontradas em látex. No entanto, alguns insetos sobrepõem esta defesa e alimentam-se de plantas laticíferas, como *Pseudosphinx tetrio* e *Danaus plexippus*, ambas da ordem Lepidoptera. As bases bioquímicas da resistência de insetos às proteínas defensivas do látex ainda não são amplamente elucidadas. Esta problemática foi abordada neste trabalho. Inicialmente a atividade proteolítica do extrato intestinal de *P. tetrio* foi caracterizada e avaliada sua capacidade de degradar as proteínas do látex de sua planta hospedeira, *Plumeria rubra*, bem como de plantas laticíferas não hospedeiras (*Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*). Além disso, foi avaliado se inibidores de proteases de fluidos laticíferos (*C. procera*, *P. rubra* e *Cr. grandiflora*) inibem as proteases intestinais de *P. tetrio* e *D. plexippus* e vice-versa. Em adição, foi analisado o efeito de enzimas laticíferas sobre a membrana peritrófica (MP) de *D. plexippus*. As proteases intestinais de *P. tetrio* são predominantemente do tipo serínica e suas atividades são maiores em pHs básicos. O extrato intestinal de *P. tetrio* rapidamente e completamente digeriu as proteínas do látex de sua planta hospedeira e de *C. procera*, bem como digeriu parcialmente as proteínas do látex de *Cr. grandiflora*. Larvas de *D. plexippus* se desenvolveram plenamente quando alimentadas com dieta artificial contendo 1% das frações proteicas dos látex de plantas não hospedeiras. Ensaio *in vitro* indicaram que ambos, extratos intestinais e látex das espécies em estudo, possuem inibidores de proteases serínicas e cisteínicas. Inibidores provenientes dos fluidos laticíferos em estudo inibiram a atividade proteolítica dos extratos intestinais de ambas as larvas. Entretanto, análise *in vivo* demonstrou que estes inibidores não afetam o desenvolvimento de *D. plexippus*. Somente o extrato intestinal de *D. plexippus* apresentou atividade inibidora de proteases do látex de sua planta hospedeira (*Calotropis procera*). Apenas discretas mudanças foram observadas no perfil proteico das MPs de *D. plexippus* submetidas às frações proteicas dos fluidos laticíferos *in vivo*, enquanto que o tratamento *in vitro* resultou em danos mais acentuados. A partir dos resultados obtidos conclui-se que proteólise e a inibição de proteólise fazem parte do sistema defensivo das larvas especialistas em plantas laticíferas e de suas plantas hospedeiras. Embora inibidores de proteases de fluidos laticíferos sejam capazes de inibir as proteases intestinais das larvas (*in vitro*), *in vivo*, a habilidade das proteases intestinais em prontamente digerir as proteínas do látex parece ser crucial para a sobreposição da defesa vegetal.

ABSTRACT

Proteases and protease inhibitors from plant latex and gut of caterpillars: insights into the resistance and susceptibility of target plants

Plant latex is produced and stored in channels formed by highly specialized cells structures. A remarkable feature of these fluids is the presence of complex proteolytic systems. Many studies report that latex possesses a variety of defense proteins against insects and fungi. However, some insects overlap this defense and feed on latex-producing plants, for example *Pseudosphinx tetrio* and *Danaus plexippus*, both of the order Lepidoptera. The biochemical aspects of insect resistance to latex defense proteins are still not widely elucidated. This issue was addressed in this work. Initially, the proteolytic activity of *Pseudosphinx tetrio* gut was characterized and evaluated in its ability to degrade latex proteins of its host plant (*Plumeria rubra*) and non-host plants (*Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*). Furthermore, we assessed whether protease inhibitors from latex fluids (*C. procera*, *P. rubra* and *Cr. grandiflora*) inhibit intestinal proteases from *P. tetrio* and *D. plexippus* and vice versa. The effect of latex enzymes on peritrophic membrane (PM) of *D. plexippus* was also assessed. Intestinal proteases from *P. tetrio* are predominantly of serine type and their activities are higher in basic pHs. *P. tetrio* gut proteases rapidly and completely digested latex proteins of its host plant and *C. procera* and partially digested proteins from *Cr. grandiflora*. *D. plexippus* larvae were not affected when fed on artificial diet containing latex proteins (1%) from non-host plants. In vitro assays detected serine and cysteine peptidase inhibitors in both gut homogenates and latex fluids. Protease inhibitors from latex inhibited the proteolytic activity of gut homogenates of both larvae. Nevertheless, in vivo analysis demonstrated that latex inhibitors do not affect the development of *D. plexippus*. Only the gut homogenate from *D. plexippus* showed inhibitory activity towards proteases latex from its host plant (*Calotropis procera*). Slight changes were observed in the protein profile of the PMs from *D. plexippus* subjected to latex protein fractions in vivo, whilst in vitro treatment resulted in more severe damage. This study concludes that proteolysis and inhibition of proteolysis are involved in the defensive systems of both caterpillars and their host plants. Even though latex peptidase inhibitors inhibit gut peptidases (in vitro), the ability of gut peptidases to promptly digest latex proteins (in vivo) regardless of their origin seems to be a pivotal event favoring caterpillars overcoming plant defense.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Látex

A palavra látex é proveniente do latim e significa “fluido”. O látex é um fluido de aspecto leitoso composto de uma suspensão aquosa de substâncias químicas variadas. O que diferencia o látex de gomas e resinas é o fato de que estas são secretadas em espaços intercelulares ou contidas em vasos mortos. O látex, por outro lado, é produzido e mantido em laticíferos, que são células vivas detentoras da capacidade de regular a composição química do látex (LEWINSOHN; VASCONCELLOS-NETO, 2000).

A capacidade para formar látex é encontrada em cerca de 12.500 espécies de 900 gêneros pertencentes a 12 famílias. Entre as famílias de plantas produtoras deste fluido destacam-se Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1988) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também possuam a capacidade de produzir este fluido.

Além das plantas, fungos, como algumas espécies dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* também produzem fluido laticífero. Embora o látex, na maioria das vezes, apresente um aspecto leitoso, pode possuir cor amarela ou laranja, como em plantas pertencentes à família *Papaveraceae*, marrom-amarelado em *Cannabis* ou pode ser límpido como em *Morus* e *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001).

Os laticíferos são preenchidos por látex desde suas porções mais jovens e o próprio protoplasto da célula laticífera compõe este fluido (KEKWICK, 2001). O látex permanece dentro do laticífero e somente é liberado para o meio extracelular quando a planta é injuriada. Em pouco tempo, o látex coagula e sela o órgão injuriado (DEMARCO *et al.*, 2006).

Os laticíferos podem ser classificados como articulados e não articulados. Os articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células em que as paredes celulares que separam as células individuais permanecem intactas ou não, enquanto os laticíferos não articulados surgem de uma célula simples que cresce nos espaços intercelulares, eventualmente se ramificando nos tecidos das plantas de modo similar às hifas de fungos (KEKWICK, 2001). A provável origem polifilética dos laticíferos articulados e não articulados confere uma potencial aplicação de suas

características morfológicas e químicas como caráter taxonômico (MAHLBERG *et al.* 1987; MAHLBERG, 1993).

1.1.1. Composição bioquímica do látex

O látex pode ser definido como uma suspensão de partículas de borracha (fase dispersa) em um meio aquoso, chamado soro (WISNIEWSKI, 1983).

Este fluido é matéria prima para a fabricação de produtos industrializados derivados da borracha, a principal espécie utilizada com este fim é *Hevea brasiliensis*, a seringueira. A substância presente no látex que apresenta a característica de elasticidade da borracha é um polímero de isopreno. Os poliisoprenos constituem proporcionalmente a maior porção da maioria dos fluidos laticíferos e dão a característica colante do látex recém exsudado (MORCELLE, *et al.*, 2004).

A fase soro, também chamada de soro C ou fase aquosa, contém diferentes classes de compostos, incluindo carboidratos, proteínas, aminoácidos, enzimas, bases nitrogenadas, alcalóides e vitaminas (ARCHER *et al.*, 1969; MORCELLE, *et al.*, 2004). Por ser o látex um exsudado citoplasmático das células laticíferas, o soro também é constituído de componentes celulares como núcleos, mitocôndrias e ribossomos (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1988).

O látex possui algumas moléculas frequentemente relacionadas à defesa da planta contra patógenos e herbívoros. Como descrito a seguir, vários estudos foram realizados com o intuito de evidenciar esta função defensiva (AGRAWAL; KONNO *et al.*, 2009).

1.1.2. Látex e defesa vegetal contra herbivoria

A constatação de que a presença do látex torna as folhas inaceitáveis para alguns herbívoros foi uma das primeiras evidências da função protetora deste fluido. Os primeiros experimentos que foram realizados utilizando a estratégia de drenar o látex das folhas e verificar a aceitação destas por herbívoros foram publicados em 1905. Neste estudo, folhas de plantas laticíferas que tiveram o látex drenado foram prontamente devoradas por uma lesma, a qual não se alimentou de folhas não drenadas (AGRAWAL; KONNO, 2009). Atualmente, esta estratégia ainda é utilizada

para avaliar a função de defesa do látex de muitas espécies. KONNO e colaboradores (2004) demonstraram que folhas de mamoeiro e *Ficus* recortadas em tiras e lavadas, livres de látex, tornaram-se aceitáveis para insetos que normalmente perecem em folhas intactas.

Muitos componentes do látex proporcionam resistência a herbivoria através de efeitos tóxicos ou antinutritivos, enquanto outros estão envolvidos no efeito colante que pode imobilizar alguns insetos herbívoros. Vários metabólitos secundários relacionados à defesa foram detectados em fluidos laticíferos, como terpenóides (SESSA *et al.*, 2000), alcalóides (KONNO *et al.*, 2006) e componentes fenólicos, que incluem taninos, ligninas e flavonóides (SNOOK, 1994). Um dos mais abundantes metabólitos secundários presentes no látex de variadas espécies são os cardenólídeo ou glicosídeos cardíacos (KAMEL *et al.*, 2001; DUSSOURD; HOYLE, 2000). Além de metabólitos secundários, o látex possui uma variedade de proteínas relacionadas à defesa vegetal.

1.1.2.1. Proteínas de fluidos laticíferos envolvidas na defesa contra insetos

A existência nos fluidos laticíferos de proteínas relacionadas à defesa contra herbivoria é mais uma evidência de que o látex apresenta função defensiva. Dentre estas proteínas destacam-se lectinas (GIDROL *et al.*, 1994; WASANO *et al.*, 2009; SALES *et al.*, 2001), quitinases (HOWARD; GLAZER, 1969; FREITAS *et al.*, 2007), glicosil hidrolases (MOUSSAOUI *et al.*, 2001, CHEYE; CHEUNG, 1995; HORNBERGER *et al.*, 2000), polifenol oxidase (SABY *et al.*, 2003) e peroxidase (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2002).

Evidências do envolvimento de proteínas de fluidos laticíferos na defesa vegetal são acumuladas, dentre estas está o aumento da expressão de proteínas quando a planta é danificada ou com a aplicação de hormônios vegetais, como ocorrido com a heveína, uma proteína ligante a quitina do látex de *Hevea brasiliensis* (BROEKAERT *et al.*, 1990). Uma evidência ainda mais direta é o aumento da expressão de proteínas devido ao ataque do próprio inseto. Este evento ocorreu com uma proteína identificada como glicosil hidrolase no látex de plantas de *Calotropis procera* atacadas por larvas de *Danaus plexippus* (Lepidoptera) (PEREIRA *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que as atividades inseticida ou inibidora do crescimento de insetos encontradas em fluidos laticíferos de diferentes espécies podem ser atribuídas às proteínas presentes neste fluido. A fração proteica do látex de *C. procera* é tóxica às larvas de *Anticarsia gemmatalis* (RAMOS *et al.*, 2007) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) quando misturada a dieta artificial a uma concentração de 0,1% (RAMOS *et al.*, 2010). Embora não tenha sido identificada qual proteína foi responsável pela toxicidade, o látex desta espécie possui inibidores de proteases, quitinases e proteases ativas, as quais são proteínas relacionadas à defesa vegetal e podem estar envolvidas na ação inseticida do látex (RAMOS *et al.*, 2007, 2010). Por fim, já foi constatada a ação inseticida de uma proteína laticífera pura, a MLX56, uma proteína ligante a quitina isolada do látex de *Morus spp.* Esta proteína é tóxica para as larvas de *Mamestra brassicae* e *Samia ricini* quando adicionada a dieta artificial na concentração de 0,01% (WASSANO *et al.*, 2009).

Também foi relatada a toxicidade de frações proteicas de fluidos laticíferos contra insetos não herbívoros, como é o caso das proteínas do látex de *C. procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra* contra larvas de *Aedes aegypti* (RAMOS *et al.*, 2006, 2009).

Tratando-se de proteínas de defesa detectadas em fluidos laticíferos, muitos trabalhos evidenciam que as proteases apresentam função de defesa contra insetos (KONNO, 2011). No contexto da defesa vegetal proporcionada por fluidos laticíferos, considerável atenção também é dada aos inibidores de proteases (SRITANYARAT *et al.*, 2006). O presente trabalho aborda o envolvimento destes dois tipos de moléculas, proteases e inibidores de proteases, na defesa de plantas laticíferas.

1.1.2.1.1. Proteases de fluidos laticíferos

Os fluidos laticíferos de muitas espécies são conhecidamente ricas fontes de proteases. Sendo encontradas mais frequentemente proteinases serínicas e cisteínicas (PRIOLO *et al.*, 2000; MOUSSAOUI *et al.*, 2001; ANTÃO; MALCATA, 2005; KYNDT *et al.*, 2007).

Como exemplo de um látex rico em proteases cisteínicas pode ser citado o de *Carica papaya*, no qual foram isoladas quatro destas proteinases: a papaína (EC 3.4.22.2), quimopapaína (EC 3.4.22.6), caricaína (EC 3.4.22.30) e papaia proteinase

IV (EC 3.4.22.5) (MOUSSAOUI *et al.*, 2001). Muitas outras proteinases cisteínicas foram isoladas de fluidos laticíferos de diferentes espécies, como: proceraina (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003), proceraina *b* (SINGH; DUBEY *et al.*, 2011), PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3 (RAMOS *et al.*, 2013) extraídas de *Calotropis procera*; as três endopeptidases de *Araujia hortorum* denominadas araujaína h I, II, e III (PRIOLO *et al.*, 2000; OBREGON *et al.*, 2001); ervatamina A, B e C purificadas de *Ervatamia coronaria* (NALLAMSETTY; JAGANNADHAM, 2002); eineíma obtida de *Ervatamia heyneana* (PATEL; JAGANNADHAM, 2003); a asclepaína I do látex de *Asclepia curassavica* (LIGIERI *et al.*, 2004); a morrenaína b I obtida do látex de *Morrenia brachistephana* (CAVALLI *et al.*, 2003) e a funastraima de *Funastrum clausum* (MORCELLE *et al.*, 2004). O látex de *Calotropis gigantea* contém quatro proteinases cisteínicas, a calotropina FI, FII, DI e DII (ABRAHAM; JOSHI, 1979).

Também há registros de atividade proteolítica do tipo serínica em fluidos laticíferos, no entanto, com menos frequência que as proteinases cisteínicas. No látex de *Taraxacum officinali* foi purificada uma proteinase serínica chamada de taraxilisina (ANTÃO; MALCATA, 2005). Este tipo de proteinase também foi encontrada no látex de *Euphorbia supina* (ARIMA *et al.*, 2000) e *Artocarpus heterophyllus* (PRASAD; VIRUPAKSHA, 1990).

Existem evidências de que as proteases contribuem para o efeito inseticida (ou inibidor do crescimento) de alguns fluidos laticíferos. Uma destas evidências é o fato de que a forte toxicidade de folhas de *C. papaya* e *Ficus virgata* contra as larvas herbívoras *Samia ricini* e *Mamestra brassicae*, ambas da ordem Lepidoptera, desaparece quando o látex é drenado ou quando as folhas são pinceladas com E-64, um inibidor de protease cisteínica (KONNO *et al.*, 2004). Semelhantemente, o trabalho de Ramos e colaboradores (2009) evidenciaram a participação deste tipo de protease na atividade larvicida contra *Aedes aegypti* encontrada na fração proteica do látex de *C. procera* e *Cryptostegia grandiflora*. Além disso, este trabalho demonstrou que uma protease purificada do látex de *Carica papaya*, a papaína, também possui ação larvicida contra *A. aegypti*.

As proteases possuem diferentes papéis na defesa vegetal, podendo agir na percepção do ataque, na sinalização da defesa e na execução da mesma (HOORN; JONES, 2004). Na execução da defesa as proteases agem diretamente sobre o patógeno ou herbívoro. O trabalho de Mohan e colaboradores (2006) foi o primeiro a demonstrar um alvo da ação inseticida das proteases vegetais, a membrana

peritrófica. Este trabalho demonstrou que uma protease cisteínica do milho, que é induzida no local de alimentação de *Spodoptera frugiperda*, é capaz de degradar a membrana peritrófica deste inseto.

No que se refere às proteases de fluidos laticíferos, foi evidenciada a degradação das proteínas da membrana peritrófica de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) por proteases do látex de *Asclepias syriaca* (LI *et al.*, 2009). Apesar de existirem estudos que apontem um esclarecimento sobre a ação das proteases vegetais contra insetos, o estudo do mecanismo de ação inseticida de proteases de fluidos laticíferos ainda está em fase inicial.

1.1.2.1.2. Inibidores de proteases

Estudos demonstraram a existência de inibidores de proteases em fluidos laticíferos de diferentes espécies de plantas. São exemplos os inibidores de proteases serínicas dos látex de *Ficus carica* (KIM *et al.*, 2003), *Carica papaya* (AZARCAN *et al.*, 2004) e *H. brasiliensis* (SRITANYARAT *et al.*, 2006), bem como os inibidores de proteases cisteínicas dos látex de *C. procera* (RAMOS *et al.*, 2010), *C. papaya* (MOUSSAOUI *et al.*, 2001) e *H. brasiliensis* (BANGRAK; CHOTIGEAT, 2010).

Os inibidores de protease possuem um papel biológico no controle endógeno de proteases. A manutenção do equilíbrio apropriado de proteases livres e complexadas com inibidores é crítica para um eficiente funcionamento dos sistemas biológicos. Esta função endógena em fluidos laticíferos é evidenciada por Monti e colaboradores (2000), que purificaram a papaína complexada com inibidor e posteriormente, em 2004, isolaram do látex de *C. papaya* inibidores naturais da papaína.

Outra função biológica dos inibidores de protease é a proteção contra predadores. Estas moléculas se ligam as enzimas digestivas do predador impedindo assim uma eficiente digestão dos alimentos e por fim provocam uma nutrição inadequada. O envolvimento de inibidores de fluidos laticíferos na defesa foi evidenciado através de experimentos que demonstraram um aumento nos níveis de inibidores quando a planta é submetida a danos mecânicos. Este fato foi observado no látex de *H. brasiliensis*, no qual a inibição de tripsina foi maior em plantas que foram danificadas várias vezes para retirada de látex, em relação às plantas não

danificadas anteriormente (SRITANYARAT *et al.*, 2006). Semelhantemente, foi detectado através de análise proteômica que a quantidade de inibidor de tripsina no látex de *C. papaya* é aumentada em plantas danificadas várias vezes para retirada do látex (AZARKAN *et al.*, 2004). Em adição, uma cistatina (HbCPI) do látex de *H. brasiliensis* foi acumulada em resposta a infecção pelo fungo *Phytophthora palmivora*, sugerindo que este inibidor possui um importante papel no mecanismo de defesa contra fatores bióticos (BANGRAK; CHOTIGEAT, 2011).

O trabalho de Ramos e colaboradores (2010) evidenciou que um inibidor de protease cisteínica do látex de *C. procera* está envolvido na ação inseticida da fração proteica total do látex contra larvas de *C. maculatus*. A principal evidência é a inibição *in vitro* das proteases intestinais desta larva pela fração proteica do látex aquecida (sem atividade proteolítica).

Apesar destes estudos que demonstram o envolvimento de inibidores de proteases laticíferos nos processos que ocorrem após danos mecânicos e na atividade inseticida deste fluido, são poucas as evidências diretas a partir de bioensaios que mostram o envolvimento de inibidores de proteases na defesa de plantas laticíferas contra a herbivoria de insetos.

1.2 Descrição das espécies vegetais estudadas

1.2.1. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

O nome científico *Calotropis procera* é originário do grego (“Kalos” = belo, “tropis” = barco) e do latim (“procerus” = alto, esbelto). Esta espécie pertence à família Apocynaceae e subfamília Asclepiadoideae, a qual é composta por plantas laticíferas (LORENZI; MATOS, 2002).

C. procera é uma espécie altamente adaptada a locais quentes e ensolarados, podendo ser encontrada em quase todas as regiões tropicais da América. É encontrada com muita facilidade em terrenos baldios, beiras de estrada e dunas. No Brasil esta planta existe em diferentes regiões, nas quais seu nome popular pode variar: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortênsia (CE), paninha-de-seda (SP), leiteiro (SP e MG), queimadura e jacaúna (NE) (LORENZI; MATOS, 2002).

Esta espécie é um arbusto, perene, com pouca ramificação, e que pode alcançar 3,5 m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais (Figura 1 A, B e C). A sua disseminação se dá apenas pelo vento, através das painas brancas de suas sementes (Figura 1D) (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1 - Aspectos gerais de *Calotropis procera* (A). Detalhes da flor (B), fruto (C) e semente (D).



Fonte: A (www.cerambyx.uochb.cz/calotropis.htm), B (www.treknature.com/gallery/Asia/India/photo82151.htm), C (pt.treknature.com/gallery/photo116805.htm) e D (en.wikipedia.org/wiki/File:Seed_Calotropis_procera.jpg)

O látex de *Calotropis procera* contém variados componentes químicos como compostos fenólicos e terpenóides. Além destes, é rico em glicosídeos cardíacos ou cardenólídeos, tendo sido identificados vários destes compostos: calotropina, calotoxina, uscaridina, uscarina e proceragenina (ELGAMAL *et al.*, 1999).

O fluido laticífero desta espécie é formado em sua maioria pela fração borracha, no entanto, também é uma rica fonte de proteínas (FREITAS *et al.*, 2007). Na fração proteica do látex foi detectada variada atividade enzimática, como atividade antioxidante de superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato, bem como atividade quitinolítica (FREITAS *et al.*, 2007).

Dentre as atividades enzimáticas encontradas no látex de *C. procera* a mais estudada é a atividade proteolítica. No trabalho de FREITAS e colaboradores (2007) esta atividade do látex foi caracterizada, sendo demonstrado que é inibida por E-64 e ativada por DTT, indicando a predominância de atividade proteolítica do tipo cisteínica, enquanto que a falta de inibição por PMSF, EDTA e EGTA sugere a ausência de proteases serínicas e metalo-proteases. A atividade proteolítica do látex também é consideravelmente inibida por Pepstatina, inibidor de proteases aspárticas. Deste fluido laticífero já foram purificadas proteases cisteínicas, como a proceraína (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003) e proceraína *b* (SINGH; DUBEY, 2011), bem como três isoformas denominadas de CpCP-1, CpCP-2 e CpCP-3 (RAMOS *et al.*, 2013).

C. procera tem sido muito utilizada na medicina popular e de fato algumas propriedades farmacológicas foram cientificamente comprovadas no látex desta planta (AHMED; RANA; DIXIT, 2005). Além de propriedades farmacológicas, a atividade inseticida do látex também é alvo de estudos, os quais ressaltam o látex desta espécie como fonte de moléculas detentoras da capacidade de controlar pragas agrícolas e insetos transmissores de doenças humanas (RAMOS *et al.*, 2006, 2007).

Um estudo realizado com extratos etanólicos de folhas de *C. procera* constatou que são tóxicos a diferentes estágios da mosca da carne *Sarcophaga haemorrhoidalis* (MOURSY, 1997). O extrato metanólico de folhas apresentou propriedades larvicida contra *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (SINGH *et al.*, 2005). O látex desta planta a uma concentração de 5% foi capaz de matar e digerir parcialmente larvas da *Musca domestica* em três horas (MORSY *et al.*, 2001). Ramos e colaboradores (2006) mostraram que este fluido laticífero possui efeitos tóxicos sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti*. Posteriormente, foi evidenciado o envolvimento de proteases cisteínicas do látex de *C. procera* na ação larvicida contra este inseto. (RAMOS *et al.*, 2009).

RAMOS *et al.* (2007) demonstraram, em ensaios artificiais, que a fração protéica extraída do látex foi eficiente no combate a pragas agrícolas de grande importância econômica, como *Callosobruchus maculatus* (praga do feijão-de-corda), *Zabrotes subfasciatus* (praga do feijão comum, mulatinho), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) e *Ceratitis capitata* (mosca-das-frutas). Os resultados sugerem que a ação inseticida do látex pode ser resultado da ação de proteases, no entanto, inibidor de protease e quitinase também podem estar envolvidos no efeito deletério observado.

Os estudos realizados sobre a ação inseticida de proteínas do látex de *C. procera* contribuíram para evidenciar a ação destas proteínas como molécula de defesa. No entanto estes estudos são apenas um ponto de partida para compreensão do envolvimento de uma variedade de proteínas do látex desta espécie na defesa da planta.

1.2.2. *Cryptostegia Grandiflora* R.Br

É uma planta trepadeira que também pertence à subfamília Asclepiadoideae (Família Apocynaceae). Comumente é chamada de alamada-roxa, boca-de-leão, viúva alegre e unha-de-onça. Apresenta porte de arbusto com inflorescências terminais e flores roxas (Figura 1B). Sua disseminação ocorre através do vento (Figura 2D) (LORENZI; SOUZA, 1999). Relatos populares atribuem um efeito tóxico a esta espécie, pois bovinos podem morrer após a ingestão da mesma. Além disso, esta espécie pode matar outras plantas por causar sombreamento excessivo (Figura 2A), causando problemas de grandes proporções em alguns países.

Freitas e colaboradores (2010) realizaram a caracterização bioquímica do látex desta espécie, na qual foi detectada a presença de proteínas (0,26 mg/ml) em uma fração livre de borracha chamada de proteínas do látex (PL). A fração composta pela borracha representou a maior parte do látex, cerca de 96% da massa seca, no entanto o estudo foi direcionado para as proteínas do látex. Na fração PL foram detectadas atividades envolvidas na defesa vegetal, como proteolítica, quitinolítica e de enzimas antioxidantes, tais como catalase, superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato. A atividade proteolítica foi detalhadamente caracterizada, constatando-se que é inibida por E-64 e ativada por DTT, indicando a predominância de atividade proteolítica do tipo cisteínica, enquanto que a falta de inibição por

PMSF, EDTA e Pepstatina indica a ausência de proteases serínicas, metalo-proteases e proteases aspárticas, respectivamente.

Figura 2 - Aspectos gerais de *Cryptostegia grandiflora* (A). Detalhes da flor (B), fruto (C) e semente (D).



Fonte: <http://www.anbg.gov.au/photo/apii/id/a/22648>

Tratando-se de ação inseticida, a fração proteica do látex possui atividade larvicida contra o vetor da dengue *Aedes aegypti* (L), a qual é, pelo menos em parte, causada por proteases cisteínicas (RAMOS *et al.*, 2009). Esta participação foi evidenciada pela redução da mortalidade das larvas quando o látex foi tratado com inibidores de proteases cisteínicas, E-64 e iodoacetamida (RAMOS *et al.*, 2009).

Recentemente uma protease cisteínica (Cg24-I) com massa molecular de 24,1 kDa foi isolada do látex desta espécie (RAMOS *et al.*, 2014). Cg24-I inibiu completamente a germinação de esporos do fungo *Fusarium solani* em uma dose de 28,1 µg/ml. Os resultados indicam que a toxicidade desta proteína está relacionada à permeabilidade da parede do esporo (RAMOS *et al.*, 2014).

Diante do exposto, é notório que o látex de *Cr. grandiflora* possui um potencial a ser explorado quanto ao estudo de proteínas de fluidos laticíferos envolvidas na

defesa. Neste contexto destacam-se as proteases cisteínicas como moléculas a serem investigadas quanto ao papel na defesa direta contra insetos e patógenos.

1.2.3. *Plumeria rubra* Linn.

P. rubra pertence à família Apocynaceae e é originária da América tropical. No Brasil é conhecida popularmente como jasmim, frangipane e árvore-pagode. (LORENZI; SOUZA, 1999). Trata-se de um arbusto grande, podendo alcançar 8 metros de altura, e que possui inflorescência terminal, com numerosas flores sucessivas, as quais são perfumadas e podem ser brancas, vermelhas ou róseas com o centro amarelo (Figura 3).

Freitas e colaboradores (2010) também analisaram a composição bioquímica do látex desta espécie. Com este objetivo o fluido laticífero foi fracionado, obtendo-se uma fração insolúvel em água composta por borracha e outra fração solúvel em água rica em proteína. Na fração proteica foram detectadas atividade antioxidante de superóxido dismutase e atividade proteolítica predominantemente cisteínica (FREITAS *et al.*, 2010).

