



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Aspectos Bioquímicos da Herbivoria de *Danaus plexippus* (L.) em Folhas de
Calotropis procera (Ait.) R.Br.**

DANIELLE ARAGÃO PEREIRA

FORTALEZA-CE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Aspectos Bioquímicos da Herbivoria de *Danaus plexippus* (L.) em Folhas de
Calotropis procera (Ait.) R.Br.**

DANIELLE ARAGÃO PEREIRA

Dissertação Submetida à
Coordenação do Programa de pós-
graduação em Bioquímica Vegetal da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2007

Esta dissertação foi apresentada ao Curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á disponível na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Danielle Aragão Pereira

Dissertação aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Deptº de Bioquímica e Biologia
Molecular-UFC
Orientador

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira
Carvalho. Deptº Bioquímica e Biologia
Molecular-UFC
Examinadora

Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas
Deptº de Bioquímica e Biologia
Molecular - UFC
Examinador

Dr. Antônio Sílvio do Egito
EMBRAPA
Examinador

Os céus proclamam a glória de Deus e o firmamento anuncia as obras de suas mãos. Um dia discursa ao outro e uma noite revela conhecimento a outra noite. Não há linguagem, nem há palavras, e deles não se ouve nenhum som; no entanto, por toda a terra se faz ouvir a sua voz, e as suas palavras até aos confins do mundo.

A lei do Senhor é perfeita e restaura a alma; o testemunho do Senhor é fiel, e dá sabedoria aos símplices. Os preceitos do Senhor são retos, e alegam o coração; o mandamento do Senhor é puro e ilumina os olhos. O temor do Senhor é límpido, e permanece para sempre; os juízos do Senhor são verdadeiros e todos igualmente justos. São mais desejáveis do que ouro, mais do que muito ouro depurado; e são mais doces que o mel e o destilar dos favos.

As palavras de meus lábios e o meditar do meu coração sejam agradáveis na tua presença, Senhor, rocha minha e redentor meu!

Salmo 19

Dedico este trabalho aos
meus pais que não mediram
esforços para ajudar em
minha formação, sempre
demonstrando amor e apoio
incondicionais.

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.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Fundação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP).

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, por ter me acolhido em seu laboratório. Por toda atenção dispensada, pelo interesse e competência na orientação do trabalho experimental. Agradeço ainda sua paciência frente as minhas dificuldades, os conselhos e a preocupação demonstrada durante todo o período do estágio.

Ao **Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas**, por sua colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Aos colegas do laboratório de Biologia e Bioquímica de Proteínas Vegetais **Jefferson Oliveira e Fabiano Moura**, por terem me auxiliado com seus conhecimentos no esclarecimento de dúvidas. Ao **Diego Pereira** pela ajuda nos experimentos realizados. Ao **José Marcelo e João Vitor** pelo companheirismo demonstrado. À **Raquel Sombra, Mayara Patrícia e Eliane Araújo** pela amizade e apoio tão preciosos.

A todos os colegas que fazem parte do curso de Graduação em Ciências Biológicas, pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia. Principalmente, **Camila Barbosa, Jacilane Ximenes, Raquel Sombra e Thaís Moura**.

Ao meu amado marido **Herbenildo de Souza**, pelo amor, companheirismo e apoio para vencer os obstáculos do dia-a-dia.

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.

Principalmente, ao **Senhor Jesus** por me dar forças para vencer as minhas dificuldades, sabedoria para enfrentar os momentos difíceis e esperança.

SUMÁRIO

Item	Título	Página
	LISTA DE FIGURAS	x
	LISTA DE TABELAS	xii
	ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xiii
	RESUMO	xiv
	ABSTRACT	xv
I	INTRODUÇÃO	1
1.1	Defesa das Plantas Contra Insetos	1
1.1.2	Defesa induzida	2
1.1.3	Defesa constitutiva	3
1.2	Látex	5
1.2.1	Composição bioquímica do látex	7
1.2.3	Látex e defesa vegetal	7
1.2.3.1	Proteínas de fluidos laticíferos envolvidas na defesa vegetal	8
1.3	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	10
1.4	Adaptação de herbívoros às plantas que contêm látex	13
1.5	<i>Danaus plexippus</i> (L.) - monarca	14
II	OBJETIVOS	18
III	JUSTIFICATIVA	20
IV	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Reagentes	21
4.2	Material animal	22
4.3	Material vegetal	22
4.4	Coleta e fracionamento do látex	23