Pouco é conhecido sobre a ação de moléculas deste fluido laticífero envolvidas na defesa. Um dos trabalhos relacionados a insetos mostrou que o látex íntegro possui atividade deterrente da ovoposição de *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, sendo sugerido que esta atividade é resultado de interação entre fração rica em borracha, a fração proteica e pequenos metabólitos (RAMOS *et al.*, 2011). Em adição, a fração proteica, quando adicionada à dieta artificial, é tóxica para larvas de *C. maculatus* (ARAÚJO, 2009). Estudos adicionais são necessários para elucidar quais proteínas são responsáveis por esta toxicidade e seus modos de ação.

Apesar de *P. rubra* possuir o látex que auxilia na defesa, a larva de *Pseudosphinx tetrio* (Lepidoptera) consegue sobrepor esta ação defensiva proporcionada pelo fluido laticífero. Alguns aspectos para o entendimento da resistência de insetos ao efeito tóxico do látex de diferentes espécies foram esclarecidos. No entanto, as bases bioquímicas da resistência às proteínas tóxicas do látex necessitam de uma investigação mais detalhada (KONNO, 2011).

Figura 3 - Aspectos gerais (A) de *Plumeria rubra*. Detalhes das flores brancas (B), róseas (C) e vermelhas (D).



Fonte: A e B (www.ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=9243), C (wildlifeofhawaii.com/flowers/1587/plumeria-rubra-frangipani) e D (bioweb.uwlax.edu/bio203/s2013/houselog_kath/)

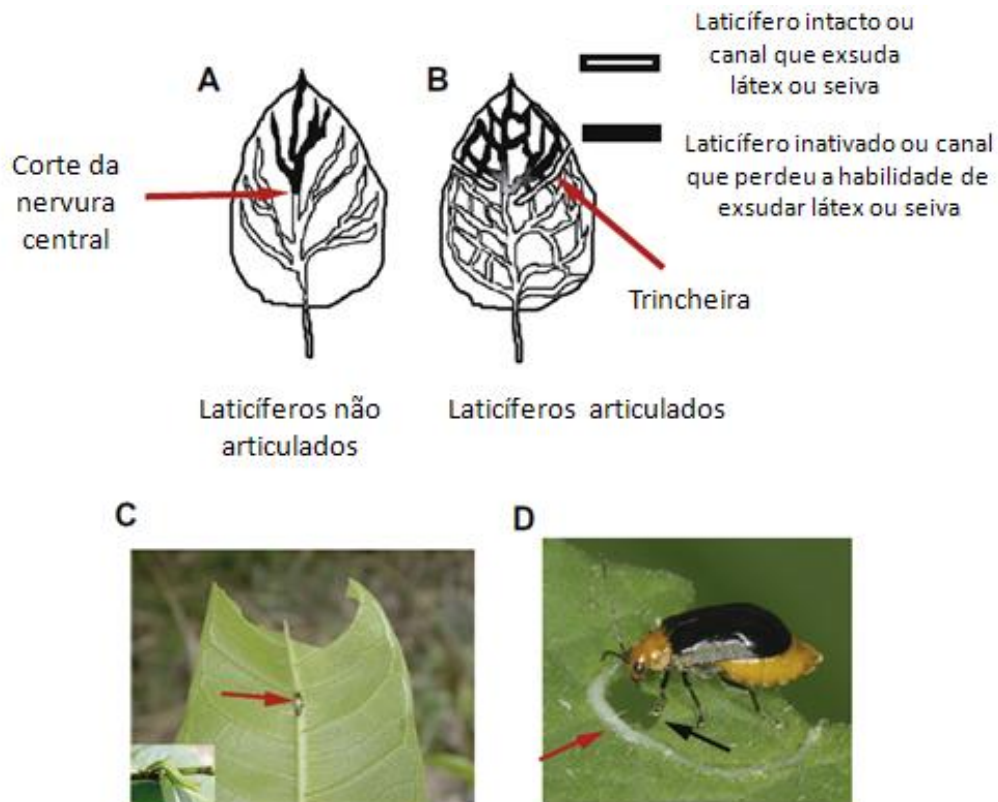
1.3. Estratégias de adaptação de insetos às plantas laticíferas

Existem vários insetos capazes de se alimentar de plantas laticíferas, os quais utilizam estratégias variadas para sobrepor o efeito tóxico do látex. Há insetos que simplesmente evitam ingerir o látex, como é o caso dos afídeos, como o *Aphis nerii*, capaz de introduzir o seu rostró em espaços intercelulares até atingir as células do floema, das quais se alimentam por sucção (BOTHA *et al.*, 1972). Outros herbívoros têm a capacidade de suportar os efeitos tóxicos ou antinutritivos de moléculas presentes no látex. Por exemplo, o bicho da seda (*Bombyx mori*) é um especialista em se alimentar de *Morus* spp., o qual contém alcalóides que mimetizam açúcares. Para se alimentar da planta, este inseto desenvolveu sacarase e trealase insensíveis a estes alcalóides (DAIMON *et al.*, 2008).

Há ainda os insetos capazes de sabotar a defesa proporcionada pelo látex através do rompimento das nervuras das folhas, interrompendo o fluxo de látex

viscoso para o restante da folha, reduzindo o risco de serem imobilizados e evitando o efeito tóxico do látex (DUSSOURD; EISNER, 1987). Este processo pode reduzir a ingestão de látex pelo inseto em até 90% (DUSSOURD, 1999).

Figura 4 - Corte da nervura central (A/C) em laticíferos não articulados e trincheiras em laticíferos articulados (B/D).



Fonte: adaptada de Konno (2011). Esquema do corte de laticíferos não articulados (A) e articulados (B). (C) Corte feito pela larva de *Cyrestis thyodamas* (Nymphalidae), especialista em se alimentar da planta laticífera *Ficus virgata*. (D) Trincheira circular feita por *Aulacophora nigripennis*. As setas vermelhas indicam os locais do corte único ou trincheira e a seta preta indica o local próprio para a alimentação, onde a seiva foi exsudada.

O corte pode ser em local único, o que geralmente acontece nos laticíferos não articulados, pois neste tipo o látex passa por um canal que se ramifica, portanto um único corte neste canal impede a passagem do látex, tornando a parte da folha sem látex pronta para ser consumida (Figura 4 A/C) (DUSSOURD, 1999; DUSSOURD; EISNER, 1987). O corte pode ainda ser em forma de trincheiras lineares ou circulares, mais comum em plantas com laticíferos articulados, nos quais o látex pode fluir através de vários canais distribuídos por toda a folha (Figura 4 B/D) (DUSSOURD; DENNO, 1991). Entretanto, esta estratégia só é eficiente para insetos

que possuam resistência para tolerar a ingestão do látex durante o corte da nervura da folha e também algum resíduo de componentes do látex que restaram nos laticíferos drenados (DUSSOURD, 2003).

Alguns mecanismos da resistência de insetos aos componentes tóxicos de látex foram elucidados, como é o caso da insensibilidade a cardenolídeos e alcalóides (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2014; DAIMON *et al.*, 2008). No entanto pouco é conhecido sobre a resistência às proteínas tóxicas de látex. Nesta abordagem investigou-se um aspecto muito interessante e que é determinante para a resistência às proteínas tóxicas: a capacidade dos insetos em digerir as proteínas do látex (KONNO, 2011).

Para uma proteína de defesa ser eficiente é necessário que não seja digerida pelas enzimas digestivas do predador, é o que acontece com MLX56, uma proteína ligante a quitina do látex de *Morus spp.*, a qual é tóxica para lavas da ordem Lepidoptera (WASANO *et al.*, 2009). Larvas de *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) são suscetíveis à toxicidade da fração proteica do látex de *C. procera* e não são capazes de digerir completamente esta fração (RAMOS *et al.*, 2009). Ao contrário, quando os dois sistemas proteolíticos foram confrontados, as proteases do látex digeriram as proteínas do extrato intestinal das larvas de *C. maculatus* (FREITAS, 2006). Por outro lado, a larva especialista em se alimentar desta planta, *Danaus plexippus*, digeriu completamente e rapidamente a mesma fração (PEREIRA *et al.*, 2010). Estes resultados indicam que a capacidade de digerir as proteínas do látex pode ser determinante na resistência de insetos especialistas em plantas laticíferas.

Outro aspecto da resistência de insetos que se alimentam de plantas laticíferas refere-se à habilidade de inibir a elevada atividade proteolítica do látex. Este aspecto foi abordado no estudo da larva *Trichoplusia ni.*, que frequentemente alimenta-se de plantas laticíferas. O fluido digestivo aquecido desta larva é capaz de inibir a atividade proteolítica do látex da planta que lhe serve de alimento, bem como de outras proteases cisteínicas, como a papaína e a bromelaína (LI *et al.*, 2009). As proteínas da membrana peritrófica desta larva não são degradadas *in vivo* pelas proteases do látex, mas *in vitro*, a degradação foi observada (LI *et al.*, 2009). Experimentos mostraram ainda que o fluido intestinal aquecido evita a degradação das proteínas da membrana peritrófica da larva *in vitro* (LI *et al.*, 2009). Os

resultados indicam que a atividade inibidora existente no fluido digestivo inibe *in vivo* a degradação das proteínas da membrana peritrófica.

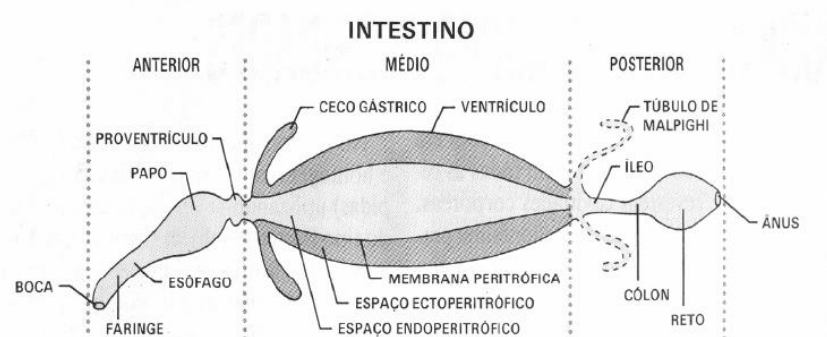
Aspectos da resistência de duas larvas especialistas em plantas laticíferas, *Danaus plexippus* e *Pseudosphinx tetrio*, são abordados neste trabalho. Neste contexto o efeito de proteases sobre a membrana peritrófica de *D. plexippus* foi investigado. Para tanto, é necessária a compreensão da função e dos componentes da membrana peritrófica, como visto a seguir.

1.4. Membrana Peritrófica (MP)

Data de 1972 o primeiro registro de uma membrana envolvendo o bolo alimentar de Lepidoptera, sendo posteriormente verificada a presença desta membrana em outros insetos e esta estrutura foi então nomeada de membrana peritrófica (MP), cuja localização no tubo digestivo dos insetos pode ser visualizada na Figura 1 (TERRA, 2001).

Os estudos sobre a MP avançaram e hoje é estabelecido que consiste de uma rede formada de quitina, proteínas e glicoproteínas (HEGEDUS *et al.*, 2009). Foi proposto mudar o nome desta estrutura para matriz peritrófica, afirmando-se que o nome membrana se refere a uma bicamada lipídica, no entanto o nome membrana peritrófica ainda é utilizado na comunidade científica (TERRA, 2001; HU *et al.*, 2012).

Figura 1 - Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos.

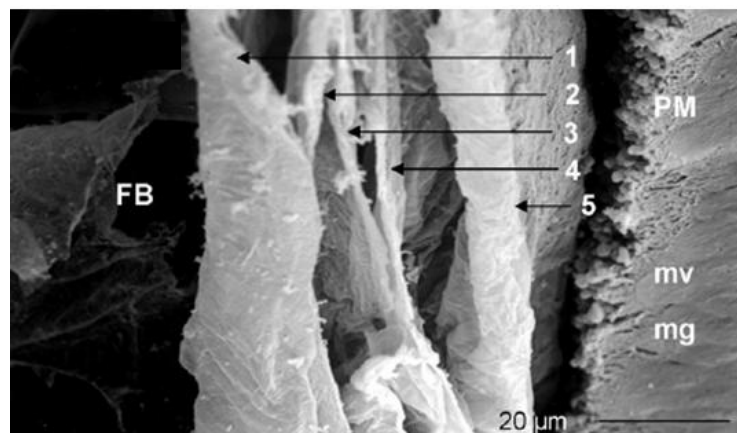


Fonte: Bolognesi (2005).

As MPs são classificadas em dois tipos: I e II. As MPs do tipo I são produzidas por todo o epitélio do intestino médio ou por alguma parte dele (anterior

ou posterior). Nas microvilosidades das células epiteliais ao longo do intestino ocorre periodicamente síntese e liberação de uma camada de MP, desta forma este tipo de MP é formado por sucessivas camadas (Figura 6) (HEGEDUS *et al.*, 2009). MP do tipo I é encontrada em baratas (Dictyoptera), gafanhotos (Orthoptera), besouros (coleópteros), abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), traças e borboletas (Lepidoptera), e em mosquitos adultos hematófagos (Diptera) (Terra, 2001).

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura do trato digestório de *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae). Corte transversal mostrando as camadas da MP.



Fonte: Daves *et al.*, (2007). Legenda: microvilosidade (MV), membrana peritrófica (MP) e bolo alimentar (FB), (1 – 5) camadas da MP.

As MPs do tipo II são secretadas em um tecido especializado na extremidade anterior do intestino médio chamado de cárdia. Ao passar na região onde a MP é produzida, o bolo alimentar é englobado pela membrana que cresce em direção as regiões posteriores. Este tipo de MP é mais organizado e consiste de uma a três camadas (HEGEDUS *et al.*, 2009). Ocorre em larva e adulto (exceto aqueles hematófagos) de mosquitos e moscas (Diptera), e em alguns adultos de Lepidoptera (TERRA, 2001).

Há ainda insetos que aparentemente não possuem MP, são exemplos algumas espécies de formigas adultas (Hymenoptera), a maioria dos adultos de mariposas e borboletas (Lepidoptera), piolhos (Phthiraptera), pulgas na fase adulta (Siphonaptera) e besouros (TERRA, 2001).

Inicialmente foi atribuída à MP a função de proteção do epitélio intestinal contra a abrasão mecânica. No entanto, atualmente outras funções relacionadas à semipermeabilidade desta estrutura são citadas, como organização espacial da

digestão, proteção contra a ingestão de toxinas e estabelecimento de uma barreira física que impede a penetração de patógenos (HEGEDUS *et al.*, 2009).

Para compreender a vantagem proporcionada pela MP na organização espacial da digestão é necessário entender o fluxo no espaço ecto e endoperitrófico (Figura 5). No espaço endoperitrófico o bolo alimentar move-se para a região posterior, enquanto que no espaço ectoperitrófico a água flui da região posterior para a anterior. As enzimas envolvidas na digestão inicial entram no espaço endoperitrófico, se complexam com o substrato e ficam retidas, pois o complexo é muito grande para passar pela membrana. Na parte final da digestão, as enzimas e os produtos passam para o espaço ectoperitrófico e são levados pelo fluxo para região anterior, onde as enzimas podem entrar novamente no espaço endoperitrófico. Desse modo as enzimas são reutilizadas ao invés de serem secretadas nas fezes, proporcionando uma eficiente aquisição de nutrientes (TERRA, 2001).

Como visto, a MP possui importantes funções e por conta disso a degradação ou inibição da formação desta estrutura resulta em morte ou inibição do crescimento de insetos. Larvas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) continuamente alimentadas com dieta contendo calcofluor (10 g/l), um composto que desagrega as proteínas da MP, apresentaram o desenvolvimento retardado e elevada mortalidade (54,5%) (ZHU *et al.*, 2007). Foi observado através de microscopia eletrônica que uma quitinase (Chi-A) danifica a MP de *Bombyx mori*, além disso, causou 100% de mortalidade a uma dose de 0,56 µg/g quando adicionada a dieta artificial (RAO *et al.*, 2004).

Parasitas e patógenos produzem enzimas, como proteases e quitinases, que danificam a MP para facilitar sua penetração (PENG; ZHONG; GRANADOS *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 2004). Em adição, foi constatado que a inibição da formação da MP potencializa a ação de patógenos (WANG; GRANADOS, 2000; ZHU *et al.*, 2007).

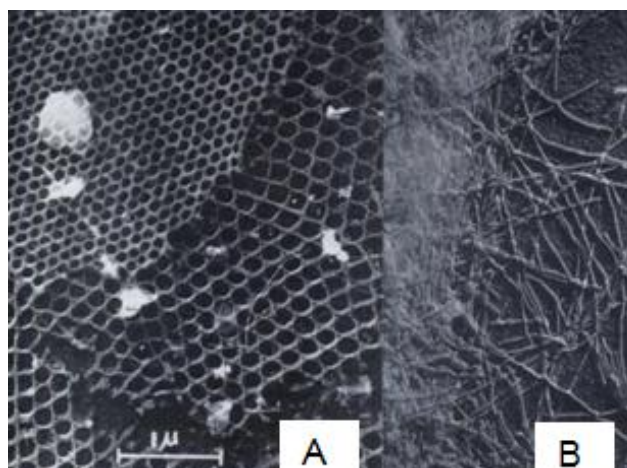
A degradação da MP de insetos por enzimas vegetais pode conferir resistência ao vegetal. Como observado na resistência às larvas de *Spodoptera frugiperda* por plantas de milho, nas quais foi constatado que uma protease cisteínica induzida pela herbivoria (Mir1-CP) degrada a MP deste inseto. Este fato foi observado através do aumento da permeabilidade de MPs tratadas com Mir1-CP (MOHAN *et al.*, 2006).

1.4.1. Composição química e estrutura de MP

Como já mencionado, MP é formada de proteína e quitina, mas as quantidades relativas ainda não estão bem estabelecidas. Na revisão de Wang e Granados (2001) é afirmado que as proteínas são os componentes majoritários da MP, enquanto que a revisão de Hegedus e colaboradores (2009) afirma que é a quitina. No entanto é consenso que a quantidade de quitina e proteína da MP varia entre as espécies de insetos (WANG; GRANADOS, 2001; HEGEDUS *et al.*, 2009). Há indícios de que a quitina existe em maior quantidade em MP do tipo I do que em MP do tipo II (TELLAN; EISEMANN, 2000).

A quitina forma microfibrilas, as quais formam feixes que em MP do tipo I frequentemente estão organizadas em uma malha ortogonal (LEHANE, 1997). O modelo proposto para MP do tipo II denota microfibrilas de quitina em forma desorganizada (amorfa) (BECKER; PETERS; ZIMMERMANN, 1975). No entanto na espécie de barata *Peniplaneta americana* as duas formas foram observadas (Figura 7) (MERCER; DAY, 1953). As microfibrilas de quitina estão mergulhadas em uma matriz formada por proteína e glicoproteína, as quais interagem não covalentemente com a quitina. As proteínas que compõem a MP serão abordadas a seguir.

Figura 7 - Rede de quitina da MP com regular (A) e irregular (B) organização.



Fonte: Mecer e Day (1953).

1.4.1.1. Proteínas de MP

De acordo com a revisão de Tellam e colaboradores (1999), as proteínas da MP podem ser classificadas em 4 classes considerando-se o modo como são extraídas. As proteínas de classe 1 são facilmente removidas da MP por tampões fisiológicos ou com alta força iônica. São o menor grupo de proteínas da MP, em *Lucilia cuprina* representam menos de 1%. É provável que algumas destas proteínas são capturadas durante o trânsito no interior do intestino médio, enquanto outras são provavelmente fracamente ligadas a MP. Proteases digestivas são geralmente encontradas neste extrato, o que não é surpreendente devido à alta concentração destas enzimas digestivas no intestino (TELLAN *et al.*, 1999).

As proteínas de classe 2 são aquelas extraídas por detergentes. Os quais podem desfazer as interações relativamente fracas entre proteínas, entre proteína e quitina ou entre proteínas e outros carboidratos. Em *L. cuprina* as proteínas de classe 2 correspondem à aproximadamente 2% do total de proteína da MP (TELLAN *et al.*, 1999).

A classe 3 refere-se às proteínas extraídas por desnaturantes fortes, como ureia 6 M, guanidina-HCl 6 M e SDS. Representa a maior parte das proteínas solubilizadas da MP. Em *L. cuprina* são aproximadamente 11% do total de proteínas. Devido a forte interação com a MP, as proteínas desta classe são chamadas de peritrofinas (TELLAN *et al.*, 1999).

A quarta classe é composta por proteínas que não são extraídas por desnaturantes fortes. Aparentemente, a maior parte das proteínas da MP pertence a esta classe, representando aproximadamente 87% das proteínas da MP de *L. cuprina*. Presumidamente, estas proteínas estão covalentemente ligadas umas as outras ou a outros componentes, como quitina ou proteoglicanos. É incerto se estas proteínas são diferentes daquelas da classe 3.

Algumas peritrofinas estudadas, como as peritrofinas 44 e 48 de *L. cuprina*, apresentam pouca similaridade entre si, no entanto possuem 5 a 6 repetições de domínios com aproximadamente 65 - 70 aminoácidos, denominados de peritrofina A. Este domínio é comum nas peritrofinas, sendo caracterizado pela presença de 6 resíduos de cisteína, provavelmente formando 3 pontes dissulfeto. Além disso, há três aminoácidos hidrofóbicos, tipicamente aromáticos em posições específicas entre as cisteínas (TELLAN *et al.*, 1999). Em outras peritrofinas foram encontrados

variações do domínio peritrofina A, os quais apresentam 8 ou 10 resíduos de cisteína denominados de peritrofina B e C, respectivamente (TELLAN *et al.*, 1999; TOPRACK *et al.*, 2009). O domínio peritrofina A e suas variações são domínios ligantes à quitina, nos quais as pontes dissulfeto entre as cisteínas criam uma estrutura adequada para que os resíduos hidrofóbicos formem pontes de hidrogênio com a quitina (TOPRACK *et al.*, 2009). Análises das sequências de aminoácidos das peritrofinas demonstraram a presença de prováveis sítios de N-glicosilação, mas o grau e o tipo de glicosilação diferem das peritrofinas do tipo mucina, discutidas a diante (TELLAN *et al.*, 1999; TOPRACK *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2003)

No trabalho de WANG e colaboradores (2003) foram identificados dois genes de peritrofinas, CBD1 e CBD2, da MP de *Trichoplusia ni*, as quais contêm 10 e 12 domínios de ligação a quitina, respectivamente. O estudo da sequência de aminoácidos destas proteínas revelou que a maioria dos possíveis sítios de clivagem para tripsina e quimotripsina residem primariamente dentro das sequências dos domínios de ligação a quitina, limitando a exposição destes potenciais sítios de clivagem às proteases endógenas (WANG *et al.*, 2003).

Existem peritrofinas que além dos domínios de ligação a quitina, possuem domínios muito semelhantes às mucinas de mamíferos, são as chamadas peritrofinas do tipo mucina (“mucin-like”) ou mucinas intestinais de insetos comumente referidas pela sigla IIM proveniente da expressão em inglês “insect intestinal mucins” (HEGEDUS *et al.*, 2009; ZHANG; GUO, 2011). Mucinas possuem domínios ricos em prolina, serina e treonina que apresentam um alto grau de glicosilação, bem como domínios ricos em resíduos de cisteína (TELLAN *et al.*, 1999).

A primeira IIM caracterizada foi da MP de *Trichoplusia ni*. Hoje há dados referentes à IIM de várias espécies de insetos, como *Mamestra configurata*, *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, entre outras (TOPRAK *et al.*, 2010; SARAUER; GILLOTT; HEGEDUS, 2003; ZHANG; GUO, 2011). A IIM de *Trichoplusia ni* possui 5 domínios de ligação a quitina e no domínio do tipo mucina 80% dos hidroxil aminoácidos estão sujeitos a O-glicosilações. Os domínios de ligação à quitina e os sítios de O-glicosilação são comuns em IIMs (ZHANG; GUO, 2011; SHI *et al.*, 2004; TOPRAK *et al.*, 2010).

Os domínios mucina das IIMs são altamente resistentes à ação de proteases e protegem os outros componentes da MP da degradação por enzimas endógenas,

de patógenos ou vegetais (WANG; GRANADOS, 2001). Apesar disso, uma IIM recombinante de *Helicoverpa armigera* (HaIM86) foi degradada pela enhacina (ZHANG; GUO, 2011). A IIM presente na MP de *Trichoplusia ni* foi degradada por proteases cisteínicas (papaína e bromelaína), mas não por proteases serínicas (tripsina e quimotripsina) (LI *et al.*, 2009).

Um dos fatores que tornam as proteínas da MP resistentes à proteólise a partir de enzimas endógenas ou exógenas é a ligação das proteínas às microfibrilas de quitina, a qual minimiza a exposição das proteínas às proteases, bem como protege a quitina da degradação por enzimas quitinolítica (WANG; GRANADOS, 2001).

1.5. Espécies de insetos estudadas

1.5.1. *Danaus plexippus* L. – monarca

Esta espécie é popularmente conhecida como monarca (Lepidoptera: Nymphalidae) e são nativas das Américas do Norte e do Sul. Entretanto, no século XVII, espalharam-se para outras partes do mundo. Seu ciclo de vida inclui três fases: larva, pupa e adulto (Figura 5A-D). Durante a fase larval passa por cinco estágios (Figura 5A/B) (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2011). As larvas de *D. plexippus* alimentam-se de espécies da família Aclepiadoideae, chamadas de asclépias, são exemplos a *Asclepias syriaca*, *Asclepias incarnata*, *Cynanchum laeve* etc. No estado do Ceará e em outros Estados do Nordeste brasileiro são facilmente encontradas se alimentando de folhas de *C. procera*.

A monarca é bastante estudada devido a sua incrível rota de migração. As monarcas adultas da América do Norte voam para o sul para passar o inverno em locais de recolhimento. Na primavera, essas monarcas que sobreviveram ao inverno voam para o norte rumo a sua área de reprodução. A monarca é a única borboleta a fazer uma migração bidirecional tão longa, chegando a voar até 4.830 Km no outono para chegar ao destino onde passará o inverno (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2011). O estudo do genoma da Monarca foi realizado com o objetivo principal de entender melhor como a monarca realiza esta migração de longa distância. O genoma compreende 16,866 genes e providenciou um melhor entendimento do sistema de direcionamento da monarca (ZHAN *et al.*, 2011).

Figura 8 - Fases do ciclo de vida de *Danaus plexippus*



Fonte: autoria própria. (A) ovo e 1º estágio larval, (B) 2º ao 5º estágios da larva, (C) pupa e (D) adulto. A barra equivale a 1 mm.

As asclépias fornecem às monarcas uma defesa química eficaz contra vários predadores, os cardenolídeos, também denominados glicosídeos cardiotônicos. As larvas acumulam os cardenolídeos tornando-se venenosa a maioria dos vertebrados (BROWER; MOFFIT, 1974). A insensibilidade da monarca a oubaína, um cardenolídeo, é dada pela substituição de uma asparagina por uma histidina no provável sítio de ligação da oubaína na Na^+K^+ -ATPase (HOLZINGER *et al.*, 1992). Apesar de ser resistente, esta espécie não suporta se alimentar de plantas com elevados níveis de cardenolídeos (ZALUCKI; MALCOLM, 1999).

Além disso, as larvas podem morrer de inanição quando a mandíbula fica colada pelo látex ou o corpo mergulhado numa gota de látex formada quando a planta sofre algum dano (ZALUCKI *et al.*, 2001). Para reduzir o risco de serem imobilizadas e para evitar o efeito tóxico do látex, a larva de *D. plexippus* apresenta dois comportamentos distintos. Na primeira fase larval faz trincheiras circulares para diminuir o fluxo de látex (Figura 9). Quando maior, mastiga e corta a base da nervura central da folha, interrompendo o fluxo de látex viscoso para o restante da folha. Este comportamento reduz, mas não elimina a ingestão de fluido laticífero, sendo necessária certa resistência ao efeito tóxico do látex (DUSSOURD; EISNER, 1987).

Figura 9 - Trincheira circular feita por larvas de *D. plexippus* no primeiro estágio de vida



Fonte: Agrawal e Konno (2009).