4.5	Criação da monarca	23
4.6	Caracterização bioquímica do extrato do trato digestório da monarca no 5º estágio larval	25
4.6.1	Extração do trato digestório	25
4.6.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida	26
4.6.3	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida	26
4.6.4	Ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato	28
4.6.5	Ensaio de inibição de proteases utilizando azocaseína como substrato	29
4.6.6	Atividade proteolítica em diferentes faixas de temperatura	30
4.6.7	Ensaio de atividade proteolítica utilizando BANA como substrato	30
4.6.8	Ensaio de atividade proteolítica utilizando BApNA	31
4.6.9	Zimograma para detecção de atividade proteolítica	31
4.7	Inibição de proteases do homogenato intestinal da monarca pela fração PL de <i>C. procera</i> aquecida	32
4.8	Ensaio de digestibilidade das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria rubra</i> e <i>Cryptostegia grandiflora</i> frente às enzimas digestivas da lagarta monarca	33
4.9	Bioensaios com a lagarta Monarca (<i>Danaus plexippus</i>)	34
4.9.1	Desenvolvimento da dieta artificial	34
4.9.2	Bioensaio com monarca alimentada com dieta artificial contendo a fração PL de <i>Calotropis procera</i>	36
4.10	Resposta da planta <i>C. procera</i> ao ataque da lagarta monarca	37
4.10.1	Atividade proteolítica	37

4.10.2	Atividade quitinolítica	38
4.10.3	Detecção quantitativa de enzimas antioxidantes	39
4.10.3.1	Peroxidase do ascorbato	39
4.10.3.2	Peroxidase do guaiacol	40
4.10.3.2	Catalase	40
4.10.3.4	Superóxido dismutase	41
4.10.4	Eletroforese bidimensional	41
4.11	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	26
5.1.	Ciclo de vida da monarca	43
5.2.	Caracterização bioquímica do trato digestório das larvas da monarca do 5º estágio	43
5.3	Inibição das proteases intestinais da monarca pela fração do látex de <i>C. procera</i> rica em inibidor de protease.	50
5.4	Ensaio de digestibilidade das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> , <i>Plumeria rubra</i> e <i>Cryptostegia grandiflora</i> frente às proteases intestinais da larva monarca	52
5.5	Proteínas do látex de <i>C. procera</i> resistentes às enzimas digestivas da larva monarca.	54
5.6	Bioensaio com a larva monarca (<i>Danaus plexippus</i>)	55
5.6	Resposta da planta <i>C. procera</i> ao ataque da lagarta monarca	58
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1.	Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos mostrada através de cortes longitudinais do caule de <i>Nerium oleander</i> (não-articulado) e <i>Papaver somniferum</i> (articulado).	6
2.	.A planta <i>Calotropis procera</i>	11
3.	Estratégias de sabotagem do látex	15
4.	Fases do ciclo de vida da monarca	16
5.	Caixas de criação de borboletas	24
6.	Borboletas se alimentando com solução de mel a 10% e ramo de folhas de <i>C. procera</i> para ovoposição das borboletas	24
7.	Caixa de criação das lagartas.	25
8.	Eletroforese e zimograma das proteínas do látex de <i>C. procera</i> e de extratos intestinais de larvas da monarca no 5º estágio.	45
9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5% e zimograma para proteases do extrato intestinal de larvas do 5º estágio da monarca alimentadas com folhas de <i>C. procera</i>	47
10.	Efeito do pH e temperatura sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas da monarca no 5º estágio.	48
11.	Efeitos de ativadores e inibidores na atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas da monarca no 5º estágio utilizando azocaseína 1% como substrato em pH 7,5.	49
12.	Eletroforese e zimograma para detecção de atividade proteolítica do extrato intestinal da larva monarca no 5º estágio inibido pela fração PLaq de <i>C. procera</i> .	51

13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das proteínas do homogenato intestinal de *Danaus plexippus* no 5º estágio larval quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com albumina sérica bovina, proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera*, *Plumeria rubra* e *Cryptostegia grandiflora*. 53
14. Eletroforese bidimensional do homogenato intestinal da lagarta monarca no 5º estágio e da fração PL de *C. procera*. 54
15. Efeito da fração PL de *C. procera* sobre o desenvolvimento da larva monarca. 57
16. Eletroforeses bidimensionais das frações PL de *Calotropis procera* obtidas de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a dano mecânico 59
17. Atividade proteolítica inespecífica, cisteínica, quitinolítica e inibição de protease cisteínica das frações PL de plantas atacadas pela monarca ou submetidas a dano mecânico. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1.	Quantidades dos ingredientes utilizados na dieta artificial da lagarta Monarca.	35
2.	Composição da mistura de vitaminas utilizada na dieta artificial	36
3.	Ciclo de vida da monarca criada em condições de laboratório	44
4.	Atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas recém alimentadas com folhas de <i>C. procera</i> , em jejum de 24 h e alimentadas com dieta artificial sem as proteínas do látex.	46
5.	Desenvolvimento da monarca quando alimentada com folhas de <i>C. procera</i> e dieta artificial	56
6.	Diferença na intensidade e volume relativos de spots das frações PL obtidas de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a danos mecânicos	60
7.	Proteínas identificadas da fração PL de <i>C. procera</i> por MALDI-TOF-TOF	61
8.	Atividade de enzimas antioxidantes na fração PL de <i>C. procera</i> .	64

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BSA	Albumina Sérica Bovina
BANA	N-benzoil-arginina-naftitilamida
Da	Dalton
DMACA	4-(dimetilamino)-cinamaldeído
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidio)-butano
nm	Nanômetro
PL	Fração solúvel dos látices denominada de Proteínas do Látex
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluor
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido tricloro acético
Tris	Tris-hidroxiaminometano
UA	Unidade de Atividade
µg	Micrograma

RESUMO

Aspectos Bioquímicos da Herbivoria de *Danaus plexippus* (L.) em Folhas de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Evidências foram acumuladas sustentando o papel do látex em proteger as plantas contra diferentes agressores, porém, é conhecido que plantas laticíferas são fortemente atacadas pela lagarta monarca, incluindo *Calotropis procera*. O presente estudo descreve a atividade proteolítica relacionada com a herbivoria do quinto estágio da monarca, *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Danaidae). Extratos intestinais da monarca digeriram azocaseína, BANA e BApNA. A atividade proteolítica sobre azocaseína foi inibida por E-64 e IAA, mas foi fortemente inibida por PMSF e Leupeptina inibidores de proteases serínicas. Extrato intestinal digeriu rapidamente as proteínas do látex *C. procera*. No entanto, não digeriu proteínas do látex de *Cryptostegia grandiflora* e apenas uma banda protéica do látex de *Plumeria rubra* foi digerida, duas espécies livres de herbivoria da monarca. Larvas alimentadas com dieta artificial contendo proteínas do látex de *C. procera* não foram afetadas e a taxa de crescimento foi ligeiramente melhor em relação ao controle. Os perfis protéicos dos fluidos laticíferos extraídos de plantas saudáveis e atacadas apresentaram diferenças visíveis, com o aumento da detecção de uma proteína identificada como glicosídeo hidrolase. Este resultado não foi detectado em plantas submetidas a danos mecânicos. As atividades proteolítica, quitinolítica, de inibição de protease e de enzimas antioxidantes não foram alteradas em plantas atacadas pela monarca ou submetidas a danos mecânicos. Resultados obtidos neste trabalho fornecem informações interessantes sobre a resistência de monarca alimentadas com *Calotropis procera* e sugerem que a capacidade das enzimas proteolíticas da monarca de prontamente digerir proteínas do látex pode, pelo menos em parte, explicar como este inseto supera a toxicidade das proteínas do látex.

ABSTRACT

Biochemical Aspects of Herbivory of *Danaus plexippus* (L.) on leaves *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Evidence has been accumulated supporting the role of latex in protecting plants against different aggressors; however it is known that milkweeds are heavily attacked by monarch butterfly, including *Calotropis procera*. The present study describes the proteolytic activity related to the herbivory of 5th instars of the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Danaidae) fed on diets containing latex proteins, and the proteolytic activity of larvae gut extract on latex proteins. Gut extracts of monarch digested azocasein, BANA and BApNA. The proteolytic activity on azocasein was inhibited by cysteine protease inhibitors such as E-64 and iodoacetamide but it was stronger inhibited by PMSF and leupeptin, serine proteases inhibitors. Gut extracts of monarch digested latex proteins promptly. However, gut extracts did not digest latex proteins from *Cryptostegia grandiflora* and only barely digested laticifer proteins from *Plumeria rubra*, two species free of monarch herbivory. Larvae fed on artificial diets containing latex proteins were not affected and growth rate was slightly better compared to control. The protein profile of latex proteins extracted of healthy and attacked plants exhibited visible differences with increasing detection of a protein identified as glycoside hydrolase in latex of attacked plants. The proteolytic, chitinolytic, inhibition protease and anti-oxidative activities not were altered in attacked or injured plants. Results present here give interesting information on resistance of monarch fed on *Calotropis procera* and suggest that the ability of monarch proteolytic enzymes to promptly digest latex proteins can at least in part explain how the insect overcomes defensive proteins of latex.