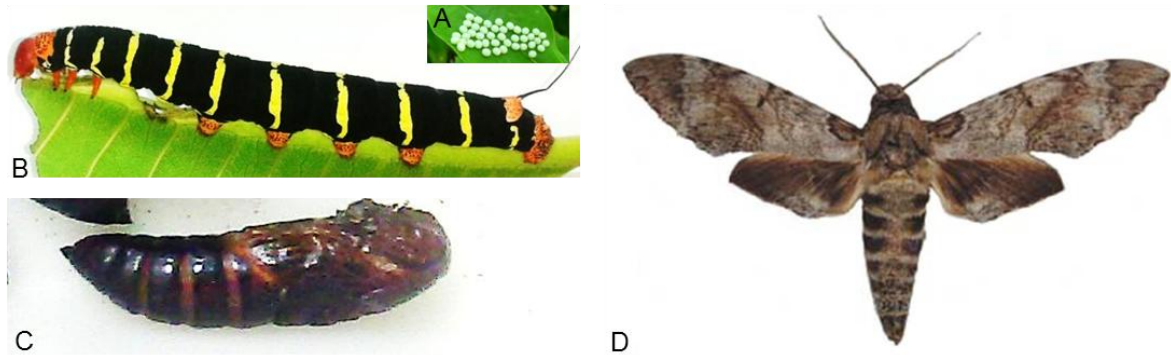
Os efeitos tóxicos do látex de várias espécies foram investigados, dentre elas destaca-se *C. procera*, da qual a fração proteica é tóxica para diferentes insetos, inclusive da ordem Lepidoptera (Ramos *et al.*, 2007). A toxicidade da fração proteica sobre as larvas de *D. plexippus* foi inicialmente investigada por Pereira e colaboradores (2010). Este estudo mostrou que de fato a larva não é afetada pela toxicidade da fração proteica, quando esta foi adicionada na dieta artificial em uma concentração de 5%. Ao contrário, o desenvolvimento das larvas nestas condições foi melhor do que o desenvolvimento de larvas alimentadas com a dieta controle. Foi ainda verificado que as proteases do extrato intestinal das larvas digerem rapidamente as proteínas do látex de *C. procera*, sendo esta uma das estratégias utilizadas para sobrepor o efeito tóxico de tais proteínas.

1.5.2. *Pseudosphinx tetrio* L.

Pseudosphinx tetrio (Lepidoptera: Sphingidae) é uma mariposa que ocorre no Brasil, entre outras regiões de clima tropical e subtropical. Também é chamada de *Sphinx plumeriae* (DUNFORD; BARBARA, 2011). As larvas desta espécie são comumente encontradas atacando plantas da família Apocynaceae, incluindo plantas laticíferas como as do gênero *Plumeria* (DUNFORD; BARBARA, 2011).

Seu ciclo de vida compreende as fases de larva, pupa e adulto (Figura 10 B-D). A fase larval frequentemente possui cinco estágios, mas pode chegar a seis, possuindo uma duração média de 24 dias. As larvas chamam atenção por sua coloração com listras pretas e amarelas, sendo vermelhas as extremidades do corpo, e pelo enorme tamanho, chegando a atingir 69 mm (SANTIAGO-BLAY, 1985).

Figura 10 - Ciclo de vida de *Pseudosphinx tetrio*.



Fonte: B e C são de autoria própria e D é adaptada de Dunford e Barbara (2011). (A) ovos, (B) larva no 5º estágio, (C) pupa e (D) adulto.

Os adultos alimentam-se do néctar das flores. Enquanto as larvas são devoradoras vorazes, podendo desfolhar uma árvore inteira em poucos dias, mas não causam danos irreversíveis, sendo possível o restabelecimento da planta (SANTIAGO-BLAY, 1985). Não são vistas durante o ano inteiro. Observações feitas por nosso grupo de pesquisa e por populares relatam sua aparição no Estado do Ceará no mês de Fevereiro. Relatos científicos de sua aparição datam do intervalo de julho a setembro na região do sul da Florida (DUNFORD; BARBARA, 2011).

Observações feitas nas folhas durante a coleta de *P. tetrio* revelaram que a estratégia utilizada pelas larvas para diminuir a ingestão de látex é o corte da nervura central da folha (Figura 11).

Embora seja uma espécie bastante conhecida, não há trabalhos que tenham investigado as estratégias que utiliza para sobrepor o efeito tóxico das plantas laticíferas que lhe servem de alimento.

Figura 11 – Corte da nervura central da folha de *P. rubra* por larvas de *P. tetrio*.



Fonte: autoria própria. Setas vermelhas indicam o corte da nervura central e a seta preta indica a área da folha que foi devorada pela larva.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar aspectos bioquímicos da interação entre plantas laticíferas e larvas especialistas nestas plantas, enfatizando a função defensiva de proteases e de inibidores de proteases em ambos os organismos.

Objetivos específicos

- 1 – Caracterizar a atividade proteolítica do fluido digestivo de *Pseudosphinx tetrio* e verificar sua capacidade de digerir proteínas de fluidos laticíferos;
- 2 – Determinar características de proteases cisteínicas do látex de *C. procera* (PCCps);
- 3 – Verificar a presença de inibidores de proteases nos fluidos laticíferos de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* e avaliar se tais inibidores agem sobre as proteases intestinais de larvas especialistas em plantas laticíferas, *D. plexippus* e *P. tetrio*;
- 4 – Avaliar se os fluidos intestinais de *D. plexippus* e *P. tetrio* apresentam atividade inibidora de proteases dos fluidos laticíferos de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*.
- 5 – Identificar proteínas da membrana peritrófica (MP) de *D. plexippus*;
- 6 – Avaliar se as proteases dos fluidos laticíferos em estudo degradam as proteínas da membrana peritrófica de *D. plexippus*, através de análise destas proteínas por eletroforese;
- 7 - Avaliar o efeito das proteínas dos látex sobre a membrana peritrófica de *D. plexippus*, através de microscopia de força atômica.

3 JUSTIFICATIVA

O látex vegetal possui proteínas de defesa contra insetos, tais como proteases, quitinases e inibidores de proteases (AGRAWAL; KONNO, 2009). Apesar disso, alguns insetos são predadores de plantas laticíferas, como é o caso das larvas de *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) e *Pseudosphinx tetrio* (Lepidoptera: Sphingidae). As bases bioquímicas da resistência/suscetibilidade de insetos aos componentes de fluidos laticíferos ainda não são amplamente esclarecidas. Assim, estudar a interação entre plantas e insetos é essencial para o entendimento do mecanismo de ação das moléculas de defesa vegetal, bem como para elucidar as estratégias utilizadas por alguns insetos para sobrepor tal defesa.

Neste contexto, as enzimas digestivas dos insetos são moléculas chaves necessárias à sobreposição de barreiras estruturais das plantas e para o processo de alimentação, tornando disponíveis componentes como aminoácidos e carboidratos e destruindo alguma macromolécula tóxica da planta hospedeira (CHEN *et al.*, 2013). Em contrapartida, as plantas desenvolveram mecanismos moleculares de defesa que suprimem a atividade de enzimas intestinais de insetos, como é o caso dos inibidores de proteases (BIJINA *et al.*, 2011; HIVRALE *et al.*, 2013). Assim, a caracterização das enzimas digestivas de insetos é uma etapa preliminar a ser realizada, a fim de compreender as habilidades de alimentação do inseto, pelo menos a nível bioquímico (GOPTAR *et al.*, 2013).

Por outro lado, os fluidos laticíferos também são ricas fontes de proteases, as quais são predominantemente do tipo cisteínica (KONNO, 2011). Tais proteases estão envolvidas na defesa contra insetos. O provável alvo destas moléculas é a membrana peritrófica dos insetos (MOHAN *et al.*, 2006). Embora as proteases de fluidos laticíferos sejam uma barreira defensiva contra o ataque de insetos, a larva de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) sobrepõe esta barreira. O fluido digestivo desta larva possui atividade inibidora de proteases cisteínicas do látex de *A. syriaca*, a qual protege sua membrana peritrófica da degradação por proteases laticíferas (LI *et al.*, 2009). Tal habilidade de inibir as proteases laticíferas confere a esta larva a capacidade de se alimentar de plantas produtoras de látex.

Outras larvas da ordem Lepidoptera também se alimentam de plantas laticíferas, como *D. plexippus* (monarca) e *P. tetrio*, as quais consomem as espécies *C. procera* e *P. rubra*, respectivamente (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2011;

DUNFORD; BARBARA, 2005). Ao investigar quais estratégias a monarca utiliza para não ser afetada pelo efeito tóxico do látex de *C. procera*, foi demonstrado que uma das táticas utilizadas é a rápida digestão da fração proteica do látex (PEREIRA *et al.*, 2010). Apesar desta descoberta, são necessários estudos que avancem na elucidação das estratégias utilizadas por *D. plexippus* e *P. tetrio* para burlar a ação defensiva das proteínas dos fluidos laticíferos de suas plantas hospedeiras.

Diante do exposto, para esclarecer os aspectos bioquímicos de resistência/suscetibilidade de insetos às moléculas de defesa do látex é notável a importância de: caracterizar a atividade proteolítica do fluido intestinal de larvas especialistas e avaliar sua capacidade em degradar as proteínas do látex; estudar o envolvimento de proteases e inibidores de proteases de fluidos laticíferos na defesa vegetal e investigar as estratégias utilizadas por larvas especialistas em plantas laticíferas para sobrepor o efeito das proteínas tóxicas do látex.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

4.1 Reagentes

Azocaseína, N-Benzoil-arginina-naftilamida (BANA), Benzoil-arginina-nitroanilida (BApNA), Trans-epoxisuccinil-leucil-amido-3-metil-butano (E-64), Fenil-metil-sulfonil-fluor (PMSF), 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA), *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e R-350, Pepstatina, Marcadores de massa molecular, Persulfato de amônio, Tiouréia, Ureia, Iodoacetamida (IAA) e membranas de diálise (8 kDa) foram obtidos de Sigma-Aldrich Co., USA. Acrilamida, Ácido tricloroacético (TCA), Ditioneitol (DTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) foram obtidos da GE Healthcare, Brasil. Azul de bromofenol foi obtido da Acros Organics, USA. Albumina sérica bovina (BSA) Fração V foi obtida de INLAB, Brasil. Triton X-100 foi obtido da USB Corporation, Cleveland, OH USA. Os ingredientes da dieta (sacarose, celulose, caseína, sais de Wesson, colesterol, cloreto de colina, ácido sórbico, ácido ascórbico, biotina, tiamina HCl, cloreto de colina, ácido fólico, inositol, niacinamida, piridoxina HCl, riboflavina e Ca-pantotenato) foram obtidos de Sigma-Aldrich Co., USA.

Os demais reagentes, como: ácidos, bases, soluções salinas e tampões, foram preparados a partir de reagentes de grau analítico.

4.2 Material animal

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram realizados com as larvas das espécies *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), popularmente conhecida como monarca, e *Pseudosphinx tetrio* (Lepidoptera: Sphingidae). As larvas foram coletadas no campo alimentando-se de folhas das plantas *Calotropis procera* e *Plumeria rubra*, respectivamente. No laboratório, foram elaboradas metodologias para o estabelecimento da criação em cativeiro, no entanto, apenas a espécie *D. plexippus* adaptou-se a criação em laboratório. O material utilizado nos experimentos proveniente da espécie *P. tetrio* foi coletado de lagartas capturadas no campo.

4.3 Material vegetal

As espécies vegetais *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra* foram utilizadas para a coleta de fluidos laticíferos. As plantas nas quais foi coletado o látex estavam localizadas na cidade de Fortaleza ou em sua região metropolitana. Tais espécies possuem exsiccatas depositadas no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com os números: N. 32663, N. 040409 e N. 15018, respectivamente.

MÉTODOS

4.4 Coleta e fracionamento do látex

A coleta do látex foi realizada através da quebra das extremidades de galhos ou ramos. O látex exsudado foi coletado em tubos de plástico sobre um volume de água destilada para finalizar uma razão de 1:1 (v:v). No laboratório, a amostra foi centrifugada a 5.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi colhido e submetido à diálise contra água destilada, seguido de liofilização. Este procedimento foi rotineiro para obtenção de quantidade de material satisfatório para os experimentos. A fração retida na membrana de diálise, rica em proteínas, foi denominada de PL (proteínas do látex). As proteínas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* são PLCp, PLCg e PLPr, respectivamente

4.5 Manutenção da *D. plexippus* em laboratório

As borboletas foram criadas em caixas de plástico com dimensões de 30 x 30 x 20 cm e alimentadas com uma solução de mel de abelha (10%). Nestas caixas ocorreu o acasalamento e a postura dos ovos sobre folhas de *C. procera*, as quais eram trocadas diariamente. Os ovos foram recortados das folhas e colocados em placas de Petri com papel de filtro umedecido. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram transferidas para caixas com dimensões de 30 x 15 x 12 cm. Nestas caixas, as larvas foram alimentadas com folhas de *C. procera*, diariamente trocadas, até se tornarem casulos. Os animais foram mantidos sob condições definidas de

temperatura (26 a 28 °C), umidade do ar (60 a 80%) e ciclo de luz (12 h luz/12 h escuro).

4.6 Obtenção dos extratos intestinais

Larvas de *D. plexippus* (5º estágio), proveniente da criação em laboratório, e larvas de *P. tetrío* (5º estágio), coletadas alimentando-se de plantas da espécie *P. rubra*, foram utilizadas para extração do trato digestório. Os tratos digestórios foram retirados, com auxílio de pinça, e homogeneizados em NaCl 0,15 M, seguido de centrifugação a 5.000 x *g* por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em algodão, obtendo-se os extratos intestinais de *D. plexippus* e *P. tetrío*, os quais foram denominados de EIDp e EI Pt, respectivamente. Todo o procedimento de retirada do trato digestório foi realizado sobre um recipiente contendo gelo.

4.7 Caracterização bioquímica do extrato intestinal de *P. tetrío* (EI Pt)

4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O EI Pt foi caracterizado quanto ao seu perfil de proteínas por eletroforese unidimensional (SDS – PAGE). O método utilizado foi o descrito por LAEMMLI (1970), com algumas adaptações. Os géis em placa foram montados nas dimensões de 8 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de aplicação continha 5% de acrilamida e 1% de SDS em solução tampão de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação, contendo 12,5% de acrilamida e 1% de SDS, foi montado em solução tampão de Tris-HCl 3 M, pH 8,8. A 20 µL de EI Pt foram adicionados 5 µL de solução tampão de amostra (Tris-HCl 0,31 M, pH 6,8, contendo SDS 10%) e os 25 µL resultantes da mistura foram aplicados no gel de eletroforese. A corrida eletroforética foi realizada sob amperagem constante de 40 mA, voltagem de 100 V, a 25 °C. Utilizou-se a solução de corrida contendo tampão de Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M e SDS 0,1%. A corrida eletroforética ocorreu em 2,5 horas. Após o término deste passo, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,2%), preparado em uma solução de água, ácido acético e metanol, respeitando as proporções de 6:1:3 (v/v/v), por um período de 4 horas. Em seguida, os géis foram descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização das bandas proteicas.

4.7.2 Zimograma para detecção de atividade proteolítica

O perfil de proteases do extrato intestinal de *P. tetrio* foi analisado por meio de zimograma. Para tanto, o gel de eletroforese foi preparado nas mesmas condições descritas no item 4.7.1. Todavia, o gel de separação continha gelatina a 0,1%. As condições da corrida eletroforética também foram descritas no item anterior. Após o término desta etapa, o gel contendo gelatina foi incubado por 40 minutos em solução de Triton X-100 2,5% e posteriormente por uma hora a 37 °C em solução tampão de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Os géis foram corados com solução de *Coomassie Brillante Blue R-250* (0,2%).

4.7.3 Ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato

A atividade proteolítica total de EIPT foi determinada utilizando o substrato inespecífico azocaseína, em diferentes valores de pH. Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50 mM (pH 5,0); fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0); Tris-HCl 50 mM (pH 7,0, 8,0 e 9,0). Foram utilizados 480 µL de cada solução tampão, aos quais foram adicionados 20 µL de EIPT e 200 µL de azocaseína 1%, seguido de incubação a 37 °C por uma hora. A reação foi interrompida com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. As soluções obtidas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi alcalinizado com 400 µL de NaOH 2 N. A leitura no espectrofotômetro foi realizada em uma absorbância de 420 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorbância a 420 nm em 0,01. Os resultados estão expressos em UA/µg de proteína. A quantidade de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976). O ensaio foi realizado em triplicata (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989).

4.7.4 Ensaio de atividade proteolítica utilizando BANA como substrato

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica de EIPT também foi avaliado quando N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA) foi utilizado como substrato. Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50 mM pH 5,0; fosfato de Sódio 50 mM pH 6,0; Tris-HCl 50 mM pH 7,0, 8,0 e 9,0. Utilizou-se 480

μL de cada solução tampão, aos quais foram adicionados 20 μL de EIPT e 200 μL de BANA (1 mM). As soluções foram, então, incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 500 μL de HCl 2% em etanol e 500 μL de 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA) 0,06% em etanol. Após 40 minutos, os resultados colorimétricos foram mensurados por absorvância a 540 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorvância a 540 nm em 0,01. Os resultados estão expressos em UA/ μg de proteína. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata (ABE *et al.*, 1992).

4.7.5 Ensaio de atividade proteolítica utilizando BApNA como substrato

O efeito do pH sobre a proteólise do BApNA (α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) por EIPT também foi verificado. Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50 mM pH 5,0; fosfato de Sódio 50 mM pH 6,0; Tris-HCl 50 mM pH 7,0, 8,0 e 9,0. Utilizou-se 480 μL de cada solução tampão, aos quais foram adicionados 20 μL de EIPT e 200 μL de uma solução de BApNA (1,25 mM). Seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida com o acréscimo de 120 μL de ácido acético 30%. Os resultados colorimétricos foram mensurados por absorvância a 405 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorvância a 405 nm em 0,01. Os resultados estão expressos em UA/ μg de proteína. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata (GOMES *et al.*, 2005).

4.7.6 Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica

Objetivando avaliar a estabilidade da atividade proteolítica em função da temperatura, EIPT foi incubado sob diferentes temperaturas (25, 37, 45, 60, 75 e 90 °C) por 15 e 30 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram submetidas à centrifugação (10.000 x g, 10 minutos). As atividades proteolíticas dos sobrenadantes foram mensuradas utilizando azocaseína como substrato a 37 °C em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), de acordo com os procedimentos descritos no item 4.7.3. Os resultados estão expressos em percentual de atividade, nos quais a atividade do extrato intestinal aquecido a 37 °C foi considerada 100%.

4.7.7 Ensaio de inibição de proteases utilizando azocaseína como substrato

Com o intuito de identificar quais os tipos de proteases poderiam estar presentes no extrato intestinal de *P. tetrio*, a atividade proteolítica foi avaliada quando o extrato foi separadamente pré-incubado por 30 minutos com alíquotas (20 µL) das seguintes soluções: E-64 0,18 mM, Iodoacetamida (IAA) 1 mM (ambos inibidores de proteases cisteínicas), PMSF 5 mM (inibidor de protease serínica), pepstatina 10 mM (inibidor de proteases aspárticas) e EDTA 10 mM (inibidor de metalo-proteases). Após este período, a proteólise sobre a azocaseína foi avaliada de acordo com a metodologia descrita no item 4.7.3, sendo que a solução tampão utilizada foi Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Os resultados estão expressos em percentual de atividade. A atividade do EIPt obtida na ausência de inibidores foi considerada 100%.

4.8 Digestão das proteínas de látex (PL) por proteases intestinais de *P. tetrio*

As frações PLs de *C. procera*, *P. rubra* e *Cryptostegia grandiflora* foram submetidas a ensaios de digestibilidade pelas enzimas intestinais de *P. tetrio*, de acordo com a metodologia descrita por RAMOS e colaboradores (2007). Alíquotas de albumina sérica bovina (BSA), PLPr, PLCp e PLCg (todas em solução tampão Tris-HCl, pH 8,0) foram separadamente incubadas com alíquotas de EIPt a fim de se obter uma razão da quantidade de proteína de 1:2 (PL:EIPt). As amostras foram incubadas a 37 °C e alíquotas foram coletadas com 0, 4, 8 e 24 h. Após a retirada das alíquotas, as mesmas foram congeladas. No final do experimento, as amostras nos diferentes tempos de incubação foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, o qual foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,2%). Este procedimento foi adotado com o intuito de comparar o perfil proteico das frações PL na presença e ausência do extrato intestinal, verificando se houve digestão das proteínas do látex pelas enzimas digestivas das larvas.

4.9 Bioensaio

O estabelecimento de *P. tetrio* sob condições laboratoriais não foi possível, devido a não adaptação da larva às condições artificiais. Assim, os bioensaios foram realizados apenas com a outra larva especialista em plantas laticíferas, *D. plexippus*. Esta larva adaptou-se bem às condições artificiais, incluindo uma dieta preparada especificamente para o seu desenvolvimento na fase larval.

4.9.1 Preparação da dieta artificial

A dieta artificial utilizada nos bioensaios foi obtida de acordo como descrito por Pereira e colaboradores (2010). Em sua composição há o pó da folha de *C. procera* que funciona como fagoestimulante para larvas de *D. plexippus*. Para obtenção do pó, folhas frescas foram coletadas, lavadas e cortadas em tiras de aproximadamente 5 cm de largura, as quais foram novamente lavadas com água para a retirada de todo o látex exsudado. Por fim, foram liofilizadas e trituradas, obtendo-se o pó da folha. Na preparação da dieta, o Agar foi dissolvido em água fervente, e os ingredientes listados em A (Tabela 1) foram, posteriormente, adicionados e misturados rapidamente por 2 minutos. Após esta etapa, resfriou-se a mistura a 70 °C e foram adicionados os ingredientes listados em B, misturando por 1 minuto. A dieta semissólida foi colocada nos recipientes e após solidificação, acondicionada a 8 °C até seu requerimento. A composição da mistura de vitaminas utilizada na dieta é descrita na Tabela 2.

Tabela 1 – Ingredientes da dieta artificial de *D. plexippus* (larvas)

| Ingredientes | | Quantidade | Percentual (%) |
|----------------------------------|---------|------------|----------------|
| Gérmen de trigo | A | 32,0 g | 2,0 |
| Sacarose | | 32,0 g | 2,0 |
| Celulose | | 5,4 g | 0,34 |
| Caseína | | 150,0 g | 10,0 |
| Levedura | | 22,0 g | 1,42 |
| Sais de Wesson | | 5,4 g | 0,34 |
| Colesterol | | 1,6 g | 0,1 |
| Cloreto de colina | | 1,3 g | 0,08 |
| Ácido sórbico | | 1,1 g | 0,07 |
| Nipagim | | 1,1 g | 0,07 |
| Ácido ascórbico | | 4,3 g | 0,28 |
| Pó da folha de <i>C. procera</i> | | 170,0 g | 11,0 |
| Clorotetraciclina | | B | 1,1 g |
| Formalina 2% | 13,0 mL | | - |
| Óleo de linhaça | 11,0 mL | | - |
| Mistura de vitaminas* | 16,0 mL | | - |
| KOH 10% | 11,0 mL | | - |
| Agar | | 12,0 g | 0,77 |
| Água | | 1000 mL | 73,4 |

*A composição da mistura de vitaminas está listada na Tabela 2

Tabela 2 – Composição da mistura de vitaminas da dieta artificial de *D. plexippus*

| Vitamina | Quantidade para 100 mL |
|-------------------|------------------------|
| Biotina | 2 mg |
| Ca-Pantotenato | 100 mg |
| Cloreto de colina | 5 g |
| Ácido Fólico | 25 mg |
| Inositol | 2 g |
| Niacinamida | 100 mg |
| Piridoxina HCl | 25 mg |
| Riboflavina | 50 mg |
| Tiamina HCl | 25 mg |

4.9.2 Efeito das frações PL sobre o desenvolvimento de *D. plexippus*

Larvas de *D. plexippus* recém-eclodidas foram alimentadas com dieta artificial controle (sem PL) até atingirem o 5º estágio. No segundo dia do 5º estágio, foram ofertadas às larvas dieta artificial contendo 1% de PLCg ou PLPr durante o período de três dias. Na preparação de dieta contendo as frações PL, soluções destas frações foram adicionadas a blocos de dieta com aproximadamente 0,5 g, resultando em percentual de 1% (p/p). Durante este experimento, foram determinadas a massa das larvas a cada 24 h e a mortalidade. O grupo controle consistiu de larvas alimentadas com dieta base (sem fração PL) durante toda fase larval. O número de indivíduos de cada grupo variou de 4 a 10. O efeito da fração PLCp sobre o desenvolvimento de *D. plexippus* não foi avaliado no presente estudo pelo fato de ter sido anteriormente observado no trabalho de PEREIRA e colaboradores (2010).

4.10 Purificação de proteases cisteínicas do látex de *C. procera* (PCCp)

Em alguns experimentos do presente trabalho houve a utilização de proteases cisteínicas purificadas do látex de *C. procera* (PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3). O protocolo de obtenção das PCCps foi previamente descrito por Ramos e

colaboradores (2013). As proteínas do látex (PLCp) foram submetidas a cromatografias de troca iônica em coluna de *CM-Sepharose fast flow*. PLCp (80 mg em 8 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) foi aplicado na coluna previamente equilibrada com a mesma solução de diluição. Esse procedimento originou três frações protéicas distintas, sendo a primeira composta por proteínas que não se ligaram à matriz (PL-PI) e as duas outras recuperadas através da imposição de força iônica crescente usando soluções contendo a solução tampão de equilíbrio acrescidas de NaCl a 0,2 M (PL-PII) e 0,3 M (PL-PIII), respectivamente. Todas as frações foram dialisadas em água destilada, liofilizadas e estocadas para posterior utilização. Os picos cromatográficos obtidos nesta cromatografia foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE 12,5%).

A fração PL-PII foi o material de partida para a purificação das proteases de *C. procera*. Este material foi submetido a novas cromatografias de troca iônica em uma nova coluna: *Resource® -S* (Amersham Biosciences, Brazil). As corridas foram automaticamente monitoradas por um sistema de alto desempenho (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*). Isso garantiu a alta reprodutibilidade de corridas cromatográficas sucessivas.

Nesta coluna, foram aplicados 3 mg/mL de PL-PII por cromatografia. A amostra foi dissolvida em solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,02 M pH 6,0. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente crescente de NaCl de zero até a concentração final de 1 M. Três picos protéicos (P4, P5 e P6), parcialmente sobrepostos foram obtidos. Estes picos correspondem às proteases nomeadas de PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3. A contaminação cruzada foi eliminada através do recolhimento de apenas os picos principais de absorção e re-aplicação sucessivamente de cada um desses picos na coluna, sob as mesmas condições. Em alguns ensaios deste trabalho foi utilizada a mistura das três proteases, obtida da coleta conjunta dos três picos (P4, P5 e P6).

4.11 Parcial caracterização das PCCps

Ainda no trabalho que descreveu a purificação das PCCps, Ramos e colaboradores 2013, algumas características destas proteínas foram determinadas, como massa molecular e sequência N-terminal. No entanto, outras características como ponto isoelétrico e a presença de carboidratos em sua estrutura não foram

analisadas. No presente trabalho estas características foram avaliadas, de acordo com metodologia descrita nos itens a seguir.

4.11.1 Determinação dos pontos isoelétricos de PCCp

PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3 foram, separadamente, submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Para tanto, foram dissolvidas em solução de uréia 8 M e tiouréia 2 M a uma concentração de 2 mg/mL, seguido de centrifugação (10000 x g por 10 minutos). A 75 µL do sobrenadante foram adicionados 225 µL de solução de hidratação (500 µL de uma solução com uréia 8 M e tiouréia 2 M, adicionada de 5 mg de DTT, 5 mg CHAPS, 2 µL de solução tampão IpG contendo anfólitos com os gradientes de pH de 6 a 11 e traços de azul de bromofenol). As misturas resultantes foram depositadas em poços do suporte *Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, onde as tiras de *Immobiline DryStrip* de 11 cm, pH 6-11, foram acomodadas sobre a solução, de maneira que, o lado da tira contendo o gel ficasse voltado para baixo, em contato com a amostra, para que esta fosse incorporada ao gel. As tiras foram, então, cobertas com óleo *DryStrip Cover Fluid*, com o intuito de evitar o ressecamento e localizar a amostra na região da tira que contém o gel. A re-hidratação do gel ocorreu durante 16 horas, à temperatura ambiente.

Após este período, foi realizada a focalização isoelétrica das proteínas. Para tanto as tiras foram posicionadas no aparelho focalizador IPG phor II e submetidas às seguintes condições de corrida: 200 V por 1 h, 500 V por 2 h 30 min, 5000 V por 2 h, 10000 V até 18000 VhT.

Após a etapa de focalização, as tiras foram submersas na solução de equilíbrio (Tris-HCl pH 8,8, 2% de SDS, 6 M de ureia, 30% de glicerol (v/v), 0,002% de azul de bromofenol) contendo DTT 0,1% durante 15 minutos. Posteriormente, foram submersas em solução de equilíbrio contendo IAA 0,1% durante 15 minutos. Este tratamento preparou as tiras para a realização da segunda etapa eletroforética. Nesta etapa, as tiras foram colocadas sobre géis de poliacrilamida 12,5% contendo SDS 0,1%, montados em sistema de placas verticais. O sistema foi selado com agarose 1,5% contendo azul de bromofenol para facilitar a visualização da frente de migração. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 180 V e 25 mA, por placa, e realizada à temperatura ambiente. A solução utilizada para a corrida eletroforética continha Tris 0,025 M pH 8,3 acrescido de glicina 0,192 M e SDS 0,1%.

Ao final do processo, os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1% em água, ácido acético e metanol (8:1:4; v/v/v) durante 4 horas e, posteriormente, descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização dos spots proteicos.

Os géis foram, então, analisados pelo programa ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 para estimar os pontos isoelétricos. Os parâmetros utilizados para detectar os spots dos géis foram “smooth” (4), área mínima (12) e saliência (35).

4.11.2 Análise das PCCps com solução reveladora de glicoproteínas (Schiff)

A revelação para glicoproteína foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Zacharius e colaboradores (1969), adaptado para géis em placa. Após eletroforese, o gel foi fixado com TCA 12% por 30 minutos, seguido de periodato 1% em ácido acético 3% por 1h. Em seguida, após a adição do reagente de Schiff (Sigma) o gel permaneceu sobre agitação no escuro por 50 minutos. O excesso de corante foi retirado com sucessivas lavagens com água destilada e o gel foi submetido à lavagem com metabissulfito de potássio 0,5%. Concanavalina A (ConA) foi utilizada como controle negativo e ribonuclease como controle positivo.

4.12 Ensaio de inibição de proteases pelas frações PL aquecidas (PL-AQ)

Objetivando eliminar a atividade proteolítica, as frações PL de *C. procera*, *P. rubra* e *Cr. grandiflora* (5 mg/mL em água destilada) foram aquecidas a 95 °C por 30 minutos. Após centrifugação (10000 x g, 10 minutos a 25 °C), o precipitado foi descartado e o sobrenadante liofilizado. As amostras aquecidas foram nomeadas de PLCp-AQ, PLCg-AQ e PLPr-AQ. A inibição de proteases foi verificada através de ensaio colorimétrico utilizando azocaseína e BApNA como substrato, de acordo com o método descrito nos itens 4.7.3 e 4.7.5, respectivamente.

As frações PL-AQ foram diluídas em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) a uma concentração de 10 mg/mL. Antes dos ensaios, a papaína foi incubada (25 °C) por 10 min com 40 µL de uma solução ativadora de proteases cisteínicas (DTT 3 mM e EDTA 2 mM). Posteriormente, alíquotas de 50, 100 e 200 µL de cada solução de PL-AQ foram independentemente incubadas por 30 min com alíquotas de: papaína (EC 3.4.22.2) (0,1 mg/mL nos ensaios com azocaseína e 1,5 mg/mL nos

ensaios com BApNA), tripsina (EC 3.4.21.4) (0,1 mg/mL), EIDp e EIPt. O ensaio ocorreu em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), a sua quantidade foi ajustada de modo que a soma das alíquotas de solução tampão, PL-AQ, fonte de enzima e solução ativadora de proteases cisteínicas (quando utilizada) fosse 500 µL. A atividade remanescente foi verificada através dos ensaios colorimétricos. As atividades proteolíticas na ausência das frações PL-AQ foram consideradas 100%. Os resultados estão expressos em percentual de atividade em função da quantidade de proteínas contidas nas alíquotas (50, 100 ou 200 µL) de PL-AQ, a qual foi estimada pelo método de Bradford (1976).

4.13 Efeito das frações PL-AQs sobre o desenvolvimento de *D. plexippus*

O efeito das frações PL de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* aquecidas (PL-AQ) sobre o desenvolvimento de *D. plexippus* foi avaliada através de bioensaio. Soluções das frações PL-AQs foram adicionadas a blocos de dieta (0,5 g) de forma que a concentração final foi 1% (p/p). Os blocos de dieta contendo as frações PL-AQ foram ofertados às larvas no segundo dia do quinto estágio durante um período de três dias. Durante este período, o peso das larvas foi acompanhado a cada 24 horas, além disso, os índices de mortalidade também foram observados. Cada grupo, experimentais e controle, constaram de 6 larvas.

4.14 Ensaio de inibição de proteases pelos extratos intestinais aquecidos (EI-AQ)

Os extratos intestinais de *D. plexippus* e *P. tetrico* também foram submetidos a tratamento térmico (95 °C por 30 min), a fim de eliminar a atividade proteolítica endógena. Após tratamento térmico, os EIs foram centrifugados (10000 x *g* por 10 minutos a 25 °C) e os sobrenadantes foram denominados de EIDp-AQ e EIPt-AQ. A presença de atividade inibidora de proteases nos EI-AQs foi verificada através de ensaios colorimétricos utilizando azocaseína e BANA como substratos. Inicialmente, as proteases cisteínicas (papaína, frações PLs e PCCps) foram pré-incubadas por 10 minutos com 40 µL de solução ativadora de proteases cisteínicas (DTT 3 mM e EDTA 2 mM). Posteriormente, alíquotas (10, 20 e 30 µL) dos EI-AQ foram separadamente incubadas com alíquotas de: papaína (0,1 mg/mL), tripsina (0,1

mg/mL), PLCp (2 mg/mL), PLCg (2 mg/mL), PLPr (2 mg/mL) e PCCps (mistura de proteases PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3 a 1 mg/mL). O ensaio foi conduzido em solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), a sua quantidade foi ajustada de modo que a soma das alíquotas de solução tampão, EI-AQ, fonte de enzima e solução ativadora de proteases cisteínicas (quando utilizada) totalizasse 500 μ L. Após 30 minutos de incubação, a atividade remanescente foi verificada através dos ensaios colorimétricos de acordo com metodologia descrita nos itens 4.7.3 e 4.7.4, respectivamente para ensaios com azocaseína e BANA. As atividades proteolíticas na ausência das frações EI-AQ foram consideradas 100%. Os resultados estão expressos em percentual de atividade em função das quantidades de proteínas contidas nas alíquotas (10, 20 ou 30 μ L) de EI-AQ, as quais foram estimadas através do método de Bradford (1976).

4.15 Análise da membrana peritrófica (MP) de *D. plexippus*

4.15.1 Excisão da MP

Larvas de *D. plexippus* (5° estágio) recém-alimentadas com folhas de *C. procera* foram imobilizadas em baixa temperatura (-20 °C) por seis minutos e os intestinos foram dissecados. O epitélio intestinal foi removido e a MP envolvendo o bolo alimentar foi exaustivamente lavada com água destilada para que todo o conteúdo alimentar fosse removido. As MPs foram estocadas a -20 °C até serem requeridas.

4.15.2 Extração de proteínas da MP

As MPs foram separadamente incubadas com as seguintes soluções: tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5), SDS 2%, SDS 2% adicionado de β -mercaptoetanol 5%, Ureia 6 M e ácido acético 50 mM. Em seguida, as MPs foram maceradas e quando incubadas com β -mercaptoetanol, foram também aquecidas a 95 °C por 5 minutos. Após 30 minutos sob agitação, as soluções foram centrifugadas (10000 x *g* por 10 minutos a 4 °C). A 20 μ L dos sobrenadantes foram acrescidos 5 μ L de solução tampão de amostra (cinco vezes concentrado), resultando em uma concentração final de: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8) e SDS 2%. As proteínas extraídas

foram então analisadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Posteriormente, as proteínas do gel foram reveladas com nitrato de prata. Para tanto, o gel foi primeiramente incubado com metanol (40%), por 30 minutos, seguido de incubação por 1 minuto com tiosulfato de sódio (0,2 mg/mL) e 20 minutos em solução de nitrato de prata (2 mg/mL) adicionado de formaldeído (37 µL para 50 mL de solução). Posteriormente, o gel foi incubado com 50 mL de uma solução de carbonato de sódio (0,04 g/mL) contendo 25 µL de formaldeído e 2 mL da solução de tiosulfato de sódio (0,2 mg/mL). Por fim, o gel foi incubado com a solução de parada (0,32g de glicina + 62 mL de água). Entre cada troca de soluções, o gel foi lavado três vezes com água grau Milli-Q.

4.15.3 Detecção de glicoproteínas na MP

MPs foram incubadas com solução tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% e traços de azul de bromofenol], seguido de maceração, aquecimento a 95 °C, agitação (30 minutos) e centrifugação (10 000 x *g* por 10 minutos). O sobrenadante resultante foi aplicado no gel de eletroforese (SDS-PAGE 15%). Posteriormente, as glicoproteínas foram reveladas com reagente de Schiff, de acordo com método descrito no item 4.11.2. A lectina de *Cratylia argentea* (CFL) foi utilizada como controle negativo e ribonuclease utilizada como controle positivo.

4.15.4 Análise proteômica da MP

MPs foram incubadas com solução tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% e traços de azul de bromofenol], seguido de maceração, aquecimento a 95 °C, agitação (30 minutos) e centrifugação (10 000 x *g* por 10 minutos). O sobrenadante resultante foi aplicado no gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 15%). As proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (0,2%) de acordo com método descrito no item 4.7.1. Após a eletroforese, as proteínas foram removidas do gel e processadas para análise por espectrometria de massas como descrito por Hellman e colaboradores (1995). Os peptídeos trípticos obtidos foram analisados utilizando um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK). Os resultados foram submetidos ao banco

de dados NCBI, através da utilização do programa MASCOT (Matrix Science Ltd., London, UK, <http://www.matrixscience.com>) como ferramenta de pesquisa.

4.15.5 Análise *in vivo* da degradação de proteínas da MP de *D. plexippus*

Larvas de *D. plexippus* no segundo dia do 5º estágio foram alimentadas por quatro dias com dieta artificial contendo 1% de fração PL (PLCp, PLCg ou PLPr) ou dieta controle. No quarto dia as larvas foram sacrificadas e as MPs foram excisadas. As proteínas das MPs foram extraídas por solução tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e traços de azul de bromofenol] de acordo como descrito no item 4.14.3, seguido de análise por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 15%). As proteínas foram reveladas com nitrato de prata como anteriormente descrito (4.14.2).

4.15.6 Análise *in vitro* da degradação de proteínas da MP de *D. plexippus*

Objetivando padronizar a quantidade de MP a ser incubada com as enzimas e com a solução tampão (controle), utilizou-se sempre aproximadamente 2 mg (massa úmida) de MP. Inicialmente foi avaliado se proteases serínicas (tripsina e quimotripsina) e cisteínica (papaína) degradam as proteínas da MP de *D. plexippus*. No ensaio de degradação das proteínas por proteases serínicas, as MPs foram independentemente incubadas com 50 μ L de: tripsina (1,5 mg/mL), quimotripsina (1,5 mg/mL) ou solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (controle). Já na avaliação da degradação pela protease cisteínica purificada (papaína) e pelas frações PL, as MPs foram, separadamente, incubadas com 50 μ L de: papaína (0,1 mg/mL), PLCp (1 mg/mL), PLCg (1 mg/mL), PLPr (1 mg/mL) e solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle). As soluções diluentes das enzimas ou PLs são as mesmas de seus respectivos controles. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as misturas foram centrifugadas (10000 x g por 10 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e 50 μ L de solução tampão de amostra foram adicionados ao precipitado (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS e 5 % β -mercaptoetanol). As MPs foram maceradas e sujeitas a aquecimento a 95 °C por 5 minutos, seguido de agitação por 30 hora e centrifugação (10000 x g por 10 minutos a 25 °C). Os sobrenadantes (20 μ L) foram analisados por SDS-PAGE 12,5% e as

proteínas foram visualizadas por revelação com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita no item 4.14.2.

Para verificar se há um sinergismo entre quitinases e proteases laticíferas, as MPs foram tratadas com proteases purificadas do látex de *C. procera* (PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3), bem como com a fração cromatográfica proveniente de PLCp chamada de PL-PI, rica em atividade quitinolítica. Para tanto as MPs foram incubadas a 37 °C com 50 µL de: PCCp-1 (1 mg/mL), PCCp-2 (1 mg/mL), PCCp-3 (1 mg/mL), PL-PI (1 mg/mL) seguido de PCCp-1 (1 mg/mL), PL-PI (1 mg/mL) seguido de PCCp-2 (1 mg/mL), PL-PI (1 mg/mL) seguido de PCCp-3 (1 mg/mL), apenas PL-PI e solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle). O período de pré-incubação com PL-PI e de incubação com as proteases duraram 1 hora cada. Após este período as misturas foram centrifugadas (10000 x g por 10 minutos a 4 °C) e aos precipitados adicionados 50 µL de solução tampão de amostra (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS e 5% β-mercaptoetanol) seguido dos procedimentos citados acima e de SDS-PAGE 15%, a qual foi revelada com nitrato de prata.

4.15.7 Microscopia de força atômica da MP de *D. plexippus*

O efeito de enzimas laticíferas sobre a integridade estrutural da MP foi avaliada através da técnica de microscopia de força atômica. As MPs foram coletadas de indivíduos alimentados com folhas frescas de *C. procera* e incubadas por 1 hora a 37 °C com: PLCp (1 mg/mL), PCCps – mistura das proteases – (1 mg/mL), PLCg (1 mg/mL), PLPr (1 mg/mL) e solução tampão de fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle). A solução diluente das enzimas foi a mesma do controle. Após o tratamento, as MPs foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A MP contida no precipitado, foi lavada várias vezes com água grau Milli-Q. Cada lavagem foi seguida de centrifugação para retirada do sobrenadante. Após estes procedimentos as MPs foram imediatamente analisadas por microscopia de força atômica. O conjunto de imagens foi gerado utilizando o equipamento Multimode Nanoscope IIIa (Bruker, Santa Barbara, CA). O método utilizado foi o de varredura por contato intermitente (tapping mode) utilizando uma sonda de cantilever retangular (TESP - Bruker) com constante de mola de 42 N/m. As imagens foram adquiridas com varreduras de 0.5 Hz e resolução de 512 x 512

linhas (máximo do equipamento). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente. Foram geradas imagens tridimensionais (3D) e imagens que representam a altura (AL) do relevo da amostra, nas quais as áreas pretas denotam altura zero e as áreas mais claras denotam altura máxima. As imagens estão representadas nas seguintes escalas: 50, 30, 20 e 10 μm . Além disso, foram mensuradas a medidas de rugosidade média de cada imagem, as quais estão expressas em μm .

4.16 Análise estatística

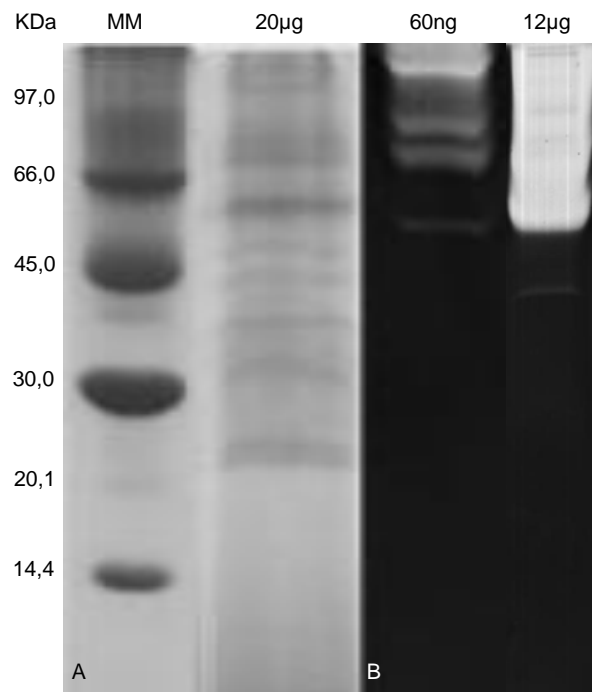
Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as suas médias foram comparadas pelos testes de Dunnett e Tukey, de acordo com a necessidade, onde valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Para tais análises utilizou-se o programa estatístico *GraphPad Prism Software* versão 4.0 (San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da atividade proteolítica do extrato intestinal de *P. tetrio*

O extrato intestinal de larvas de *P. tetrio* (5^o estágio) foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Na qual se observa algumas proteínas com massas moleculares aparentes acima de 97 KDa. No entanto, a maior parte das proteínas possui massa molecular aparente entre 20,1 e 97 KDa (Figura 12A). A atividade proteolítica do extrato intestinal foi avaliada através de zimograma contendo 0,1% de gelatina, no qual se observa que a maioria das proteases possuem massa molecular aparente acima de 45 KDa, com exceção de uma discreta atividade proteolítica detectada na zona de proteínas com massa molecular aparente entre 45 e 30 KDa (Figura 12 A e B).

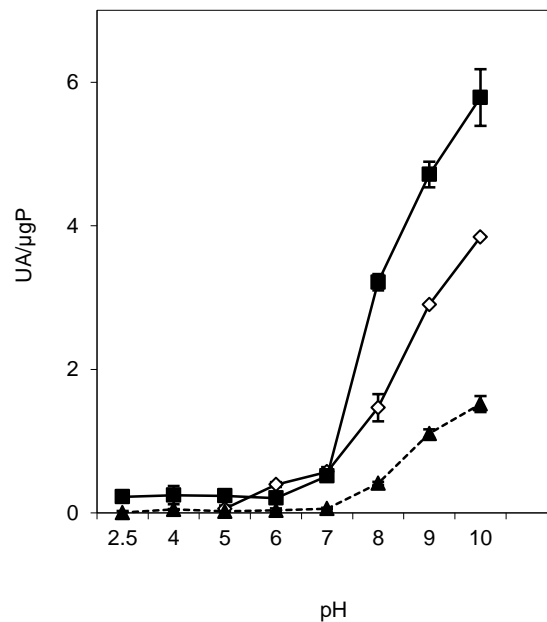
Figura 12 - Eletroforese (A) em gel de poliacrilamida (12,5%) e zimograma (B) para detecção de proteases do extrato intestinal de *P. tetrio* (5^o estágio).



Proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250. MM: marcador de massa molecular. Foram aplicados 20 µg de proteínas no gel de eletroforese e 60 ng ou 12 µg de proteínas no zimograma. O gel do zimograma contém 0,1% de gelatina.

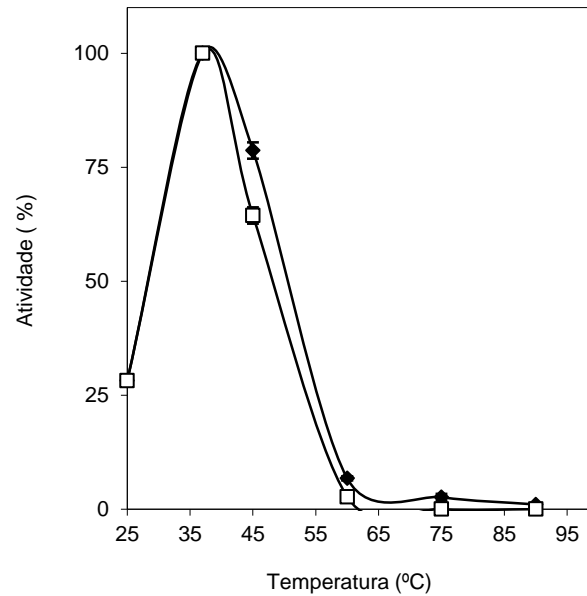
As proteases intestinais digeriram eficientemente os substratos azocaseína, BANA e BApNA, sendo maior a degradação do ultimo substrato. Entretanto, nenhuma proteólise foi observada em pH inferior a 7,0. A atividade proteolítica aumentou com a elevação do pH, independente do substrato utilizado (Figura 13). Estes resultados sugerem que o sistema proteolítico de *P. tetrio* é altamente ativo em condições de pH alcalinas. A atividade proteolítica do extrato intestinal foi maior quando o mesmo foi aquecido a 37 °C, enquanto que quando a aquecido a 60 °C a atividade foi eliminada (Figura 14).

Figura 13 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *P. tetrio* utilizando azocaseína (\diamond), BApNA (\blacksquare) e BANA (\blacktriangle) como substratos.



Enaio realizado a 37 °C. UA/μgP : Unidade de atividade/μg de proteína. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorbância em 0,01. A estimativa da quantidade de proteína foi realizada através do método de Bradford (1976). Os dados mostram médias de três determinações independentes \pm desvio padrão.

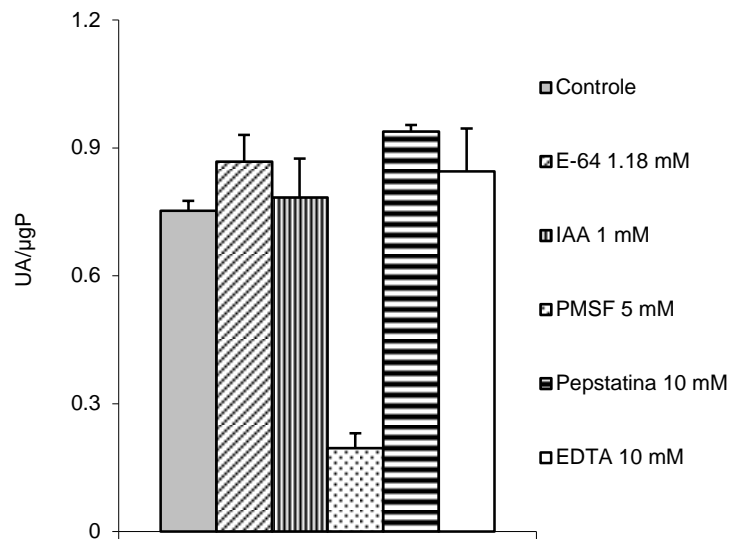
Figura 14 - Termo estabilidade da atividade proteolítica do extrato intestinal de *P. tetrio* (EIPt)



Alíquotas de EIPt foram aquecidas por 15 min (◆) ou 30 min (□) antes de avaliar a proteólise sobre a azocaseína a 37 °C e em pH 8,0. Os resultados estão expressos em percentual de atividade, nos quais a atividade do extrato intestinal aquecido a 37 °C foi considerada 100%. Os dados mostram médias de três determinações independentes \pm desvio padrão.

Os efeitos de inibidores de proteases de diferentes classes (cisteínica, serínica, aspártica e metálo-proteases) sobre o extrato intestinal foram avaliados com o intuito de identificar o tipo de atividade proteolítica predominante no extrato. O inibidor de proteases do tipo serínica (PMSF) diminuiu drasticamente a atividade proteolítica do extrato intestinal, indicando a predominância deste tipo de proteases no trato digestório da larva (Figura 15). Os inibidores de proteases cisteínicas, E-64 e IAA, bem como os inibidores de proteases aspárticas (Pepstatina) e metálo-proteases (EDTA) não reduziram a atividade proteolítica do extrato intestinal (Figura 15).

Figura 15 – Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas de *P. tetrio* (5° estágio)

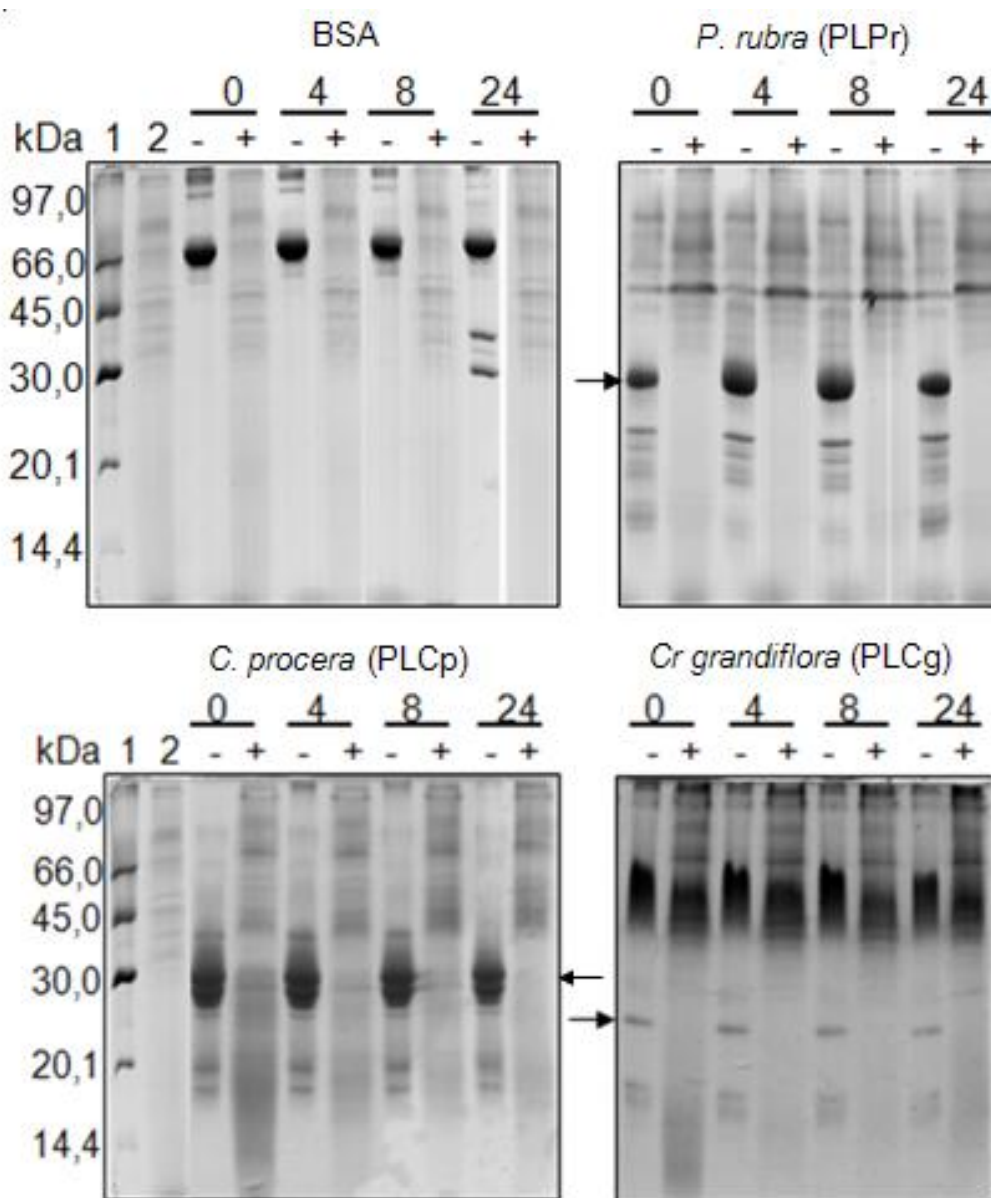


Dados são médias de três determinações independentes. As barras indicam o desvio padrão da média. A atividade proteolítica foi mensurada sobre a azocaseína em pH 8,0. Abreviações: E-64, trans-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)butano; IAA, iodoacetamida; PMSF, fenilmetilsulfonil flúor; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético.

5.2 Digestão de proteínas do látex por proteases intestinais de *P. tetrio*

A habilidade de larvas de *P. tetrio* em digerir as proteínas do látex de sua planta hospedeira *P. rubra* (PLPr) e de outras duas plantas laticíferas, *C. procera* (PLCp) e *Cr. grandiflora* (PLCg), foi avaliada. Para tanto, inicialmente foi verificada a digestão da BSA pelas enzimas do extrato intestinal, demonstrando que o extrato deteve a capacidade de digestão, evidenciando que seu processo de obtenção e armazenamento foram adequados. PLPr e PLCp foram imediatamente (tempo zero) digeridas pelas proteases do extrato intestinal de *P. tetrio*, enquanto que PLCg foi parcialmente digerida. Estes resultados levam a questionar se larvas de *P. tetrio* podem se desenvolver adequadamente em dieta artificial contendo PLCp, PLCg e PLPr sendo este questionamento também é válido para outra larva especialista em plantas laticíferas, *D. plexippus*.

Figura 16 – Digestão de BSA, PLCp, PLCg e PLPr pelo extrato intestinal de larvas de *P. tetrio* (5° estágio).

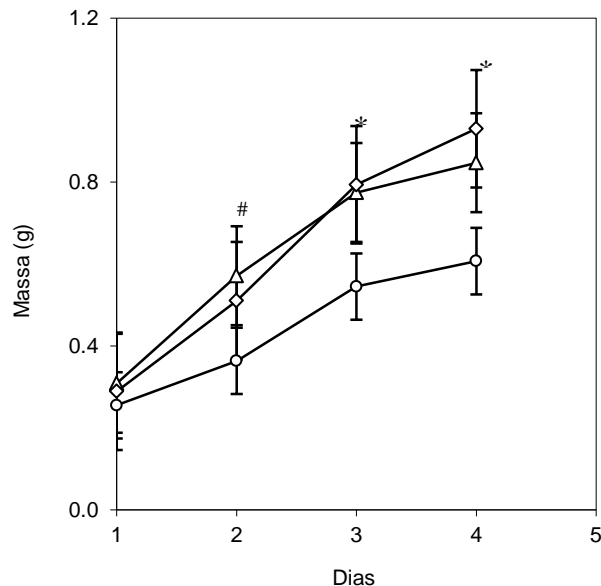


Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de BSA (bovine serum albumin), PLPr, PLCp e PLCg incubadas com o extrato intestinal de *P. tetrio* (5° estágio) em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 8 e 24 horas). 1, marcador de massa molecular; 2, extrato intestinal de *P. tetrio*. Proteínas do látex (PL) ou BSA como controle negativo (-); extrato intestinal incubado com PL (+) ou BSA. As setas indicam digestão predominante.