I - INTRODUÇÃO

1.1 Defesas das Plantas Contra Insetos

Apesar da aparente passividade, as plantas não aceitam de modo inativo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou de agentes não-biológicos como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros. Os vegetais são capazes de perceber as agressões, e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam com frequência.

As plantas são a principal fonte de alimento para muitos animais, como mamíferos e vários invertebrados. Muitas espécies de insetos são herbívoras e durante a evolução as plantas desenvolveram incríveis estratégias de defesa contra estes animais. Para sobreviver elas desenvolveram mecanismos de defesa físicos, como, espinhos, acúleos, tricomas e tegumento resistente. Bem como, mecanismos de defesa químicos, como compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides. Além destes, há proteínas envolvidas na defesa vegetal, como as proteases, quitinases, inibidores de proteases e lectinas (KESSLER; BALDWIN, 2002; HOWE; JANDER, 2008).

A defesa vegetal pode ocorrer de maneira direta ou indireta. Defesas indiretas são as características de plantas que atraem predadores e parasitóides de herbívoros, facilitando o controle da população dos mesmos. Já as defesas diretas são as características da planta que por si só afetam o desempenho do ataque de herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002). Barreiras físicas, como dureza foliar e tricomas são comumente referidos como defesa direta.

Componentes que exercem efeito repelente, antinutritivo ou tóxico sobre herbívoros são também referidos como defesas diretas (HOWE; JANDER, 2008).

As características das plantas que conferem resistência a insetos também podem ser classificadas de acordo com a maneira pela qual são reguladas. Algumas características de defesa são expressas constitutivamente, ou seja, as características de proteção contra patógenos e predadores fazem parte do programa de desenvolvimento normal da planta (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002; HOWE; JANDER, 2008). As plantas também possuem a capacidade de ativar mecanismos protetores em resposta a alguma infecção ou herbivoria, esse tipo de defesa é denominada induzida ou adquirida (CHESIN; ZIPF, 1990).

1.1.2 Defesa induzida

As respostas induzidas podem aumentar a resistência da planta a ataques de herbívoros por reduzir a preferência ou efeitos sobre a planta danificada (HARBORNE, 1997).

Relativamente pouco é conhecido sobre o reconhecimento de eventos moleculares que acionam as defesas da planta contra insetos. As respostas de defesa podem ser acionadas por elicitores, os quais são moléculas derivadas de insetos ou componentes da planta que são modificados por insetos (KESSLER; BALDWIN, 2002). Além da interação química que ocorre entre inseto e planta, os danos mecânicos causados na herbivoria também desencadeiam resposta na planta. Estudos têm investigado esta relação simulando os danos mecânicos causados por insetos (MAFFEI *et al.*, 2007; KESSLER; BALDWIN, 2002).

Quando as plantas são atacadas por insetos herbívoros uma complexa rede de transdução de sinais é ativada. O sucesso das plantas para resistir ao ataque de insetos depende de sua habilidade em reconhecer e decifrar os sinais do ataque. Eventos que ocorrem antes da produção de moléculas de defesa responsáveis por reconhecer e disparar as vias de

transdução do sinal são pouco conhecidos. Os eventos na interação planta-inseto iniciam a partir de um desbalanço de íons, causando variações no potencial de membrana, sinalização por Ca^{2+} , produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), atividade de quinases e produção de fitohormônios. A interação entre estas moléculas precedem a expressão de genes (MAFFEI *et al.*, 2007).

A principal rota envolvida na maioria das defesas vegetais contra insetos herbívoros é a rota do octadenóide, a qual leva a produção do hormônio vegetal ácido jasmônico (AJ). Os níveis de ácido jasmônico aumentam rapidamente em resposta ao dano causado por insetos herbívoros e desencadeiam a produção de muitas proteínas de defesa vegetal. O AJ induz a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo de defesa vegetal, incluindo os que codificam enzimas-chave em todas as principais rotas de metabólitos secundários. Vários outros compostos de sinalização, incluindo o etileno, o ácido salicílico e o metil salicilato, também são induzidos após a herbivoria por insetos. Frequentemente, uma ação coordenada desses compostos é necessária para a ativação completa de respostas de defesa induzidas (CREELMAN; MULLET, 1997).