5.3 Desenvolvimento de larvas de *D. plexippus* alimentadas com dieta artificial adicionadas de proteínas do látex

Tentativas de cultivar *P. tetrio* em laboratório não foram bem sucedidas. Devido a este fato, bioensaios para avaliar o desenvolvimento destas larvas em dieta artificial adicionada de proteínas do látex não foram realizados. Por outro lado o protocolo de obtenção de larvas de *D. plexippus* alimentadas com dieta artificial foi estabelecido com sucesso. Larvas recém-eclodidas foram mantidas com dieta artificial controle até atingirem o quinto estágio, quando foram alimentadas por três dias com dieta artificial adicionada de 1% de PLCg ou PLPr. As frações proteicas não causaram mortalidade e não afetaram o desenvolvimento das larvas (Figura 17). Ao contrário, o ganho de peso das larvas alimentadas com dieta artificial contendo 1% das frações proteicas de ambos fluidos laticíferos foi mais rápido do que larvas alimentadas com dieta controle.

Figura 17 – Desenvolvimento de larvas de *D. plexippus* alimentadas com dieta artificial contendo 1% de PLCg (Δ) ou PLPr (\diamond) e dieta controle (\circ).



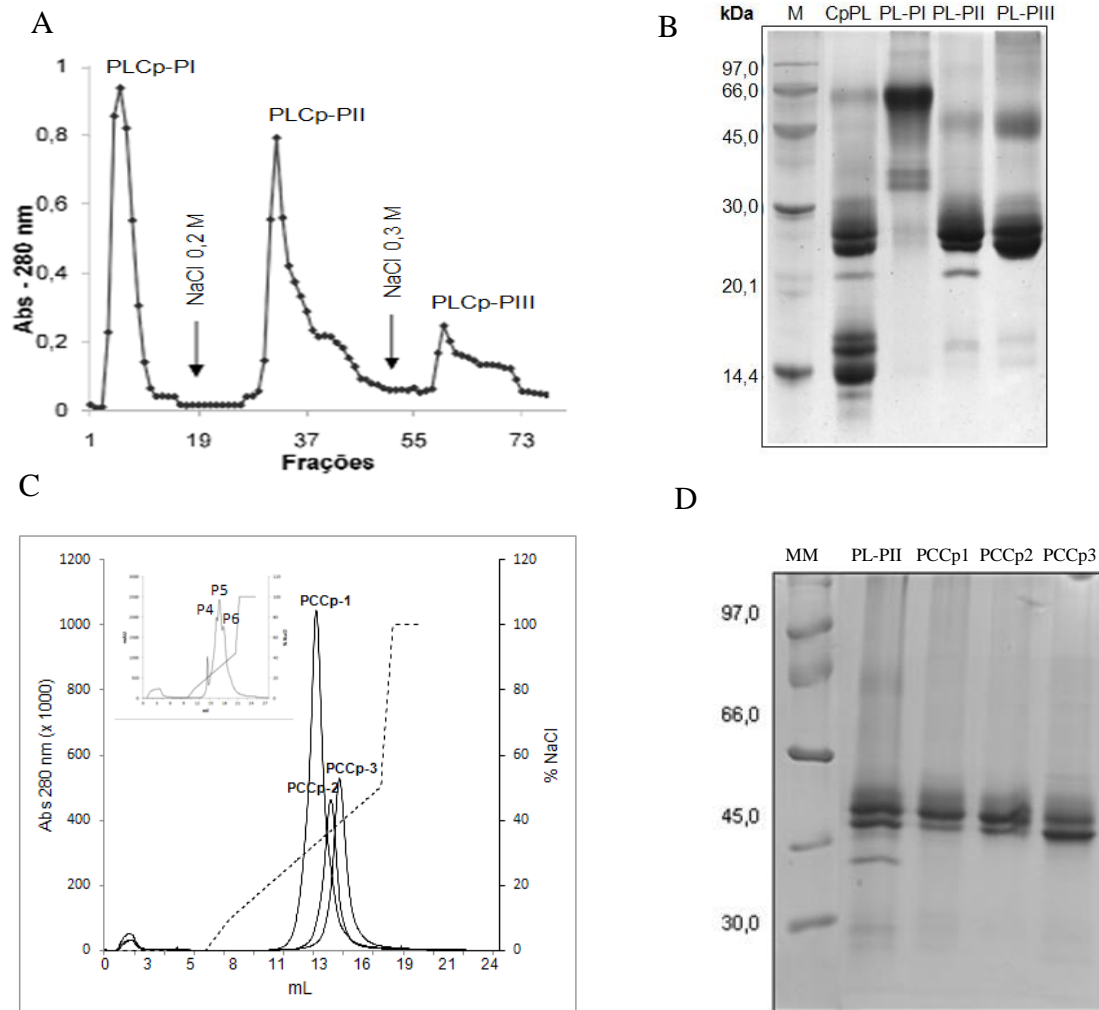
A massa das larvas foi medida por 4 dias, o primeiro dia corresponde ao dia zero. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão de 4 – 10 larvas. Testes de Dunnett e Tukey foram realizados. *Valores (controle versus PLPr e PLCg) diferiram estatisticamente ($P < 0,05$). # Valores (controle versus PLPr) diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

5.4 Purificação e caracterização de proteases cisteínicas do látex de *C. procera* (PCCp)

Para a realização das próximas etapas deste trabalho foi necessário isolar proteases do látex de *C. procera*, seguindo um protocolo de purificação previamente estabelecido (RAMOS *et al.*, 2013). Além disso, algumas características das proteases ainda não avaliadas foram estabelecidas no presente trabalho. As proteases foram purificadas em dois passos cromatográficos. O primeiro passo consistiu em uma cromatografia de troca iônica em coluna de *CM-Sepharose fast flow*, na qual foram obtidos três picos, PL-PI, PL-PII e PL-PIII (Figura 18 A e B).

PL-PII foi refracionado em cromatografia de troca iônica usando uma matriz *Resource S* acoplada a um sistema de FPLC (fast protein liquid chromatography) (Figura 18 C e D). Dentre os picos obtidos, P4, P5 e P6 ficaram sobrepostos (ver inserção na figura 18C). Para separar essas proteínas, foram recolhidas apenas as frações correspondentes ao topo de cada pico, e estas foram repassadas na cromatografia sob as mesmas condições. A partir da recromatografia de P4, P5 e P6 foram obtidas as proteases cisteínicas do látex de *C. procera*: PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3, respectivamente.

Figura 18 – Purificação de isoformas de proteases cisteínicas do látex de *C. procera* (PCCp)



(A) Perfil cromatográfico de PLCp submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de *CM-Sepharose fast flow* em pH 5,0. (B) Eletroforese (SDS-PAGE 12,5%) dos picos obtidos na cromatografia de PLCp em coluna de *CM-Sepharose fast flow*. (C) Perfil cromatográfico do fracionamento de PL-PII em cromatografia de troca iônica *Resource S* em pH 6,0. (D) Eletroforese (SDS-PAGE 12,5%) de PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3. A figura de segundo plano inserida no gráfico (C) corresponde ao perfil cromatográfico inicial obtido na primeira tentativa de separação das proteases do PL-PII. A linha pontilhada representa o gradiente salino.

As PCCps foram submetidas à eletroforese bidimensional para determinar o ponto isoelétrico (PI), os quais foram mensurados pelo programa ImageMaster™ 2D Platinum 7.0. As eletroforeses bidimensionais podem ser visualizadas na Figura 19. Os pontos isoelétricos (PIs) das isoformas de PCCp-1 variaram de 7,50 a 8,11, enquanto os PIs de PCCp-2 e PCCp-3 variaram de 7,49 a 8,27 e de 7,98 a 8,91, respectivamente (Tabela 3).

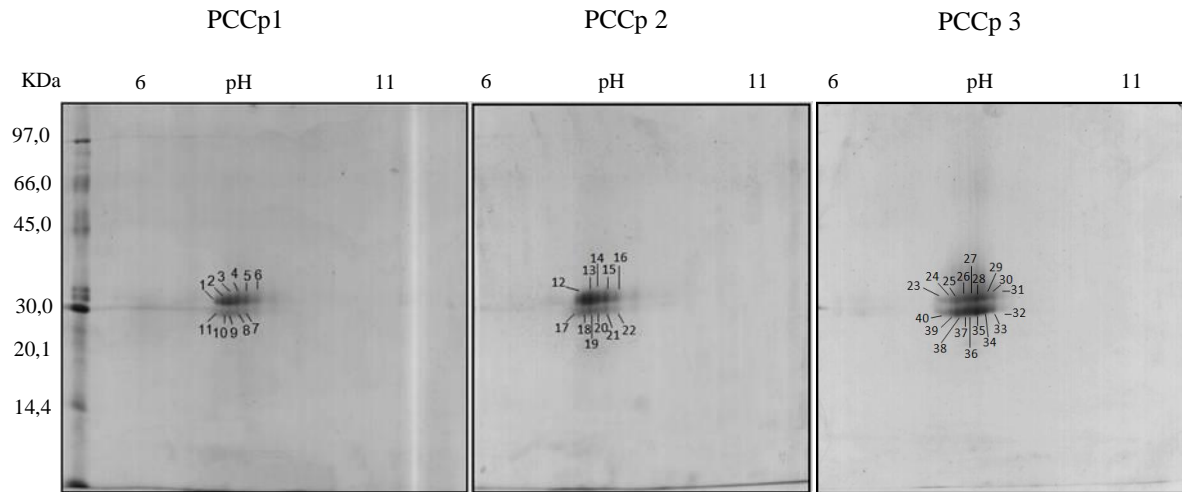
Figura 19 - Eletroforese bidimensional das proteases cisteínicas de *C. procera* (PCCp) 1, 2 e 3.

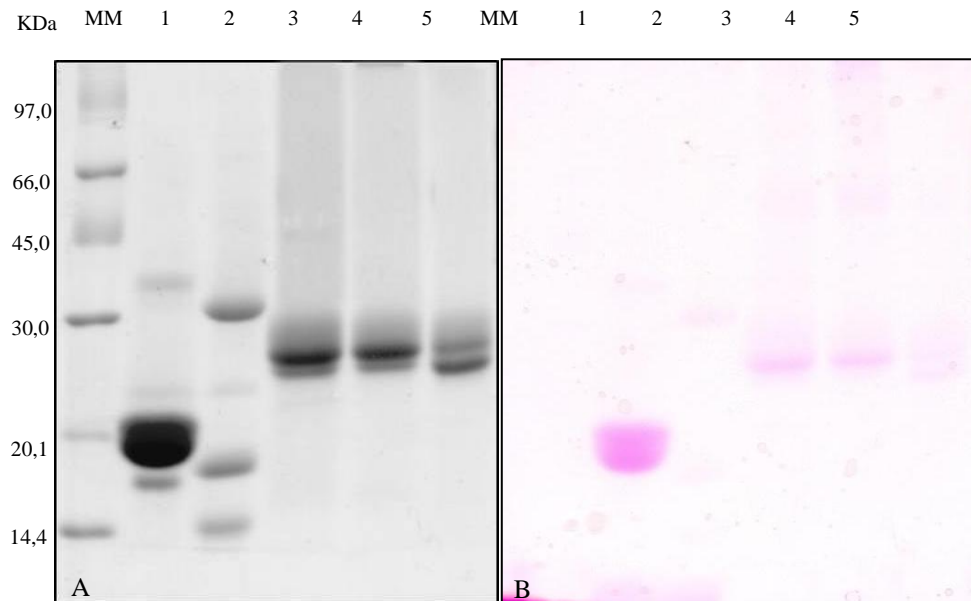
Tabela 3 – Pontos isoelétricos dos spots observados nas eletroforeses bidimensionais de PCCps

| Spot | PI | Spot | PI | Spot | PI | Spot | PI |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 7,50 | 11 | 7,49 | 21 | 8,13 | 31 | 8,91 |
| 2 | 7,59 | 12 | 7,80 | 22 | 8,28 | 32 | 8,89 |
| 3 | 7,69 | 13 | 7,90 | 23 | 7,98 | 33 | 8,74 |
| 4 | 7,81 | 14 | 8,00 | 24 | 8,08 | 34 | 8,62 |
| 5 | 7,94 | 15 | 8,12 | 25 | 8,18 | 35 | 8,50 |
| 6 | 8,11 | 16 | 8,27 | 26 | 8,30 | 36 | 8,42 |
| 7 | 7,93 | 17 | 7,70 | 27 | 8,42 | 37 | 8,28 |
| 8 | 7,80 | 18 | 7,80 | 28 | 8,50 | 38 | 8,18 |
| 9 | 7,69 | 19 | 7,90 | 29 | 8,61 | 39 | 8,08 |
| 10 | 7,59 | 20 | 8,01 | 30 | 8,74 | 40 | 7,98 |

Os valores de PI foram mensurados através das análises dos géis pelo programa ImageMaster™ 2D Platinum 7.0.

Para determinar se as PCCps são glicoproteínas, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) seguida de coloração com solução de Schiff. As proteases reagiram positivamente, confirmando serem glicoproteínas (Figura 20).

Figura 20 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% das PCCps com revelação para glicoproteínas



A – proteínas coradas com Coomassie brilliant blue R-250; B – proteínas reveladas com solução reveladora de glicoproteínas (Solução de Schiff); 1 - controle positivo (ribonuclease); 2 – controle negativo (ConA); 3 – PCCp1; 4 – PCCp2 e 5 – PCCp3.

5.5 Inibição da atividade proteolítica dos extratos intestinais pelas frações PL-AQ

Para eliminar a atividade proteolítica dos fluidos laticíferos, as frações proteicas (PLCp, PLCg e PLPr) foram aquecidas a 100 °C por 30 minutos, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se frações denominadas de PLCp-AQ, PLCg-AQ e PLPr-AQ. A sigla AQ é proveniente da palavra aquecida. Ensaio de atividade proteolítica comprovaram a falta desta atividade nos PL-AQ.

Através de ensaios colorimétricos utilizando azocaseína e BApNA, as atividades proteolíticas da papaína e tripsina, bem como dos extratos intestinais de *D. plexippus* e *P. tetrio*, foram avaliadas quando pré-incubadas por 30 minutos com as frações proteicas dos látex aquecidas (PL-AQs). Os gráficos contendo o percentual de atividade resultante após incubação com as PL-AQs estão demonstrados na Figura 21. Na análise dos gráficos observa-se que a atividade proteolítica praticamente não foi inibida quando o substrato azocaseína foi utilizado, com exceção da inibição da papaína por PLCg-AQ (aproximadamente 94%).

Quando BApNA foi utilizado como substrato, PLCp-AQ e PLCg-AQ reduziram consideravelmente a atividade proteolítica da papaína para 45 e 13%, enquanto que PLPr-AQ não alterou significativamente a atividade desta enzima. Estes resultados indicam a presença de inibidores de proteases cisteínicas nos fluidos laticíferos de *C. procera* e *Cr. grandiflora*. A atividade da tripsina foi pouco reduzida por PLCp-AQ e PLCg-AQ, resultando em 63 e 81% de atividade remanescente, respectivamente. A tripsina não foi inibida por PLPr-AQ.

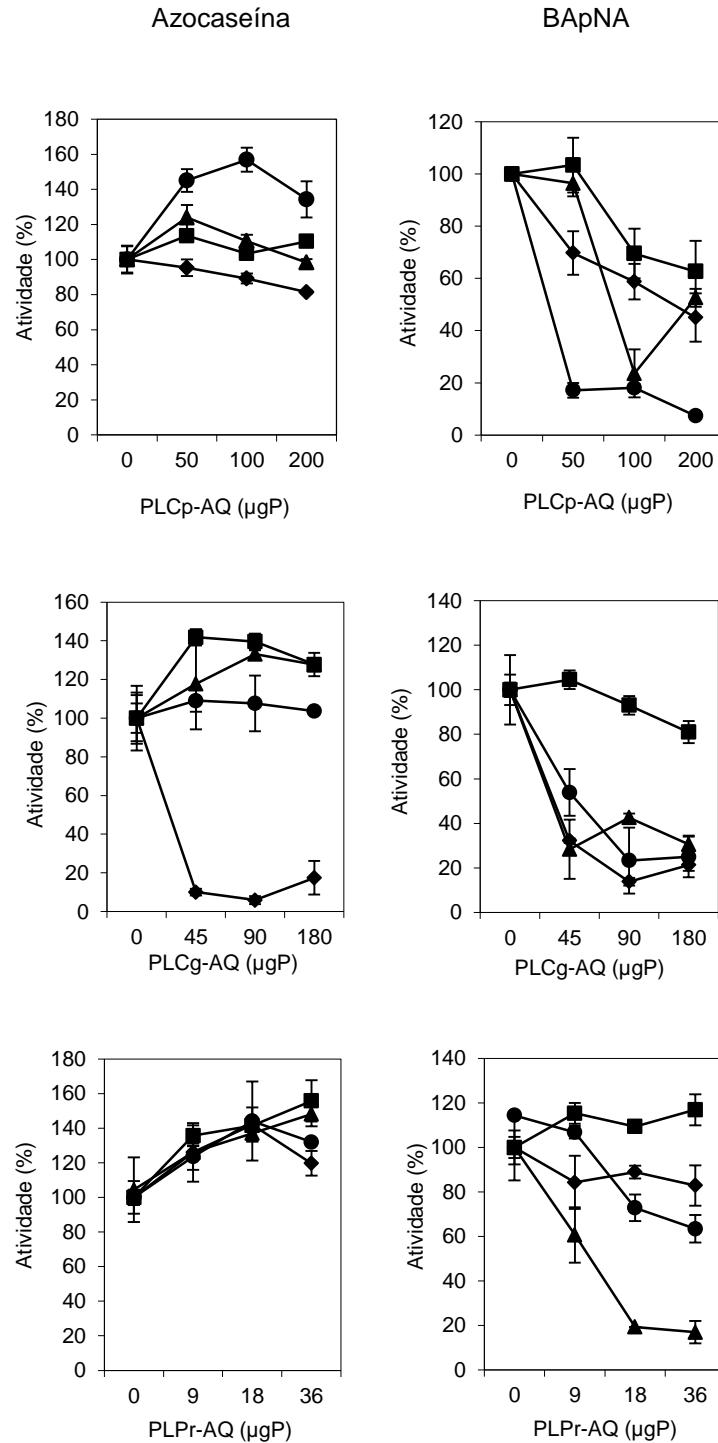
A atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. plexippus* foi drasticamente reduzida a 7% pela fração proteica de sua planta hospedeira (PLCp-AQ), bem como por PLCg-AQ, a qual reduziu a atividade para 25%. Enquanto que, PLPr-AQ pouco diminuiu a atividade proteolítica de extrato intestinal da monarca, sendo 64% a atividade remanescente. A proteólise do BApNA pela proteases do extrato intestinal de *P. tetrio* foi severamente inibida pela fração proteica de sua planta hospedeira (PLPr-AQ), bem como por PLCp-AQ e PLCg-AQ, sendo a atividade proteolítica reduzida a 15, 25 e 30%, respectivamente. Estes resultados indicam que as frações proteicas dos fluidos laticíferos possuem inibidores de proteases ativos contra proteases intestinais de larvas que se alimentam de plantas laticíferas.

Objetivando avaliar os efeitos dos inibidores de proteases dos fluidos laticíferos no desenvolvimento de *D. plexippus*, as frações proteicas aquecidas (PLCp-AQ, PLCg-AQ e PLPr-AQ) foram separadamente adicionadas à dieta artificial a uma concentração de 1% e ofertadas às larvas no quinto estágio durante o período de três dias. As frações PL-AQs não afetaram o desenvolvimento das larvas (Figura 22).

5.6 Inibição de proteases pelos extratos intestinais de *D. plexippus* e *P. tetrio*

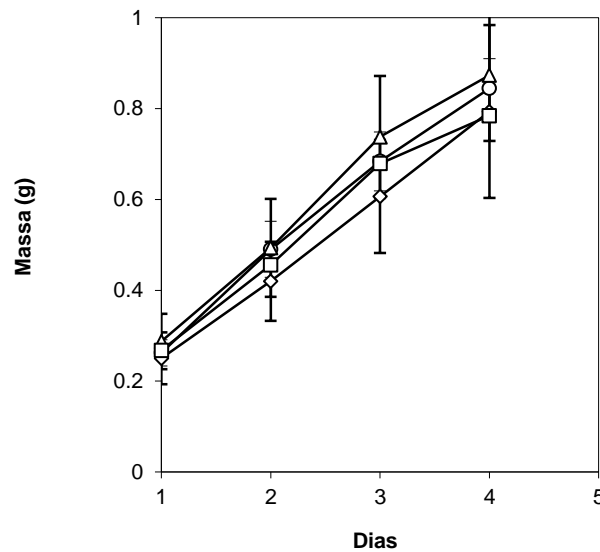
A presença de atividade inibidora de proteases também foi verificada no extrato intestinal das larvas, para tanto os extratos também foram submetidos a tratamento térmico (100 °C por 30'), seguido de centrifugação e os sobrenadantes foram nomeados de EIDp-AQ (extrato intestinal de *D. plexippus* aquecido) e EIPt-AQ (extrato intestinal de *P. tetrio* aquecido). Ensaios de atividade proteolítica comprovaram a falta desta atividade nos EI-AQ.

Figura 21 – Efeito de PLCp-AQ, PLCg-AQ e PLPr-AQ sobre a atividade proteolítica dos extratos intestinais de *D. plexippus* (●), *P. tetrio* (▲), papaína (◆) e tripsina (■)



Dados são médias de três determinações independentes \pm desvio padrão. As atividades das enzimas ou extratos intestinais na ausência de PL-AQs foram consideradas 100% de atividade. Ensaio realizado em pH 7,5.

Figura 22 – Desenvolvimento de larvas de *D. plexippus* alimentadas com dieta artificial contendo 1% de PLCp-AQ (□), PLCg-AQ (Δ) e PLPr-AQ (◇) e dieta controle (○)



As massas das larvas foram medidas por 4 dias, o primeiro dia corresponde o dia zero. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão de 6 larvas.

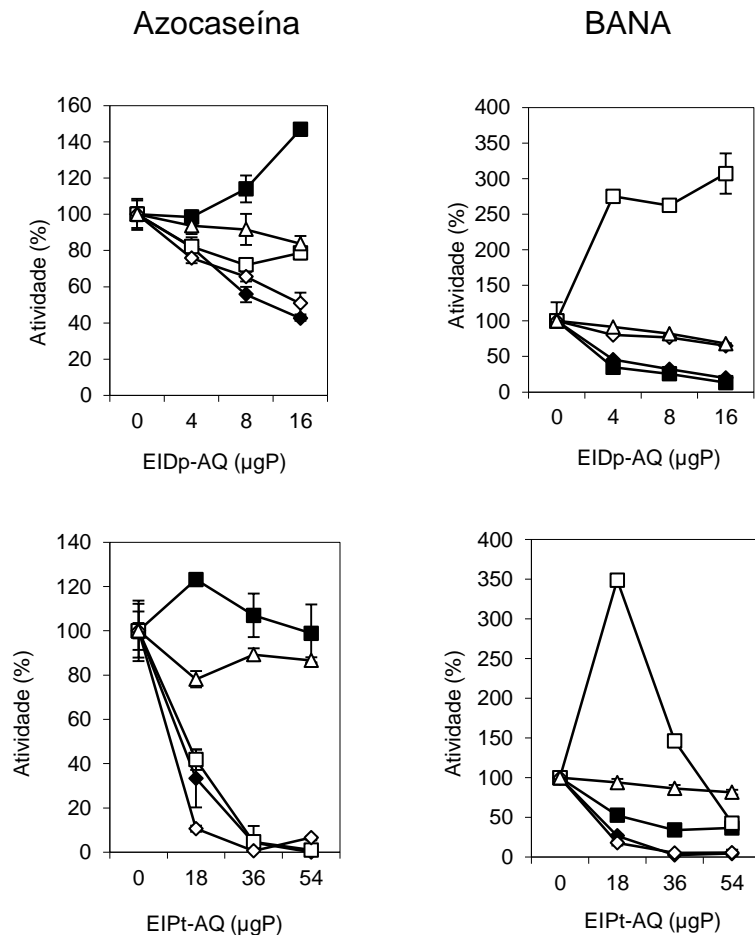
A atividade proteolítica da papaína, tripsina e frações PL foram avaliadas após incubação por 30 minutos com EI-AQs, utilizando azocaseína e BANA como substratos. A atividade da papaína foi drasticamente reduzida por EIDp-AQ e EIPt-AQ, independente do substrato utilizado (Figura 23). A atividade da tripsina foi semelhantemente reduzida por ambos os extratos intestinais, no entanto, apenas quando BANA foi utilizado como substrato (Figura 23). Estes resultados indicam a presença de atividade inibidora de proteases cisteínicas e serínicas nos tratamentos digestórios de *P. tetrio* e *D. plexippus*.

O EIDp-AQ inibiu discretamente a atividade proteolítica das três frações PL, independente do substrato. Com exceção da atividade de PLCp sobre o substrato BANA, a qual aumentou cerca de 300% quando pré-incubada com EIDp-AQ. EIPt-AQ praticamente não inibiu a atividade proteolítica de sua planta hospedeira (PLPr), mas drasticamente inibiu a proteólise de PLCg e PLCp sobre ambos os substratos. Excetuando a proteólise de PLCp sobre o BANA, a qual aumentou aproximadamente 350% quando pré-incubada com a menor alíquota de EIPt-AQ (10 μ l correspondendo a 18 μ g de proteína), no entanto foi reduzida a 54% pela maior alíquota utilizada (30 μ l correspondendo a 54 μ g de proteína).

O efeito de EIPt-AQ sobre a atividade das isoformas de proteases cisteínicas purificadas do látex de *C. procera* - PCCp - (Figura 24) foi semelhante ao seu efeito sobre a atividade proteolítica de PLCp (Figura 23). A atividade de PCCp foi reduzida a 50% por EIDp, confirmando que no trato digestório de larvas de *D. plexippus* há atividade inibidora de proteases de sua planta hospedeira.

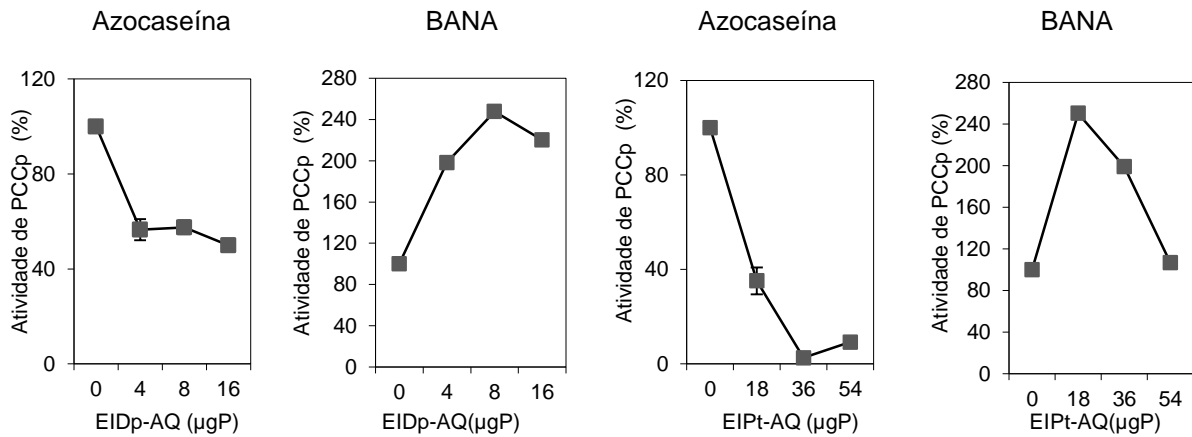
Este conjunto de resultados indica que no intestino de ambas as larvas há atividade inibidora das proteases de látex, no entanto apenas em *D. plexippus* foi evidenciado que tal inibição pode influenciar na relação com a planta hospedeira.

Figura 23 – Efeito de EIDp-AQ e EIPt-AQ sobre a atividade proteolítica de PLCp (□), PLCg (◇), PLPr (△), papaína (◆) e tripsina (■).



Dados são médias de três determinações independentes \pm desvio padrão. Os ensaios foram conduzidos em pH 7,5. A atividade das proteases na ausência dos extratos intestinais aquecidos foram consideradas 100%.

Figura 24 – Inibição de proteases purificadas do látex de *C. procera* (PCCp ■) por EIDp-AQ e EIPI-AQ

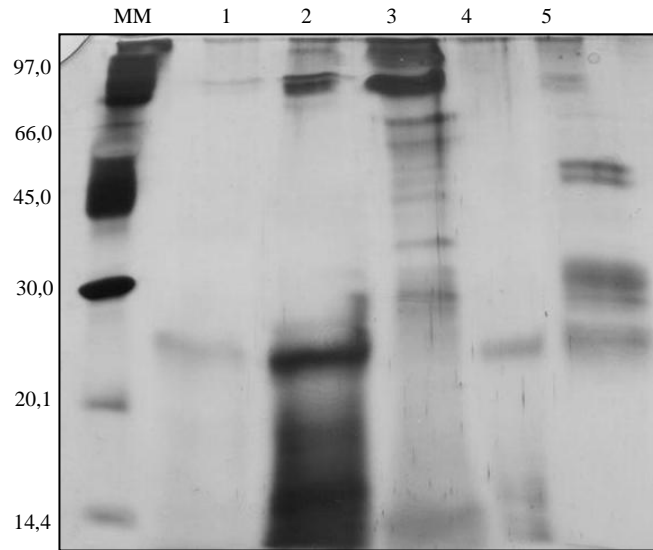


Dados são médias de três determinações independentes \pm desvio padrão. Os ensaios foram conduzidos em pH 7,5. A atividade das proteases na ausência dos extratos intestinais aquecidos foram consideradas 100%.

5.7 Análise das proteínas da membrana peritrófica (MP) de *D. plexippus*

Para analisar as proteínas da MP de *D. plexippus* foi necessário desenvolver um método adequado de extração de proteínas da membrana, neste contexto diferentes soluções de extração foram utilizadas: PBS (50 mM e pH 7,5), SDS 2%, SDS 2% e β -mercaptoetanol 5%, Ureia 6 M e ácido acético 50 mM. A eletroforese da Figura 25 mostra as proteínas extraídas por cada solução. Tris-HCl e Ureia 3 M extraíram a menor variedade de proteínas. Ácido acético extraiu variadas proteínas com massas moleculares aparentes entre 45 e 20,1 KDa, no entanto, não extraiu eficientemente uma banda proteica abundante, com massa molecular aparente de 97 KDa. SDS extraiu eficientemente esta banda proteica e SDS adicionado de β -mercaptoetanol a extraiu melhor ainda, além de uma variedade de proteínas com massas moleculares aparentes entre 66 e 30 KDa. Dessa forma, foi estabelecido o seguinte método de extração de proteínas da MP para aplicação em eletroforeses: incubação da MP com tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e traços de azul de bromofenol, seguido de maceração, aquecimento a 95 °C, agitação (30 minutos) e centrifugação (10 000 x g por 10 minutos). O sobrenadante resultante foi o material utilizado nas subseqüentes eletroforeses das proteínas da MP.

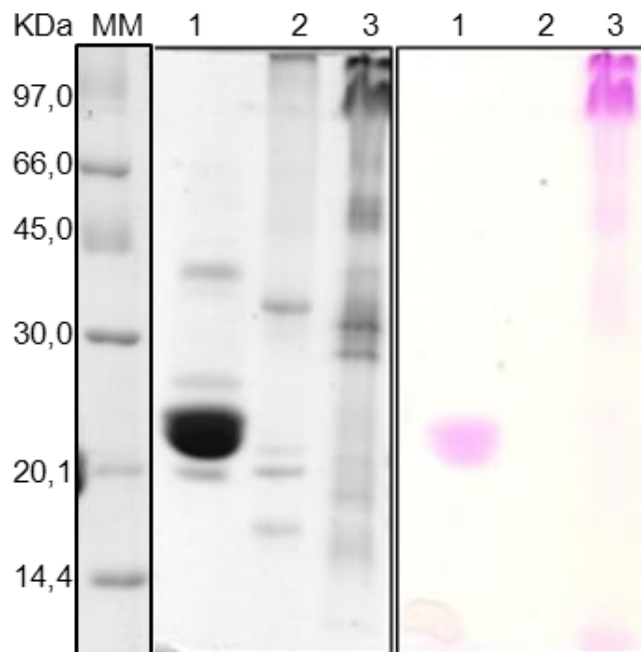
Figura 25 – Extração de proteínas da MP de *D. plexippus* (5º estágio larval de desenvolvimento)



Legenda: extração de proteínas da MP por – 1 – tampão PBS pH 7,5; 2 - SDS 2%; 3 - SDS 2% e β -mercaptoetanol 5%; 4 – Ureia 6 M e 5 - ácido acético 50 mM. MM: marcador de massa molecular.

A revelação das proteínas da MP com solução de Schiff revelou que a banda proteica com massa molecular aparente de 97 KDa é uma glicoproteína (Figura 26).

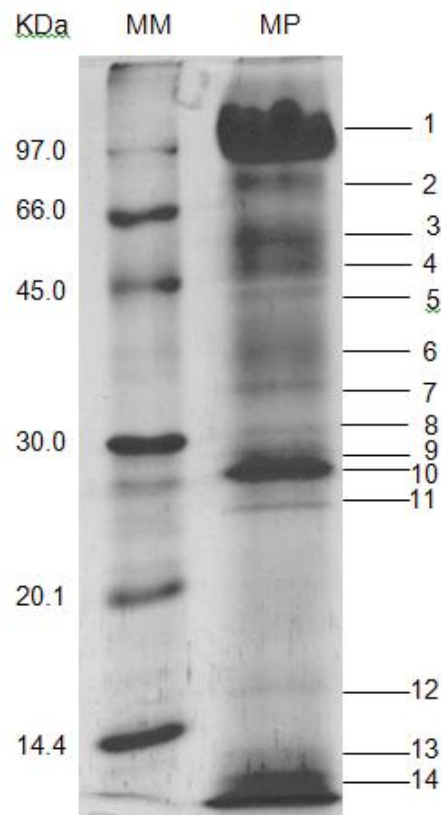
Figura 26 - SDS-PAGE da MP de *D. plexippus* com revelação de glicoproteínas



Legenda: 1 - controle positivo (ribonuclease); 2 – controle negativo (CFL); 3 – MP de *D. plexippus*.

As proteínas da MP foram extraídas do gel de eletroforese (Figura 27) e digeridas com tripsina, seguido de análise em Espectrômetro de Massas. Os resultados da análise foram submetidos à pesquisa em banco de dados (NCBI). Através da qual se constatou que a proteína mais abundante da MP é uma mucina intestinal de inseto (IIM) (Figura 27 e Tabela 4). Além desta foram identificadas: actina, lipase inativa e precursor de protease serínica (Tabela 4).

Figura 27 - Proteínas da MP de *D. plexippus* (5º estágio)



Legenda: MM – marcador de massa molecular; MP – membrana peritrófica de *D. plexippus*.

Tabela 4 - Proteínas identificadas da MP de *D. plexippus* (5º estágio)

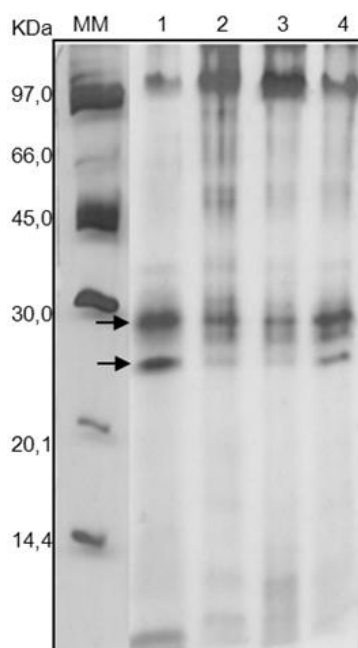
| *Nº | Teórico | | Score | Sequencia de todos os peptídeos identificados | ID (NCBI) | Descrição da proteína |
|-----|-----------------------|-----|-------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------|
| | Massa molecular (kDa) | PI | | | | |
| 1 | 34.4 | 5.3 | 129 | QCPATLHFNR, VIQVCDWPINAGCAK | gi 357614978 | Mucina intestinal de inseto [<i>D. plexippus</i>] |
| 6 | 42.2 | 5.3 | 284 | SYELPDGQVITIGNER, DLYANTVLSGSTTMYPGIADR, EITALAPSTMK | gi 525328813 | actina-4 [<i>Bombyx mori</i>] |
| 7 | 30.3 | 5.7 | 112 | DVVFHLFTR, VIASFIDLLDSR | gi 357628137 | lipase inativa [<i>D. plexippus</i>] |
| 11 | 29.3 | 9.3 | 294 | QSVCGASLISNSR, YADNSGVSTSLR, HVNQLQVITNDVCR, VTSFNSWIR | gi 357610912 | precursor de protease serínica [<i>D. plexippus</i>] |
| 12 | 29.3 | 9.3 | 57 | YADNSGVSTSLR | gi 357610912 | precursor de protease serínica [<i>D. plexippus</i>] |
| 13 | 29.3 | 9.3 | 147 | QSVCGASLISNSR, YADNSGVSTSLR | gi 357610912 | precursor de protease serínica [<i>D. plexippus</i>] |
| 14 | 29.3 | 9.3 | 147 | YADNSGVSTSLR, TYGSTIIASNICVATPNGR | gi 357610912 | precursor de protease serínica [<i>D. plexippus</i>] |

*Refere-se ao número da banda proteica da eletroforese localizada na Figura 27. A identificação das proteínas foi realizada através pesquisa em banco de dados (NCBI) utilizando o programa do Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK, <http://www.matrixscience.com>).

5.8 Efeito de proteínas de látex sobre a MP de *D. plexippus*

O efeito das frações PLs sobre a degradação das proteínas da MP foi avaliado *in vivo*. Para tanto, as frações PL foram adicionadas a dieta artificial ofertada às larvas (5º estágio) durante três dias, após este período as MPs foram extraídas e suas proteínas foram analisadas por eletroforese. As proteases das frações PL, de modo geral, não degradaram as proteínas da MP, incluindo a proteína mais abundante, a IIM (97 KDa) (Figura 28). Fato que concorda com o bom desenvolvimento das larvas alimentadas com dieta artificial contendo as frações PL (Figura 17). Discretas alterações foram constatadas nas bandas proteicas apontadas pelas setas, denotando sua possível digestão parcial por PLCp, PLCg e PLPr.

Figura 28 – Análise *in vivo* da degradação de proteínas da MP de *D. plexippus* pelas frações PLs

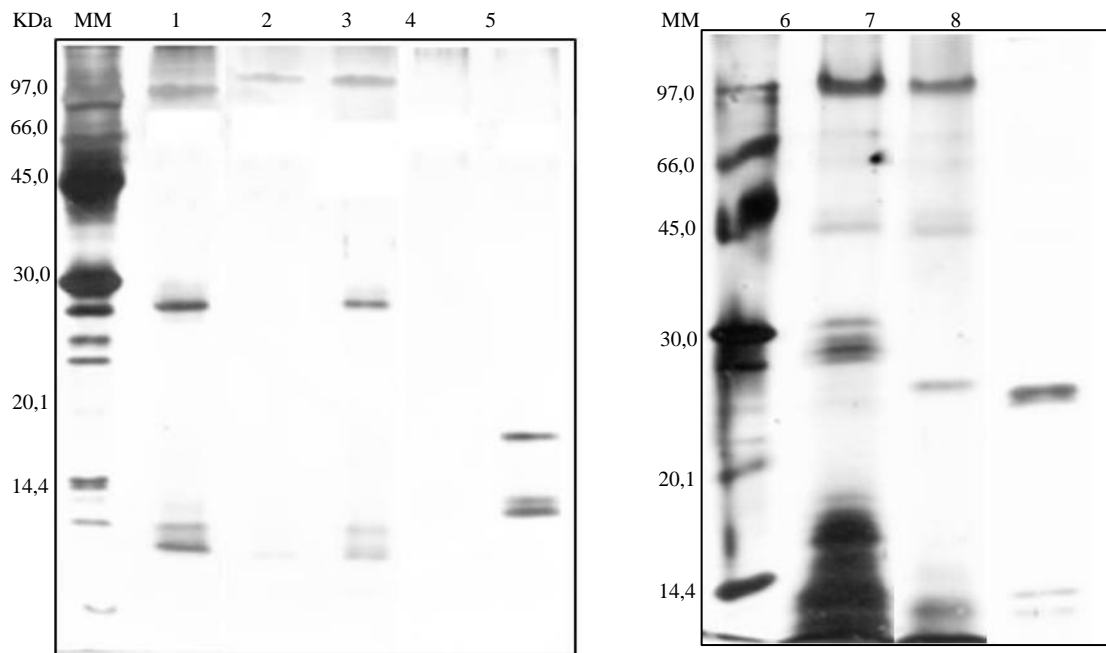


Legenda: MP de larvas alimentadas com dieta artificial controle (1) e contendo PLCp 1% (2), PLCg 1% (3) ou PLPr 1% (4).

Inicialmente foi avaliado se proteases purificadas do tipo cisteínica (papaína) e serínica (tripsina e quimotripsina) são capazes de degradar as proteínas da MP (*in vitro*), nas condições adequadas para cada enzima. Dentre as proteases serínicas, a quimotripsina, de maneira geral, não degradou as proteínas da MP, enquanto que a

tripsina apresentou extensiva degradação (Figura 28). Semelhantemente, a papaína degradou as proteínas da MP, no entanto, a IIM (97 KDa) foi apenas parcialmente digerida (Figura 28).

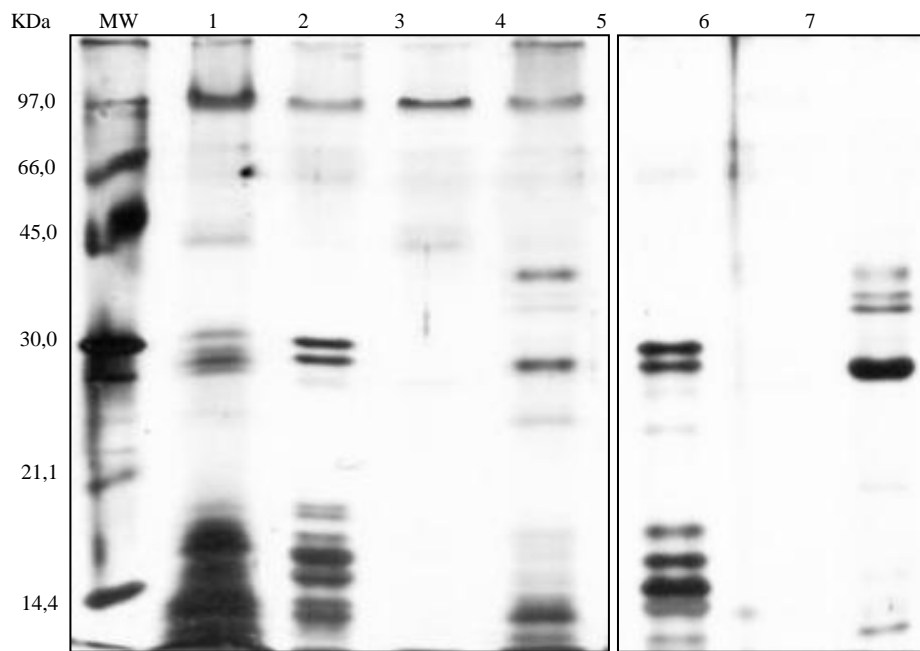
Figura 28 - Análise da degradação de proteínas da MP por proteases serínicas e cisteínicas.



Legenda: 1 - MP incubada com tampão tris-HCl pH 8,0 (controle); 2 – MP + tripsina (1,5 mg/mL); 3 – MP + quimotripsina (1,5 mg/mL); 6 – MP incubada com tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle); 7 - MP + papaína (0,1 mg/mL). Soluções de Tripsina, Quimotripsina e papaína foram isoladamente analisadas por eletroforese, correspondendo a 4, 5 e 8, respectivamente.

A suscetibilidade das proteínas da MP à degradação por proteases de fluidos laticíferos foi avaliada *in vitro*. A IIM (97 KDa) foi parcialmente digerida pelas proteases presentes nas frações PL, enquanto que outras proteínas da MP foram de modo geral degradadas (Figura 29).

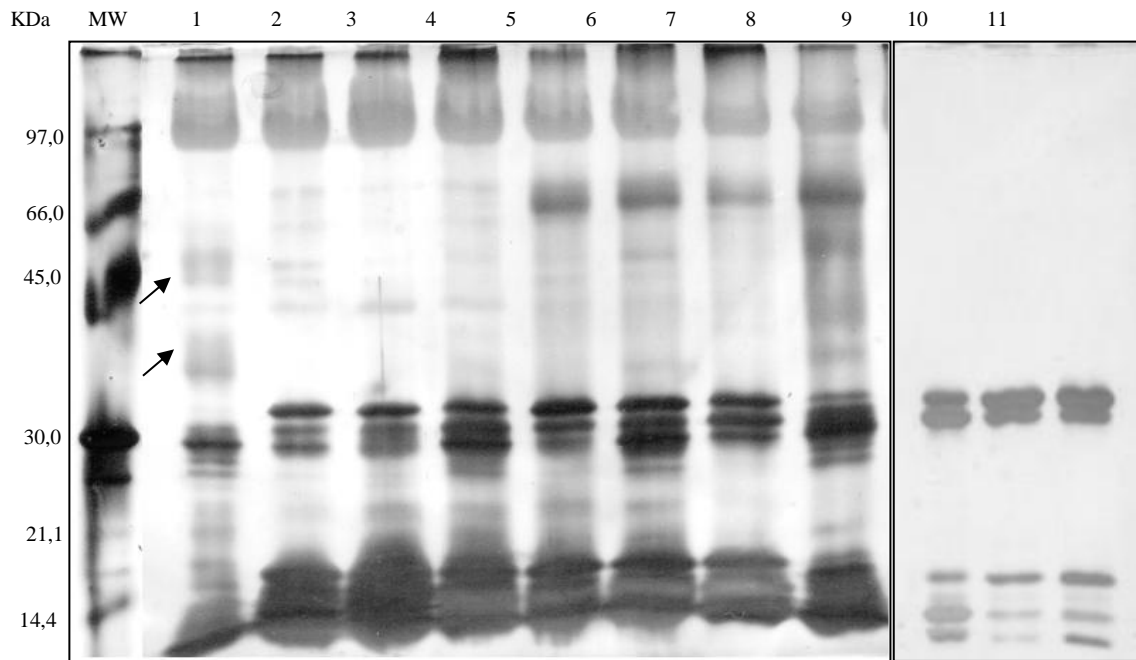
Figura 29 – Análise da degradação das proteínas da MP de *D. plexippus* pelas frações PLs



Legenda: 1 - MP incubada com tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle); 2 - MP + PLCp (1 mg/mL); 3 - MP + PLCg (1 mg/mL); 4 - MP PLPr (1 mg/mL). Soluções de PLCp, PLCg e PLPr foram isoladamente analisadas por eletroforese correspondendo a 5, 6 e 7, respectivamente.

As proteases purificadas de *C. procerca* (PCCp1, 2 e 3) degradaram algumas proteínas da MP (apontadas pela seta na Figura 30). Enquanto que a IIM (97 KDa) e as bandas com massa molecular aparente próximo de 30 KDa não foram degradadas. No entanto, quando a MP foi pré-incubada com PL-PI (fração cromatográfica de *C. procerca* rica em atividade quitinolítica), houve uma discreta degradação IIM pelas PCCps (figura 30; linhas 5, 6 e 7), sugerindo que há um sinergismo entre quitinases e proteases. Um controle foi feito incubando a MP apenas com PL-PI (Figura 30; linha 8), no qual verifica-se a não degradação das proteínas da MP, tendo em vista que PL-PI não apresenta atividade proteolítica.

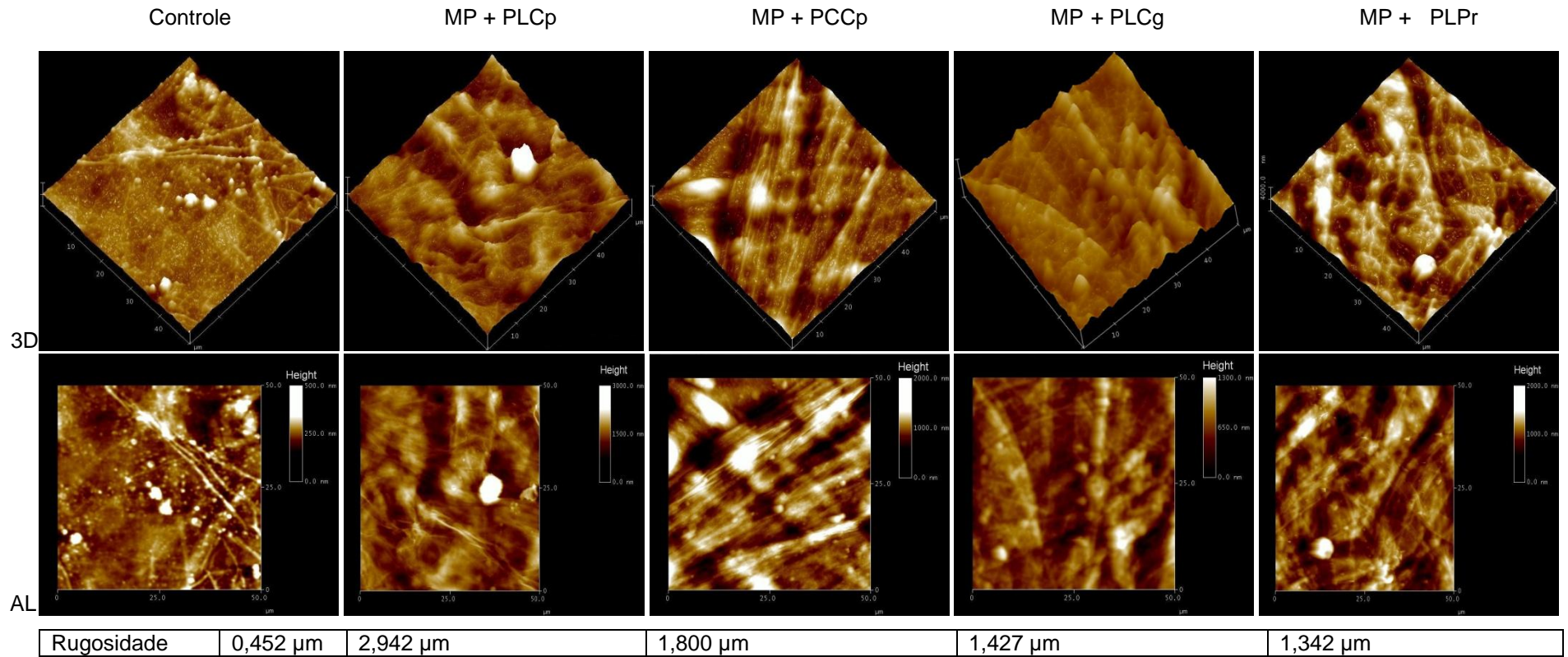
Figura 30 - Análise da degradação das proteínas da MP de *D. plexippus* por PCCp1, 2 e 3.



Legenda: 1 - MP incubada com tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo DTT (3 mM) e EDTA (2 mM) (controle); 2 - MP + PCCp1 (1 mg/mL); 3 - MP + PCCp2 (1 mg/mL); 4 - MP + PCCp3 (1 mg/mL); 5 - MP + PL-PI (1 mg/mL) + PCCp1 (1 mg/mL); 6 - MP + PL-PI (1 mg/mL) + PCCp2 (1 mg/mL); 7 - MP + PL-PI (1 mg/mL) + PCCp3 (1 mg/mL) e 8 - MP + PL-PI (1 mg/mL). Soluções de PCCp1, 2 e 3 foram isoladamente analisadas por eletroforese, correspondendo a 9, 10 e 11, respectivamente.

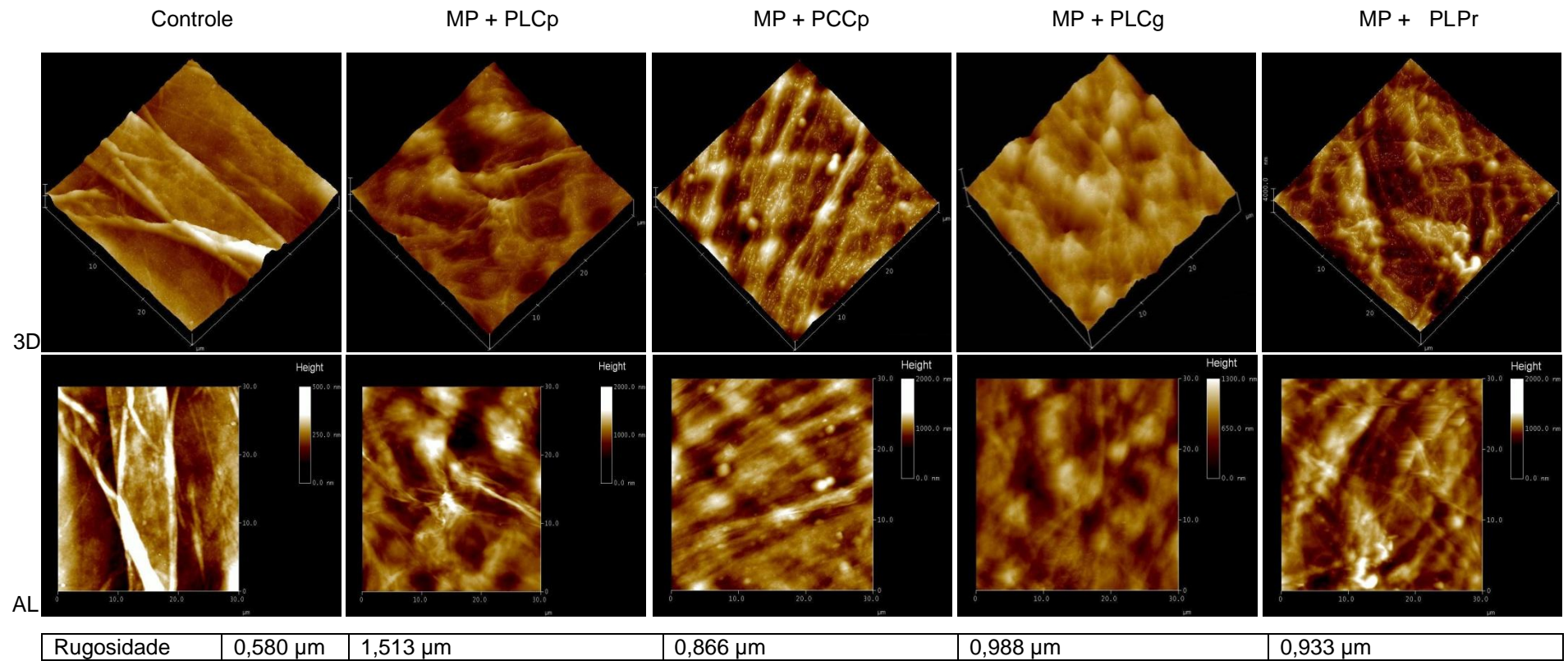
Os efeitos dos PLs e da mistura das PCCps (PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3) sobre a MP foram analisados através de microscopia de força atômica. As imagens foram geradas em diferentes escalas: 50 μm (Figura 31), 30 μm (Figura 32), 20 μm (Figura 33) e 10 μm (Figura 34). As imagens tridimensionais (3D) das MPs tratadas com PLCp, PCCps, PLCg e PLPr apresentam áreas escuras que possivelmente são os danos causados à membrana pelas enzimas do látex. As representações da altura do relevo das imagens também ressaltam as depressões (áreas pretas denotam 0 μm de altura) formadas nas MPs tratadas com as amostras. As medidas de rugosidades das MPs tratadas com PLs e PCCps são elevadas quando comparadas a MP controle. Por exemplo, nas imagens com escala de 50 μm observa-se que a rugosidade da MP controle é 0,582 μm , valor bem menor do que o valor da rugosidade das MPs tratadas com PLCp (2,945 μm), PCCps (1,800 μm), PLCg (1,427 μm) e PLPr (1,342 μm).

Figura 31 – Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de MPs de *D. plexippus* (5º estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 50 µm).



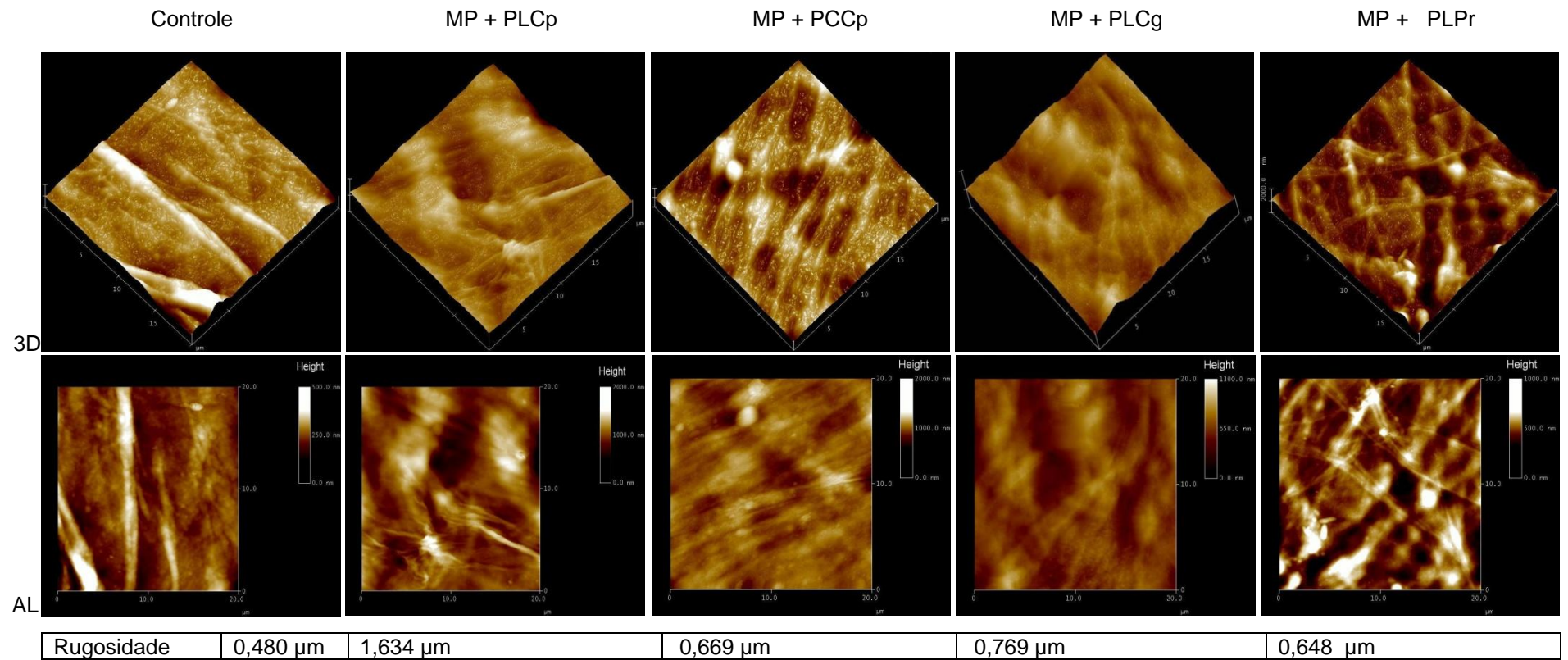
Legenda: 3D – imagens tridimensionais; AL – representação da altura da imagem.

Figura 32 – Imagens de AFM de MP de *D. plexippus* (5º estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 30 µm).



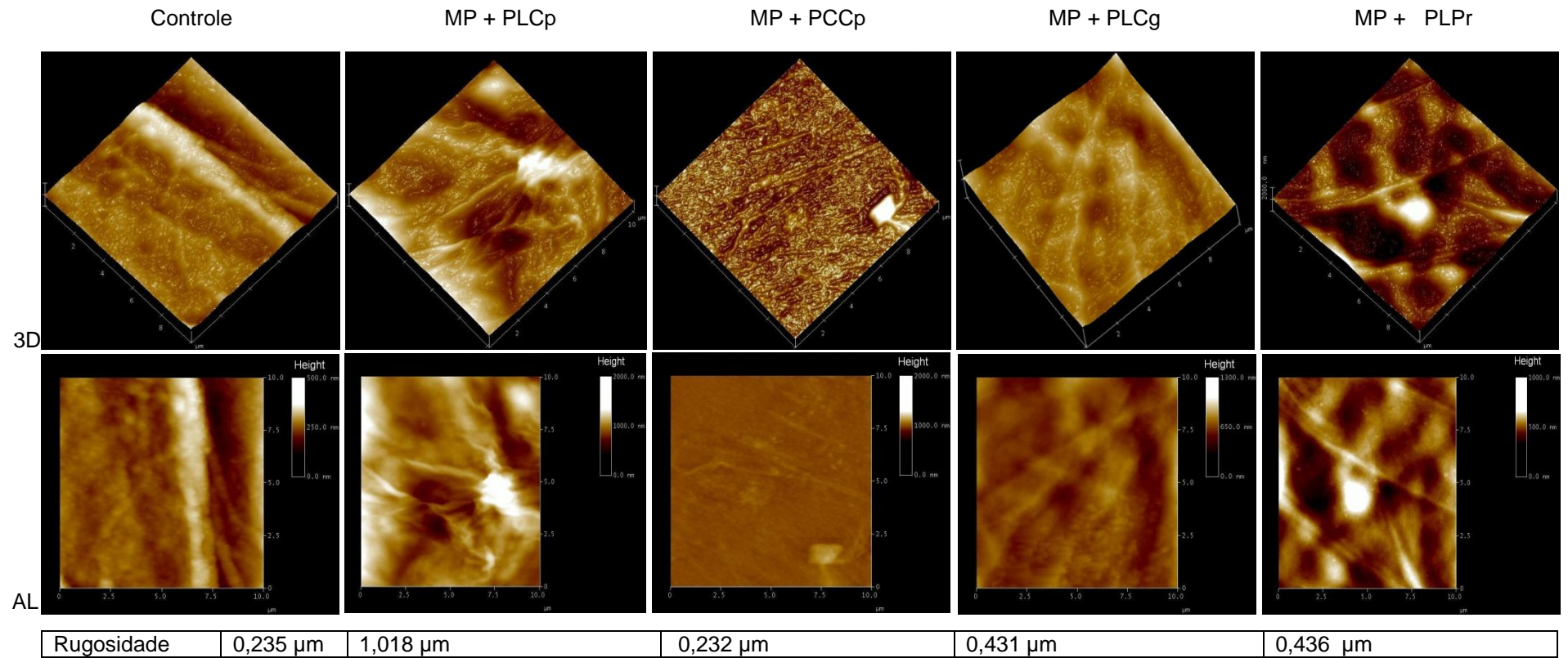
Legenda: 3D – imagens tridimensionais; AL – representação da altura da imagem.

Figura 33 – Imagens de AFM de MP de *D. plexippus* (5º estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 20 µm).



Legenda: 3D – imagens tridimensionais; AL – representação da altura da imagem.

Figura 34 – Imagens de AFM de MP de *D. plexippus* (5º estágio larval) tratadas com PLs e PCCps (escala 10 µm).



Legenda: 3D – imagens tridimensionais; AL – representação da altura da imagem.

6 DISCUSSÃO

O látex vegetal é produzido e estocado em sistemas de canais formados por células altamente especializadas, os laticíferos (LEWINSOHN; VASCONCELLOS-NETO, 2000). Uma característica marcante destes fluidos é a presença de sistemas proteolíticos complexos (AGRAWAL; KONNO, 2009). Muitos estudos relatam que proteínas de defesa contra insetos e fungos são encontradas em látex (KONNO, 2011). No entanto, alguns insetos sobrepõem esta defesa e alimentam-se de plantas laticíferas (KONNO, 2011). As bases bioquímicas da resistência de insetos às proteínas defensivas do látex ainda não são amplamente elucidadas.

Na relação entre plantas laticíferas e insetos, o confronto entre proteases de ambos é crucial para determinar resistência ou suscetibilidade. Neste contexto, é essencial estudar o sistema proteolítico de látex e do trato digestório de insetos que se alimentam de plantas laticíferas. No presente trabalho ambos os sistemas proteolíticos foram estudados na tentativa de elucidar aspectos importantes da sobreposição da defesa vegetal por lagartas especialistas em plantas laticíferas.

A caracterização da atividade proteolítica do extrato intestinal de *P. tetrio* revelou similaridades com outras espécies de larvas da ordem Lepidoptera. Em pHs abaixo de 7,0 a atividade proteolítica do extrato intestinal é praticamente nula e o pH ótimo desta atividade é alcalino. As proteases do extrato intestinal degradaram substratos específicos de proteases serínicas (BANA e BApNA) e foram inibidas por PMSF, evidenciando que são predominantemente proteases do tipo serínica. Estas características são comumente verificadas em larvas da ordem Lepidoptera (CHRISTELLE *et al.*, 1992; CHOUGULEA *et al.*, 2008), inclusive em outra larva especialista em plantas laticíferas, *D. plexippus* (PEREIRA *et al.*, 2010). No entanto, diferentemente de *P. tetrio*, a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. plexippus* foi inibida por E-64, fato que denota uma diferença na composição da mistura de proteases intestinais entre ambas as espécies especialistas em plantas laticíferas (PEREIRA *et al.*, 2010).

A atividade proteolítica foi fortemente dependente da temperatura, sendo que o máximo de atividade foi detectado na temperatura de 37 °C. Quando o extrato

intestinal foi aquecido a 60 °C por 15 minutos perdeu completamente a atividade proteolítica. Estes resultados foram similares aos reportados para outras espécies de Lepidoptera, como *D. plexippus* e *Anticarsia gemmatalis* (PEREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Em ensaios *in vitro*, as enzimas digestivas de *P. tetrio* foram hábeis em digerir a fração proteica do látex de sua planta hospedeira (*P. rubra* - PLPr) e de *C. procera* (PLCp) em poucos instantes, além de digerir parcialmente as proteínas do látex de *Cr. grandiflora* (PLCg). Do mesmo modo, *D. plexippus* foi capaz de digerir rapidamente a fração proteica do látex de sua planta hospedeira (*C. procera*) e de plantas não hospedeiras (*P. rubra* e *Cr. grandiflora*) (PEREIRA *et al.*, 2010). A habilidade de digerir prontamente as proteínas do látex pode explicar, pelo menos em parte, como estes insetos sobrepõem à ação defensiva que as proteínas do látex desempenham na planta.

Os resultados de digestibilidade realizados *in vitro* levam a questionar se ambas as larvas estudadas desenvolvem-se adequadamente em dietas contendo as frações PL. Devido a não adaptação de *P. tetrio* às condições de laboratório, este questionamento foi respondido apenas para larvas de *D. plexippus*. As quais se desenvolveram plenamente em dieta artificial contendo 1% de PLCg ou PLPr. De acordo com estudos anteriores, esta larva também se desenvolve adequadamente em dieta artificial contendo até 5% de PLCp (PEREIRA *et al.*, 2010). Além disso, constatou-se que quanto maior a quantidade de PLCp adicionada à dieta, melhor é o desenvolvimento das larvas. Estes resultados evidenciam a habilidade desta larva especialista em sobrepôr a toxicidade das proteínas do látex, além do aproveitamento das proteínas laticíferas no seu desenvolvimento.

Por outro lado, a fração PL de *C. procera* é deletéria às larvas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pirrocoridae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) em doses de 1% e 0,1%, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2007, 2010). A fração PL de *C. procera* não foi digerida pelo extrato intestinal destes insetos em ensaios *in vitro*, mesmo após 24 horas de incubação. Pelo contrário, PL foi altamente eficiente em digerir as proteínas do extrato intestinal destes insetos em poucos minutos. Portanto, a ação inseticida de PLCp pode ser resultado de uma eficiente degradação das proteínas intestinais destes insetos pelas proteases

presentes neste fluido laticífero, as quais são predominantemente do tipo cisteínica (FREITAS *et al.*, 2007).

Assim, a análise dos resultados obtidos nos ensaios de digestão de proteínas laticíferas por insetos suscetíveis, *D. peruvianus* e *C. maculatus*, e resistentes à toxicidade do látex, *P. tetrio* e *D. plexippus*, evidencia que a habilidade das proteases intestinais em prontamente digerir as proteínas do látex determina a regra de resistência das larvas especialistas.

Estudos anteriores avaliaram o efeito de PLCp sobre duas larvas da ordem Lepidoptera que são generalistas e não predadoras de plantas laticíferas, *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, ambas da família Noctuidae. A fração PLCp (0,1%) é deletéria às larvas de *A. gemmatalis*, mas não às larvas de *S. frugiperda* (RAMOS *et al.*, 2007). Portanto, larvas (Lepidoptera) não especialistas em plantas laticíferas podem também ser resistentes às proteínas de defesa do látex. No entanto, esta resistência parece não ser inerente a todas as larvas generalistas.

No contexto do estudo de resistência de lagartas às proteínas do látex, é essencial avaliar aspectos dos sistemas proteolíticos de ambas as partes. Desta forma, algumas etapas deste trabalho incluem a utilização de proteases isoladas do látex de *C. procera*. As três proteases utilizadas foram isoladas de acordo com protocolo previamente estabelecido por Ramos e colaboradores (2013). Ainda neste trabalho algumas características destas proteases foram determinadas. A análise por espectrometria de massas determinou que as massas moleculares das três proteases são muito próximas (PCCp-1 = 26,213, PCCp-2 = 26,133 e PCCp-3 = 25,086 Da), evidenciando que são isoformas. Em adição, as sequências da região N-terminal são idênticas, confirmando o que havia sido evidenciado. A comparação de algumas características das PCCps com outras proteases anteriormente isoladas do látex de *C. procera* evidenciou que de fato são proteases distintas. As PCCps possuem massa molecular, sequência N-terminal, pH e temperatura ótimas diferentes de proceraína e proceraína B (RAMOS *et al.*, 2010; DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SING *et al.*, 2011).

No presente trabalho foram determinadas algumas características das PCCps que ainda não haviam sido analisadas. Os pontos isoelétricos das PCCps variaram

entre 7,5 e 8,9. Estes pontos isoelétricos são semelhantes aos obtidos por outras proteases cisteínicas de látex, como a Ervatamina A (pI = 8,4) e Araujaina hII (pI = 8,9) (NALLAMSETTY *et al.*, 2002; OBREGÓN *et al.*, 2001). Entretanto, diferem acentuadamente do ponto isoelétrico de uma variedade de proteases laticíferas, como Asclepaína cII (pI >9,3) (LIGGIERI *et al.*, 2009), Araujaina hI. (pI = 9,3) (OBREGÓN *et al.*, 2001), Araujaina hIII (pI = 10,5) (OBREGÓN *et al.*, 2001), Asclepaína f (pI = 9,3) (TREJO *et al.*, 2001), funastraína cII (pI = 9,3) (MORCELLE *et al.*, 2004) e Morrenaína bI, bII, oI e OII (todas com pI = 9,3) (VAIRO *et al.*, 2001 e 2003). Os pontos isoelétrico das PCCps também diferem da proceraina (pI = 9,3) e proceraina b (pI = 9,52), reforçando que as PCCps são proteases distintas das proteases anteriormente isoladas do látex de *C. procera* (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SINGH *et al.*, 2011).

A presença de carboidratos na estrutura das PCCps ainda não havia sido avaliada e foi determinada no presente trabalho. Através da revelação das PCCps com solução de Schiff, estas proteases foram caracterizadas como glicoproteínas. Esta característica também é encontrada em outras proteases cisteínicas e também em proteases da classe serínica (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; RAJESH *et al.*, 2006). A vantagem biológica da presença de tais porções de carboidratos em proteases não é completamente entendida. Em uma protease serínica isolada do látex de *Euphorbia milii*, a porção de carboidrato parece ser importante para atividade desta protease, tendo em vista que a sua deglicosilação acarretou em falta de atividade proteolítica (Subhash *et al.*, 2006). Carboidratos em glicoproteínas apresentam conhecidas funções como estabilização das proteínas, proteção da degradação, controle da solubilidade e transporte no interior das células.

Um questionamento importante é induzido quando se analisa o confronto entre os sistemas proteolíticos de látex e intestino de larvas especialistas: uma possível inibição de proteases proveniente de ambos os sistemas biológicos poderia ter alguma influência neste confronto? Esta questão foi investigada no presente trabalho. Para tanto, a fração PL de três espécies vegetais (*C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*) e os extratos intestinais de duas larvas especialistas (*P. tetrio* e *D. plexippus*) foram aquecidos com o intuito de eliminar as atividades proteolíticas endógenas e então avaliar a atividade inibidora de proteases.

A presença de inibidores de proteases proveniente das frações PLs aquecidas (PL-AQs) foi inicialmente avaliada contra proteases purificadas (papaína e tripsina), introduzidas como controle. Em seguida, foi avaliado se as frações PL-AQ inibem a atividade proteolítica dos homogenatos intestinais não aquecidos (*P. tetrico* e *D. plexippus*). Os ensaios de inibição foram realizados utilizando-se os substratos azocaseína e BApNA. Quando azocaseína foi utilizada como substrato, as frações PL-AQ praticamente não apresentaram inibição, ao contrário do ocorrido com o substrato sintético BApNA. De maneira geral, a hidrólise sobre a azocaseína foi frequentemente mais acentuada. A estrutura da azocaseína é mais semelhante à estrutura do substrato natural das proteases, quando comparada ao substrato sintético. Isto pode explicar sua acentuada hidrólise e a falta de inibição das frações PL-AQ. Além disso, como a azocaseína é um substrato inespecífico e os sistemas proteolíticos dos homogenatos intestinais são complexos, a inibição de uma protease pode ser mascarada pela atividade de outras proteases presentes no intestino.

As frações proteicas de *C. procera* (PLCp-AQ) e *Cr. grandiflora* (PLCg-AQ) reduziram atividade da papaína sobre o BApNA para 45 e 13%, respectivamente. A inibição da papaína por PLCp-AQ foi meramente confirmada, desde que já havia sido reportada (RAMOS *et al.*, 2010). Enquanto que a constatação da presença de inibidor de protease cisteínica no látex de *Cr. grandiflora* constitui um interessante dado ainda não relatado nesta espécie. Inibidores de proteases cisteínicas são comumente relatados em fluidos laticíferos (MOUSSAOUI *et al.*, 2001; BANGRAK; CHOTIGEAT, 2010).

É conhecido que em fluidos laticíferos os inibidores de proteases cisteínicas possuem a função de controle endógeno de proteases, como os inibidores da papaína isolados do látex de *Carica papaya* (MONTI *et al.*, 2000; 2004). Entretanto, esta função endógena dos inibidores de fluidos laticíferos está fora do escopo do presente estudo. Além desta função, estes inibidores provenientes de látex também estão relacionados à atividade inseticida, como observado na atividade inseticida de PLCp contra larvas de *C. maculatus*, as quais apresentam proteases intestinais predominantemente cisteínicas (RAMOS *et al.*, 2010).

A atividade da tripsina foi pouco reduzida por PLCp-AQ e PLCg-AQ, resultando em 63 e 81% de atividade remanescente, respectivamente. A tripsina não foi inibida por PLPr-AQ. Apesar disso, inibidores de tripsina foram detectados em outros fluidos laticíferos, como o de *C. papaya* e *Hevea brasiliensis* (AZARCAN *et al.*, 2004; SRITANYARAT *et al.*, 2006). Inclusive, há evidências do envolvimento destes inibidores de tripsina na defesa vegetal, como o aumento nos níveis de inibidores quando a planta é danificada várias vezes para retirada de látex (SRITANYARAT *et al.*, 2006; AZARKAN *et al.*, 2004). Tais informações indicam que inibidores de proteases serínicas de fluidos laticíferos podem agir como moléculas de defesa vegetal.

Apesar das frações PL-AQs apresentarem reduzida inibição de uma protease serínica (tripsina), estas frações inibiram extensivamente as proteases serínicas do intestino de *P. tetricus* e *D. plexippus*. Estes resultados sugerem que as plantas hospedeiras possuem estratégias de combate aos predadores e conduzem a uma pergunta: porque estes inibidores são incapazes de defender as plantas dos ataques das lagartas? Uma possível resposta poderia ser a baixa concentração destes inibidores no látex nas condições naturais. No entanto, larvas de *D. plexippus* se desenvolveram plenamente quando alimentadas com dieta artificial contendo 1% das frações PL-AQs, as quais supostamente apresentam uma concentração de inibidor bem maior daquela naturalmente apresentada pelos fluidos laticíferos. Neste contexto, um aspecto que deve ser considerado é a adaptação das larvas aos inibidores, a qual ocorre através do aumento da produção de proteases intestinais não suscetíveis a inibição. Trabalhos relatam o fato de inibidores de proteases vegetais inibirem as proteases de insetos em ensaios *in vitro* e *in vivo* não apresentam efeito algum no desenvolvimento do mesmo (BRIOSCHI *et al.*, 2007; PAULILLO *et al.*, 2000). Portanto, a resistência das larvas de *D. plexippus* aos inibidores das frações PL-AQs observada no bioensaio, pode ser resultado do aumento de expressão de proteases não suscetíveis à inibição.

Ainda sobre esta questão, é importante ressaltar o fato de que os experimentos *in vitro* não reproduzem adequadamente as condições *in vivo*. O meio biológico inclui outros parâmetros químicos/bioquímicos que não foram reproduzidos no presente estudo. Portanto, uma visão geral destes resultados deve ser vista com reserva. Considerando todos os aspectos discutidos para esta questão, é concluído

que embora inibidores de proteases ocorram no látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra*, eles não previnem o ataque de lagartas às folhas.

A atividade inibidora de protease também foi detectada nos extratos intestinais aquecidos de *D. plexippus* (EIDp-AQ) e *P. tetro* (EIPt-AQ). Os extratos intestinais aquecidos (EI-AQ) inibiram quase que completamente a atividade da tripsina principalmente quando BANA foi utilizado como substrato. Estudos prévios demonstraram a existência de inibidores de proteases serínicas em diferentes localizações nos insetos, como hemolinfa, gônadas e intestino (SCHOOFS; SALZET, 2002; ENGELMAN; GERAERTS, 1980). Estudos sobre estes inibidores de proteases revelaram que provavelmente estejam envolvidos em processos fisiológicos em que cascatas proteolíticas necessitem ser reguladas (SCHOOFS; SALZET, 2002; GUBB *et al.*, 2010). Por outro lado, há evidências de que inibidores de proteases de insetos podem estar relacionados com a defesa do animal. Este é o caso dos inibidores de proteases de *Bombyx mori*, os quais inibem as enzimas de fungos (EGUCH, 1993).

Os EI-AQs também inibiram acentuadamente a atividade da papaína, independente do substrato utilizado. Em experimentos semelhantes aos realizados aqui, Li e colaboradores (2009) também evidenciaram atividade inibidora de papaína no fluido digestivo aquecido de *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*. No entanto, este trabalho discute a natureza desta atividade de inibição. A atividade de protease do tipo cisteínica requer o grupo tiol do resíduo de cisteína do centro catalítico, portanto, a oxidação deste grupo resulta em diminuição da atividade. Assim pode ser que a inibição da papaína seja resultante da oxidação do grupo tiol no sítio catalítico por oxidantes reativos provenientes do intestino das larvas. De fato, o intestino de algumas larvas possuem condições altamente oxidantes, como é o caso das condições intestinais de larvas de *D. plexippus* (APPEL; MARTIN, 1990). Sobre *P. tetro* não há registros na literatura quanto a este aspecto. Tentativas de identificar o inibidor nos fluidos digestivos através de espectrometria de massas e pesquisa em banco de dados falharam (dados não mostrados). Portanto, conclui-se que os intestinos de *D. plexippus* e *P. tetro* possuem atividade inibidora de proteases cisteínicas, no entanto, a natureza desta atividade necessita ser esclarecida.

De modo geral, os EI-AQs inibiram as atividades proteolíticas das frações PL, no entanto o extrato intestinal de *D. plexippus* (EIDp-AQ) apresentou menor inibição. Interessantemente, o extrato intestinal de *P. tetrio* (EIPt-AQ) não inibiu a atividade proteolítica de sua planta hospedeira (*P. rubra*). Entretanto EIDp-AQ, inibiu fracamente (35%) a atividade proteolítica de sua planta hospedeira (*C. procera*) quando azocaseína foi utilizada como substrato. Apesar disso, nestas mesmas condições, este extrato intestinal reduziu a 50% a atividade proteolítica de proteases cisteínicas isoladas do látex de *C. procera* (PCCps). Este resultado confirma que o EIDp-AQ inibe as proteases de sua planta hospedeira. Portanto conclui-se que apesar de os EI-AQs inibirem a atividade proteolítica dos fluidos laticíferos, esta inibição influencia na relação com a planta hospedeira apenas de *D. plexippus*.

Quando a fração PLCp e a mistura das proteases de *C. procera* (PCCps) foram incubadas com os extratos intestinais aquecidos (EI-AQs), apresentam um exacerbado aumento na atividade proteolítica sobre o BANA. Estes experimentos foram repetidos três vezes e todas apresentaram o mesmo resultado. Apesar de ser difícil explicar este fato, fica claro que não há inibição nesta situação.

Trichoplusia ni (Lepidoptera) na fase larval pode se alimentar de pelo menos 160 plantas de uma variedade de 36 famílias diferentes, algumas das quais são plantas laticíferas. O fluido digestivo desta lagarta aquecido inibe as proteases do látex de *Asclepias syriaca* (LI *et al.*, 2009). Evidenciando que esta estratégia de sobreposição do efeito de proteases laticíferas pode ser também utilizada por larvas generalistas que se alimentam de plantas laticíferas. Inclusive, foi evidenciado que o fluido digestivo aquecido desta larva protege a sua membrana peritrófica da ação das proteases cisteínicas do látex de *A. syriaca*, sendo, portanto, crucial para sobrevivência da larva quando esta se alimenta da planta laticífera (LI *et al.*, 2009).

A membrana peritrófica (MP) é uma estrutura que envolve internamente o trato digestório de insetos. Esta estrutura é composta basicamente de quitina e proteínas (TERRA, 2001). A MP possui importantes funções, como proteção contra abrasão mecânica, organização espacial das enzimas digestivas, proteção contra a ingestão de toxinas e estabelecimento de uma barreira física que impede a penetração de patógenos (HEGEDUS *et al.*, 2009). Por conta destas importantes funções, a degradação ou inibição da formação desta estrutura resulta em morte ou

inibição do crescimento de insetos (ZHU *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 2004). Esta estrutura é alvo de proteases cisteínicas com ação inseticida.

As proteínas da MP podem ser classificadas em 4 classes considerando-se o modo como são extraídas: as proteínas de classe 1 são facilmente removidas da MP por tampões fisiológicos ou com alta força iônica, as de classe 2 são aquelas extraídas por detergentes, a classe 3 refere-se às proteínas extraídas por desnaturantes fortes, como 6 M ureia, 6 M de guanidina-HCl e SDS, a quarta classe é composta por proteínas que não são extraídas por desnaturantes fortes, presumidamente, estão covalentemente ligadas umas as outras ou a outros componentes, como quitina ou proteoglicanos (TELLAN *et al.*, 1999).

No presente trabalho foi realizada uma análise das proteínas da MP de *D. plexippus*. Para tanto algumas soluções de extração foram avaliadas (Figura 25). O tampão fisiológico (PBS) praticamente não extraiu proteínas da MP, indicando que as proteínas de classe 1 são minoria na MP de *D. plexippus*. Este resultado também foi observado em larvas de *Lucilia cuprina* (TELLAN *et al.*, 1999). Grande parte das proteínas de MP são consideradas da terceira classe, devido a isto duas soluções de extração de proteínas desta classe foram utilizadas, SDS e ureia. A ureia não foi eficiente em extrair proteínas da MP de *D. plexippus*, no entanto, SDS conseguiu extrair duas bandas proteicas com massa moleculares de aproximadamente 97 KDa e 30 KDa. Neste ponto da análise suspeitava-se que esta banda de 97 KDa seria uma mucina intestinal de inseto, a qual é abundante e importante na resistência da MP à degradação por proteases (ZHANG; GUO, 2011). A suspeita foi posteriormente comprovada na análise proteômica da MP. Uma solução de SDS e β -mercaptoetanol extraiu ainda melhor esta banda proteica, além de uma variedade de proteínas com massas moleculares aparentes entre 66 e 30 KDa. Partindo disso, a solução adotada para a extração de proteínas da MP foi a que continha SDS e β -mercaptoetanol, tendo em vista uma eficiente extração de proteína, utilizando assim o menor número de larvas possível.

A análise da presença de glicoproteínas na MP de *D. plexippus* revelou que a banda de 97 KDa é uma glicoproteína (Figura 26). Este resultado está de acordo com a identificação desta proteína como uma mucina intestinal de inseto (IIM) (Figura 27 e Tabela 2), tendo em vista que estas proteínas são glicosiladas (TELLAN

et al., 1999). Esta proteína foi a mais abundantemente extraída da MP de *D. plexippus*, similarmente ao ocorrido com *Trichoplusia ni* (LI *et al.*, 2009). O alto grau de glicosilação confere a esta proteína a capacidade de lubrificar a passagem do bolo alimentar no intestino, além de proteção contra digestão por proteases endógenas e exógenas (WANG; GRANADOS, 2001).

A análise proteômica da MP de *D. plexippus* identificou 7 proteínas, bem menor do que o número de proteínas identificadas na MP de *Bombyx mori*, da qual foram identificadas 47 proteínas (HU *et al.*, 2012). Além da IIM, foram identificadas também actina, lipase inativa e precursor de protease serínica. Estas enzimas também foram identificadas na MP de *Helicoverpa armigera* (CAMPBELL *et al.*, 2008). Enzimas digestivas agem no lúmen do intestino e podem atravessar a MP, portanto, sua detecção aqui pode simplesmente refletir este fato, mas também há a proposta de que as MPs agem como suporte para imobilizar enzimas digestivas (CAMPBELL *et al.*, 2008).

O efeito das proteínas do látex (PL) de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* sobre a MP de *D. plexippus* foi avaliado. Esta avaliação ocorreu através da análise por eletroforese das proteínas da MP de larvas alimentadas com dieta artificial controle e contendo as frações PLs. Neste ensaio *in vivo* observou-se a integridade da IIM, a proteína mais abundante da MP de *D. plexippus* (Figura 28). Este resultado é coerente com o fato de as frações proteicas não terem afetado o desenvolvimento das larvas em bioensaios com dieta artificial (Figura 17). Uma discreta alteração foi observada em outras duas bandas proteicas (Figura 28), denotando parcial digestão de ambas. No entanto, este fato não afetou o desenvolvimento das larvas (Figura 17). A suposição de que a integridade da MP não é afetada pelas enzimas dos látex em ensaios *in vivo* é suportada pelo pleno desenvolvimento das larvas alimentadas com as frações PL (Figura 17).

Estes experimentos ressaltam que a MP de *D. plexippus* é resistente à degradação por enzimas do látex de sua planta hospedeira e também de plantas não hospedeiras. Fato que denota a plena adaptação desta larva às defesas do látex.

Em adição, a degradação das proteínas da MP foi avaliada também *in vitro*. Inicialmente esta análise foi realizada com proteases purificadas do tipo serínica (tripsina e quimotripsina) e cisteínica (papaína). A análise da degradação por proteases serínicas revelou, interessantemente, que a tripsina degrada as proteínas da MP, enquanto que a quimotripsina não. Estes resultados diferem dos obtidos com *Trichoplusia ni* (Lepidoptera), nos quais ambas as proteases não degradaram as proteínas da MP desta larva (LI *et al.*, 2009). Em adição, proteases serínicas também não alteraram a permeabilidade da MP de *Spodoptera frugiperda*, indicando que não causam danos a esta estrutura (MOHAN *et al.*, 2006). A resistência das proteínas da MP de insetos da ordem Lepidoptera às proteases serínicas é esperada, visto que as proteases intestinais das larvas desta ordem são predominantemente do tipo serínica. Esta resistência é conferida por características próprias das proteínas da MP, como glicosilação, ligação à quitina e a falta de sítios de clivagem para proteases serínicas (tripsina e quimotripsina) em regiões expostas (não ligantes a quitina) (WANG; GRANADOS, 2001; WANG *et al.*, 2004).

Por outro lado, proteases cisteínicas podem agir como moléculas de defesa contra insetos através da degradação de suas MPs. Por exemplo, a protease cisteínica (Mir1-CP) de *Zea mays*, a qual é induzida no local de alimentação de *Spodoptera frugiperda*, aumenta a permeabilidade da MP deste inseto, bem como de *Helicoverpa zea* e *D. plexippus* (MOHAN *et al.*, 2006). Além da Mir1-CP outras proteases cisteínicas também aumentaram a permeabilidade da MP de *S. frugiperda*, como papaína, ficina e bromelaína (MOHAN *et al.*, 2006). Análise da MP de *S. frugiperda* por microscopia eletrônica de varredura comprovou que Mir1-CP danifica a MP desta larva (PECHAN *et al.*, 2002).

O presente trabalho acrescenta alguns dados importantes relacionados à degradação de proteínas da MP por proteases cisteínicas. A papaína degradou as proteínas da MP de *D. plexippus* em ensaios *in vitro*, sendo que a IIM foi apenas parcialmente digerida. Similarmente, as frações proteicas do látex de *C. procera*, *Cr. grandiflora* e *P. rubra* degradaram as proteínas da MP desta larva, sendo que a degradação da IIM ocorreu também apenas de modo parcial (Figura 29). Intrigantemente, *in vivo* nenhum efeito sobre esta proteína foi observado (Figura 28), bem como nenhuma toxicidade causada pelas frações PLs sobre *D. plexippus* (Figura 17). A acentuada hidrólise observada *in vitro* pode ser explicada pela retirada

dos componentes do ambiente intestinal, incluindo proteases e possíveis inibidores de proteases, o que não ocorreu nos ensaios *in vivo*. Assim, a estrutura da MP de *D. plexippus* foi vulnerável a ação de proteases de látex apenas em condições *in vitro*.

Li e colaboradores (2009) relataram uma completa digestão *in vitro* da IIM de *Trichoplusia ni* pelas proteases do látex de *Asclepia siryaca*, entretanto *in vivo* nenhum efeito foi observado. Este trabalho evidencia que a atividade inibidora de protease cisteínica, detectada no fluido digestivo de *Trichoplusia ni*, protege a MP da degradação pelas proteases do látex. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, este raciocínio também pode ser aplicado a *D. plexippus*.

É conhecido que a ligação de proteínas da MP a quitina as protege da degradação por proteases endógenas e exógenas (WANG; GRANADO, 2001). Os fluidos laticíferos são complexas fontes de enzimas, podendo existir concomitantemente proteases e quitinases, como é o caso do látex de *C. procerca* (RAMOS *et al.*, 2007). A partir destas informações, foi analisado se há um sinergismo entre proteases e quitinases na degradação das proteínas da MP de *D. plexippus*. Para tanto, a MP foi primeiramente incubada com as proteases cisteínicas isoladas do látex de *C. procerca* (PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3) e avaliada a degradação das proteínas da MP por eletroforese. Em seguida foi analisado se a pré-incubação da MP com PL-PI, pico cromatográfico de PLCp rico em quitinase, influencia na degradação das proteínas da MP pelas PCCps. As PCCps degradaram algumas proteínas da MP de *D. plexippus*, no entanto a proteína mais abundante (IIM) não foi degradada (Figura 30). Quando a MP foi pré-incubada com PL-PI, é perceptível uma parcial degradação da IIM pelas PCCps (Figura 30). Este resultado sugere que a ligação da IIM à quitina, protege esta proteína contra a degradação pelas proteases do látex.

Mesmo na presença de quitinases, a IIM de *D. plexippus* mostrou sempre certa resistência à proteólise quando comparada às IIMs de outras espécies, como a de *Trichoplusia* que foi totalmente digerida por proteases cisteínicas (por exemplo, papaína, bromelaína e proteases de fluidos laticíferos) ou a IIM de *Helicoverpa armigera* (HalIM86) que foi degradada pela enhacina (LI *et al.*, 2009; ZHANG; GUO, 2011). A análise da sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional da IIM de *D. plexippus* pode revelar características que expliquem tal resistência. Esta análise

seria muito interessante e acrescentaria informações importantes em relação à resistência desta larva às proteases cisteínicas de fluidos laticíferos, a qual é determinante do seu sucesso em se alimentar de plantas laticíferas. Assim, os resultados obtidos nos presente trabalho referentes à resistência da IIM de *D. plexippus* são o ponto de partida para investigação da influência desta resistência na adaptação das larvas às proteases laticíferas.

Por fim, o efeito das proteínas de fluidos laticíferos sobre a MP de *D. plexippus* foi avaliado através da utilização da técnica de microscopia de força atômica. Esta técnica, ainda não utilizada com o proposito de analisar a MP, revelou-se eficiente e de fácil utilização, tendo em vista que as MPs não necessitaram de preparo prévio como em outras técnicas de microscopia. Nas imagens geradas por microscopia de força atômica há a reprodução precisa do relevo da amostra, sendo possível detectar depressões, as quais são bem visualizadas nas imagens que representam a altura do relevo. Além disso, a medida da rugosidade média da imagem proporciona dados quantitativos interessantes para comparar o efeito de diferentes fontes de enzimas sobre a MP.

Esta análise revelou que as frações PL e as PCCps (mistura de PCCp-1, PCCp-2 e PCCp-3) causam alterações na MP de *D. plexippus* em ensaios *in vitro* (Figuras 31 a 34). Tanto nas imagens 3D quanto nas que representam a altura, é possível observar que as MPs tratadas com as frações PL apresentam depressões que podem ser resultado da ação de enzimas dos fluidos laticíferos sobre os componentes da MP. Os fluidos laticíferos de *C. procera*, *C. grandiflora* e *P. rubra*, além de proteases cisteínicas, apresentam também considerável atividade quitinolítica (FREITAS *et al.*, 2010). Assim os danos na MP observados nas imagens de microscopia de força atômica podem ser resultado da ação destes dois tipos de enzimas. A MP tratada com as PCCps (1,800 µm) apresentou menor rugosidade do que as tratadas com PLCp (2,942 µm). Este fato reflete a ação de outras enzimas, como quitinases, sobre a MP.

As análises realizadas no presente trabalho mostram que as enzimas de fluidos laticíferos apresentam efeitos sobre a MP de *D. plexippus*. Ainda que isto tenha sido observado apenas em ensaios *in vitro*, comprova que de fato tais enzimas podem danificar esta estrutura, o que leva a questionar se este efeito sobre

a MP está envolvido na ação inseticida detectada nas frações proteicas de *C. procera*, *C. grandiflora* e *P. rubra*. Desta forma, estes resultados abrem perspectivas de novas pesquisas que dariam continuidade ao estudo da ação inseticida já detectada no látex.

7 CONCLUSÃO

A extraordinária capacidade dos sistemas proteolíticos das larvas especialistas em plantas laticíferas (*D. plexippus* e *P. tetrio*) em prontamente digerir as proteínas do látex é um dos principais fatores que favorece a sobreposição da defesa vegetal. No extrato intestinal de *D. plexippus* e *P. tetrio* há atividade inibidora de proteases cisteínicas e serínicas, no entanto, é provável que esta atividade influencie apenas na interação entre *D. plexippus* e sua planta hospedeira (*C. procera*). Nos fluidos laticíferos de *C. procera*, *P. rubra* e *C. grandiflora* há proteases que degradam proteínas da membrana peritrófica (MP) de *D. plexippus* em ensaios *in vitro*. Entretanto, uma proteína da MP, identificada como mucina intestinal de inseto, é resistente à ação das proteases laticíferas. Outras moléculas dos fluidos laticíferos, provavelmente quitinases, também danificam a MP de *D. plexippus* em ensaios *in vitro*. Apesar da MP ser danificada *in vitro* por enzimas laticíferas, *D. plexippus* sobrepõe *in vivo* o efeito de tais enzimas. Neste contexto, é provável que a atividade inibidora de proteases cisteínicas detectada no intestino de *D. plexippus* proteja sua MP da ação de proteases laticíferas, no entanto, a natureza desta inibição necessita ser identificada. Nos fluidos laticíferos de *C. procera*, *C. grandiflora* e *P. rubra* há inibidores de proteases que inibem (*in vitro*) as proteases intestinais das larvas de *D. plexippus* e *P. tetrio*. Apesar disso, ambas as larvas sobrepõem *in vivo* o efeito dos inibidores de suas plantas hospedeiras e *D. plexippus* sobrepõe também o efeito dos inibidores de plantas não hospedeiras.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **Eur. J. Biochem.**, 209: 933-937, 1992.
- ABRAHAM, K. L.; JOSHI, P. N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* látex: purification and properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochem Biophys Acta**. 568:111-119, 1979.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, 40:311-31, 2009.
- AHMED, K. K. M.; RANA, A. C.; DIXIT, V. K. Calotropis species (Asclepiadaceae): A comprehensive review. **Pharmacognosy Magazine**, 1(2):48-52, 2005.
- ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:637-650, 2005.
- ARAÚJO, E. S. Látex de *Plumeria rubra* L. (jasmim): perfil protéico, caracterização enzimática e ação contra insetos. 2009. 90p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2009.
- ARCHER, B. L.; AUDLEY, B. G.; MCSWEENEY, G. P.; HONG, T. C. J. Studies on composition of latex serum and "bottom fraction" particles. **Journal of Rubber Research of Institute of Malaysia**, 21(4):560-570, 1969.
- ARIMA, K.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. **Phytochemistry**. 53:639-644, 2000.
- AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZEB, Y.; BAEYENS-VOLANTA, D. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. **Phytochemistry**, 65:525-534, 2004.
- BANGRAK, P.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea rubber* latex. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49:244-250, 2011.
- BECKER, B.; PETERS, W.; ZIMMERMANN, U. The fine structure of peritrophic membranes of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, grown in vitro under different conditions. **Journal of Insect Physiology**, 22:337-345, 1976.
- BOLOGNESI, R. Síntese, degradação e funções da membrana peritrofica dos insetos. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BOTHA, J. C. E.; BORMAN, C. H.; CARTER, M.; HEEG, J. Transport studies on *Gomphocarpus physocarpus*: observations on the feeding habit of *Aphis nerii*. **Journal of South African Botany**, 38: 195-203, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, 72:248- 254, 1976.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** , 37:1283–1290, 2007.

BROCKBANK, W. J.; LYNN, K. R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex *Asclépias syriaca* L (milkweed). **Biochem Biophys Acta.**, 566: 13-22, 1979.

BROEKAERT, W.; LEE, H.; KUSH, A.; CHUA, N.; RAIKHEL, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proc. Nati. Acad. Sci.**, 87:7633-7637, 1990.

BROWER, L. P.; MOFFIT, C. M. Palatability dynamics of cardenolides in the monarch butterfly. **Nature**, 249:280-83, 1974.

CAMPBELL, P. M.; CAO, A. T.; HINES, E. R.; EAST, P. D.; GORDON, K. H. J. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** , 38:950–958, 2008.

CAVALLI, S. E. V.; ARRIBERI, M. C.; CORTADI, A.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. S. Morrenaim b I, a papain-like endipeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). **Journal Protein Chemistry** , 22(1):15-23, 2003.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K. Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant Mol. Biol.**, 29: 397-402, 1995.

CHOUGULE, N. P.; DOYLE, E.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology** , 54:563–572, 2008.

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochem Molec Biol**, 22: 735–746,1992.

DAIMON, T.; TAGUCHI, T.; MENG, Y.; KATSUMA, S.; MITA, K.; SHIMADA, T. β -fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insight into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloid in mulberry latex. **J. Biol Chem.**, 283:15271-79, 2008.

DAVES, C. A.; WILLIAMS, W. P.; DAVIS, F. M.; BAKER, G. T.; MA, P. W. K.; MONROE, W. A.; MOHAN, S. Plant Resistance and Its Effect on the Peritrophic Membrane of Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Larvae. **J. Econ. Entomol.**, 100(3): 976-983, 2007.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Laticíferos articulados anastomosados — novos registros para Apocynaceae. **Ver. Brás de Bot.**, 29, 2006.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62:1057-1071, 2003.

DUNFORD, J. C.; BARBARA, K. A. Tetrio Sphinx, Giant Gray Sphinx, Frangipani Hornworm, *Pseudosphinx tetrio* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae). Disponível em <http://creatures.ifas.ufl.edu>. Acesso em 2 de fevereiro de 2011.

DUSSOURD, D. E. Chemical stimulants of leaf-trenching by cabbage loopers: Natural products, neurotransmitters, insecticides and drugs. **Journal of chemical ecology**, 29:2023-2047, 2003.

DUSSOURD, D. E.; HOYLE, A. M. Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenólídeos to some generalist caterpillars. **Chemoecology**, 10:11-16, 2000.

DUSSOURD, D. E. Behavioral sabotage of plant defensive: Do vein cuts and trenches reduce insect exposure to exudates? **Journal of Insect behavior**, 12:501-515, 1999.

DUSSOURD, D. E.; DENNO, R. F. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. **Ecology**, 72:1383-96, 1991.

DUSSOURD, D. E.; EISNER, T. Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defensive of plants. **Science**, 237:898-901, 1987.

EGUCHI, M. Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors. **Comp. Biochem. Physiol.**, 105(B):449-456, 1993.

ELGAMAL, M. H. A.; HANNA, A. G.; MORSY, N. A. M.; DUDDECK, H.; SIMON, A.; GATI, C.; TÓTH, G. Complete ¹H and ¹³C signal assignments of 5a-cardenólídeos isolated from *Calotropis procera* R. BR. **Journal of Molecular Structure**, 477 :201-208, 1999.

ENGELMANN, F.; GERAERTS, W. P. M. The proteases and the protease inhibitor in the midgut of *Leuchophaea maderae*. **J. Insect Physiol.**, 26:703-710.

FREITAS, C. D. T.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; CAVALHEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L. S.; RAMOS, M. V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 22(1): 11-22, 2010.

FREITAS, C. D. T.; Identificação, purificação, caracterização e atividade biológica de proteínas do látex de *Calotropis procera* envolvidas na defesa da planta. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FREITAS, C. D.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO, M. N. R.; SALES, M. P.; Villas-Boas, L. A.; Ramos, M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:781-789, 2007.

FREITAS, C. D. T. Proteínas do Látex de *Calotropis Procera* (Ait.) R. Br. E Seus Efeitos sobre Pragas Agrícolas. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GIDROL, X.; CHRESTIN, H.; TAN, H-L.; KUSH, A. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. **J. Biol. Chem.**, 269:9278-83, 1994.

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, I. I. P.; PITANGA, J. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiol. Biochem.**, 43:1095-1102, 2005.

GUBB, D.; SANZ-PARRA, A.; BARCENA, L.; TROXLER, L.; FULLAONDO, A. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. **Biochimie**, 92:1749-1759, 2010.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annu. Rev. Entomol.**, 54:285-302, 2009.

HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C.H. Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Anal Biochem**, 224(1):451-455, 1995.

HOLZINGER, F.; FRICK, C.; WINK, M. Molecular basis for the insensitivity of the Monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. **Federation of European Biochemical Societies** 314(3): 477-480, 1992.

HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, 7:400-407, 2004.

HORNBERGER, M.; BÖTTIGHEIMER, U.; HILLIER-KAISER, A.; KREIS, W. Purification and characterisation of the cardenolide-specific-glucohydrolase CGH II from *Digitalis lanata* leaves. **Plant Physiol. Biochem.**, 38:929-936, 2000.

HOWARD, J. B.; GLAZER, A. N. Papaya lysozyme: terminal sequences and enzymatic properties. **J. Biol. Chem.**, 244:1399-409, 1969.

- HU, X.; CHEN, L.; XIANG, X.; YANG, R.; YU, S.; WU, X. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. **Mol. Biol. Rep.** 39:3427-3434, 2012.
- KAMEL, M. S.; ASSAFA, M. H.; ABEB, Y.; OHTANIB, K.; KASAIB, R.; YAMASAKIB, K. Cardiac glycosides from *Cryptostegia grandiflora*. **Phytochemistry**, 58 537-542, 2001.
- KEKWICK, R.; Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-6, 2001.
- KIM, J. S.; KIM, Y. O.; RYU, H. J.; KWAK, Y. S.; LEE, J. Y. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expression by abiotic stress of plant hormone treatments. **Plant Cell Physiol.** 44:412-14, 2003.
- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry** 72:1510-1530, 2011.
- KONNO, K.; ONO, O.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; HIRAYAMA, C. Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103:1337-41, 2006.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y. HATTORI, M; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, 37:370-378, 2004.
- KYNDT, T.; DAMME, E. J. M. V.; BEEUMEN, J. V.; GHEYSEN, G. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea spp.* **The Febs Journal**, 274:451-462, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu. Rev. Entomol.**, 42:525-50, 1997.
- LEWINSOHN, T. M.; VASCONCELLOS-NETO, J. Como os insetos sabotam defesas de plantas: o caso do látex. **Ecologia e Comportamento de Insetos**, 8: 281-298, 2000.
- LI, C.; SONG, X.; LI, G.; WANG, P. Midgut cysteine protease-inhibiting activity in *Trichoplusia ni* protects the peritrophic membrane from degradation by plant cysteine proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 39:726-734, 2009.
- LIGGIERI, C.; OBREGÓN, W.; TREJO, S.; PRIOLO, N. Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. **Acta Biochim Biophys Sin**, 41(2):154-152, 2009.

LIGGIERI, C.; ARRIBERI, M. C.; TREJO, S. A.; CANALS, F.; AVILES, F. X.; PRIOLO, N. S. Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. **Journal the Protein**, 23(6):403-411, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Planatarum p.512, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, H M. Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: Instituto Planatarum, 1999, 250 p.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from látices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, 26: 655-657, 1988.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 25(10):2279-2282, 1988.

MAHLBERG, P. G. Laticifers: an historical perspective. **The Botanical Review** 59:1-23, 1993.

MAHLBERG, P. G., DAVIS, D. G., GALITZ, D. S.; MANNERS, G. D. Laticifers and the classification of *Euphorbia*: the chemotaxonomy of *Euphorbia esula* L. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 94: 165-180, 1987.

MERCER, E. H.; DAY, M. F. The fine structure of the peritrophic membranes of certain insects. **Textile Research Institute**, 1953.

MOHAN, S.; MA, P. W. K.; PECHAN, T.; BASSFORD, E. R.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. **Journal of Insect Physiology**, 52: 21-28, 2006.

MONTI, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A. J. Isolation of Natural Inhibitors of Papain Obtained from *Carica papaya* Latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(5):747-754, 2004.

MONTI, R.; BASILIO, C. A.; TREVISAN, H. C.; CONTIERO, J. Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43(5):501-507, 2000.

MORCELLE DEL VALLE S. R., TREJO, S. A, CANALS, F., AVILES, F. X., PRIOLO, N. S. Funastrain c II, a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*. **Protein J**, 25:205–215, 2004.

MORCELLE, S. F.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, 75:480-193, 2004.

MORSY, T. A.; RAHEM M. A.; ALAM K. A. Control of *Musca domestica* third instar larvae by the latex of *Calotropis procera* (Family: Asclepiadaceae). **J. Egypt Soc. Exp. Biol. Med.**, 31:107-110, 2001.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flash fly *Sarcophaga hemorrhoidalis* fallen. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, 27(2):505-514, 1997.

MOUSSAOUI, A. E.; NIJS, M.; POUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENELLI, J.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. **Cellular e Molecular Life Sciences**, 58:556-570, 2001.

NALLAMSETTY, S.; KUNDU, S.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and biochemical characterization of a highly Active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Journal of Protein Chemistry**, 22(1):1-13, 2002.

OBERHAUSER K. S., SOLENSKY, M. J. Ecologia da Boborleta-Monarca. Disponível em: <http://www.ecologia.info/borboleta-monarca.htm> Acesso em: 17 Jan. 2014.

OBREGON, W. D.; ARRIBERE, M. C.; MORCELLE DEL VALLE, S.; LIGGIERI, C.; CAFFINI, N. O.; PRIOS, N. S. Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. **Journal of Protein Chemistry**, 20:317-325, 2001.

OLIVEIRA, M. G. A.; SIMONEB, S. G.; XAVIERA, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 140:369-380, 2005.

OTTO, H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chem. Rev.**, 97:133-171, 1997.

PATEL, K. D.; JAGANNADHAM, M. V. A. High Cysteine Containing Thiol Proteinase from the Latex of *Ervatamia heyneana*: Purification and Comparison with Ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 51:6326-6334, 2003.

PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors. **J Econ Entomol**, 93:892-896, 2000.

PECHAN, T.; COHEN, A.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. **Plant Biology**, 99(20):13319-13323, 2002.

PENG, J.; ZHONG, J.; GRANADOS. R. R. A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. **Journal of Insect Physiology**, 45:159-166, 1999.

PEREIRA, D. A.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; PORTELA, T. C. L.; GUIMARÃES, J. A.; MADEIRA, S. V. F.; FREITAS, C. D.T. Digestibility of defense proteins in latex of milkweeds by digestive proteases of Monarch butterflies, *Danaus plexippus* L.: A

potential determinant of plant–herbivore interactions. **Plant Science**, 179:348-355, 2010.

PRASAD K. M. R. & VIRUPAKSHA T. K., Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. **Phytochemistry**, 29:1763-1766, 1990.

PRIOLO, N.; VALLE, S. M.; ARRIBÉRE, M. C.; LOPES, L.; CAFFINE, M.; Isolation and Characterization of a Cysteine Protease from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. **Journal of Protein Chemistry**, 19(1)39-49, 2000.

RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; GOMES, M. T. R.; FREITAS, C. D. T.; CARVALHO, C. P. S.; JÚNIOR, P. A. V. R.; SALAS, C. E. A. Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **Protein J.**, 33:199–209, 2014.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 58:211– 219, 2013.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; TEIXEIRA, F. M.; PEREIRA, D. A.; CAVALHEIRO, M. G.; SOUZA, D. P.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T. Latex fluids are endowed with insect repelente activity not specifically related to their proteins or volatile substances. **Braz. J. Plant Physiol.**, 23(1):57-66, 2011.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects **Arthropod-Plant Interactions**, disponível em <<http://www.springerlink.com/content/562t281r4p71378/fulltext.pdf>>, 2010.

RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P. V.; CARVALHO, A. F. U. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 104(6):805-812, 2009.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M. P.; DIEGO P. SOUSA, D. P.; CARLINI, C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, 173:349-357, 2007.

RAMOS, M. V.; BANDEIRA, G. P.; FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR N. M. N.; SOUSA, P. A. S.; CARVALHO, A. F. U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 100(5)503-510, 2006.

RAO, R.; FIANDRA, L.; GIORDANA, B.; EGUILEOR, M.; CONGIU, T.; BURLINI, N.; ARCIELLO, S.; CORRADO, G.; Pennacchio, f. AcMNPVChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34:1205-1213, 2004.

SABY, J. K.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO U. J. S. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. **Phytochemistry** 62:13-19, 2003.

SALES, M. P.; PIMENTA, P. P.; PAES, N. S.; GROSSI-DESÁ, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 27-34, 2001.

SANTIAGO-BLAY, J. A. Notes on *Pseudosphinx tetrio* (L.) (Sphingidae) in Puerto Rico. **Journal of Lepidopterists Society**, 39(3):208-214, 1985.

SARAUER, B. L.; GILLOTT, C.; HEGEDUS, D. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Molecular Biology**, 12(4):333–343, 2003.

SCHOOFS, L.; SALZET, M. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Insects and Gut Leeches. **Current Pharmaceutical Design**, 8:125-133, 2002.

SESSA, R.; BENETT, M. H.; LEWIN, M. J.; MANSFIRLS, J. W.; BEALE, M. H. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species. **Journal Biol. Chem.** 275:26877-84, 2000.

SHI, X.; CHAMANKHAH, M.; VISAL-SHAH, S.; HEMMINGSEN, S. M.; ERLANDSON, M.; BRAUN, L.; ALTING-MEES, M.; KHACHATOURIANS, G. G.; O'GRADY, M.; HEGEDUS, D. D. Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:1101–1115, 2004.

SINGH, A. N.; DUBEY, V. K. Exploring Applications of Procerain B, a Novel Protease from *Calotropis procera*, and Characterization by N-Terminal Sequencing as well as Peptide Mass Fingerprinting. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 164:573–580, 2011.

SINGH, R.K.; MITTAL, P. K.; DHIMAN, R. C. Laboratory study on larvicidal properties of leaf extract of *Calotropis procera* (Family-Asclepiadaceae) against mosquito larvae. **J Commun Dis.**, 37(2):109-13, 2005.

SNOOK, M. E. Characterization and quantification of hexadecyl, octadecyl and eicosyl esters of *p*-coumaric acid in the vine and root latex of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. **J. Agric Food Chem.** 42:2589-95,1994.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 67:1644-1650, 2006.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30:1189-1201, 2000.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 29:87-101, 1999.

TERRA, W. R. The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 47:47-61, 2001.

TOPRAK, U.; BALDWIN, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; HEGEDUS, D. D. Insect intestinal mucins and serine proteases associated with the peritrophic matrix from feeding, starved and moulting *Mamestra configurata* larvae. **Insect Molecular Biology**, 19(2), 163-175, 2010.

TREJO, S. A., LOPEZ, L. M. I., CIMINO, C. V., CAFFINI, N. O., NATALUCCI, C. L. Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). **J Protein Chem**, 20: 445–453, 2001.

VAIRO CAVALLI, S., ARRIBERE, M. C., CORTADI, A., CAFFINI, N. O., PRIOLO, N. S. Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). **J Protein Chem**, 22:15–22, 2003.

VAIRO CAVALLI, S. E., CORTADI, A., ARRIBERE, M. C., CONFORTI, P., CAFFINI, N. O., PRIOLO, N. S. Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (Asclepiadaceae). **Biol Chem**, 382:879–883, 2001.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.; MARIA, A. P.; ARY, B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M. M. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **J. Agric. Food Chem.**, 37:1139-1143, 1989.

WANG, P.; LI, G.; GRANADOS, R.; Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:215-227, 2004.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular Structure of the Peritrophic Membrane (PM): Identification of Potential PM Target Sites for Insect Control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 47:110-118, 2001.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30 135–143, 2000.

WASANO, N.; KONNO, K. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. **Phytochemistry**, 70:880-88, 2009.

WISNIEWSKI, A. (1983) Látex e borracha. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, p. 180.

WITITSUWANNAKUL, D.; CHAREONTHIPHAKORN, N.; PACE, M.; WITITSUWANNAKUL, R. Polyphenol oxidase from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. **Phytochemistry**, 61:115-21, 2002.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Anal. Biochem.**,30:148-152, 1969.

ZALUCKI, M. P.; BROWER, L. P.; ALFONSO, A. M. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first instar *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. **Ecological Entomology**, 26:212–24, 2001.

ZALUCKI, M. P.; MALCOLM, S. B. Plant latex and first-instar monarch larval growth and survival on three North American milkweed species. **Journal of Chemical Ecology**, 25:1827-42, 1999.

ZHAN, S.; MERLIN, C.; BOORE, J. L.; REPERT, S. M. The Monarch Butterfly Genome Yields Insights into Long-Distance Migration. **Cell**, 147:1171–1185.

ZHANG, X.; GUO, W. Isolation and Identification of Insect Intestinal Mucin Haiim86 - The New Target for *Helicoverpa Armigera* Biocontrol. **International Journal of Biological Science**, 7(3):286-296, 2011.

ZHU, R.; LIU, K.; PENG, J.; YANG, H.; HONG, H. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Pest Manag. Sci.**, 63:296–300, 2007.