A habilidade das plantas para reconhecer e se defender respondendo ao ataque de insetos pode constituir uma forma de imunidade, na qual as moléculas de defesa se acumulam em toda a planta, mesmo em áreas não danificadas distantes do local do ataque. Protegendo a planta, inclusive, contra futuros ataques (HOWE; JANDER, 2008).

1.1.3 Defesa constitutiva

Defesas químicas representam custo para planta, devido ao consumo de recursos em sua biosíntese. Uma alternativa para reduzir estes custos é a produção destes componentes apenas após o ataque de herbívoro (resposta induzida). Esta estratégia é um risco porque um

ataque inicial pode ser muito rápido e severo para as defesas induzidas serem empregadas efetivamente. Conseqüentemente, plantas que sofrem freqüentes ou sérios danos investem principalmente em defesas constitutivas, enquanto que plantas que são raramente atacadas investem predominantemente em defesas induzidas HOWE; JANDER, 2008. Os vegetais contêm pré-formados proteínas e metabólitos secundários que são defesas potenciais contra herbivoria e/ou infecções microbianas.

Muitos componentes são tóxicos para a própria planta, no entanto, os vegetais que sintetizam toxinas constitutivas são hábeis para produzir e estocar estas sem serem afetadas por sua toxicidade. Uma das estratégias é estocar toxinas como precursores inativos, separados das enzimas ativadoras (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). A forma como toxinas constitutivas são estocadas é frequentemente essencial para sua efetividade. Há evidências que indicam que as toxinas produzidas são estocadas próximas da superfície da planta, devido ser o local no qual as mesmas entrarão mais rapidamente em contato com os herbívoros. Os tricomas são um exemplo de estrutura localizada na superfície que estoca moléculas de defesa. A superfície de cera que reveste as folhas, além de ser uma barreira física para alimentação de insetos, pode conter componentes de defesa (HARBORNE, 1997). Além destes, as toxinas vegetais podem ainda serem estocadas em ductos de resinas ou laticíferos. As toxinas são liberadas em larga escala tão rapidamente quanto essas estruturas são rompidas pela alimentação de herbívoros (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). Os laticíferos são estruturas das plantas que produzem o látex, o qual contém constituintes de defesa e sua função tem sido atribuída à defesa contra patógenos e herbivoria (AGRAWAL; KONNO, 2009).

1.2 Látex

Látex, que significa “fluido” em latim, é uma suspensão ou emulsão aquosa de substâncias químicas variadas, produzido por células especializadas. 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, células vivas. Estas células são capazes de crescimento e divisão, bem como de regulação da composição química do látex (LEWINSOHN; VASCONCELLOS-NETO, 2000). A capacidade para formar látex é encontrada em plantas de diferentes habitats e com diferentes hábitos de vida como ervas, arbustos e árvores. Cerca de 12.500 espécies de 900 gêneros pertencentes a 12 famílias possuem a capacidade de produzir este fluido. Além das plantas, fungos como algumas espécies dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* também têm esta capacidade. Embora o látex, na maioria das vezes, apresente um aspecto leitoso, pode apresentar 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).

Entre as famílias de plantas produtoras de látex destacam-se Euforbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1988) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também produzam esta substância.

Laticíferos são células ou fileiras de células especializadas. Em estudos anatômicos de laticíferos de algumas plantas observou-se que são preenchidos por látex desde suas porções mais jovens, e que o próprio protoplasto da célula laticífera compõe este fluido (KEKWICK, 2001). Estas células quando maduras aparentemente permanecem vivas e com a secreção em seu interior, que somente será liberada para o meio extracelular se a planta for injuriada. Ao seccionar um órgão, imediatamente inicia o extravasamento de látex dos laticíferos

interconectados que, em pouco tempo, coagula e sela o órgão injuriado (DEMARCO *et al.*, 2006). Os laticíferos podem ser classificados como articulados e não articulados (Figura 1). Os articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células em que as paredes celulares que separam as células individuais permanecem intactas, enquanto os laticíferos não articulados surgem de uma simples célula que cresce nos espaços intercelulares, eventualmente se ramificando nos tecidos das plantas de um 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).

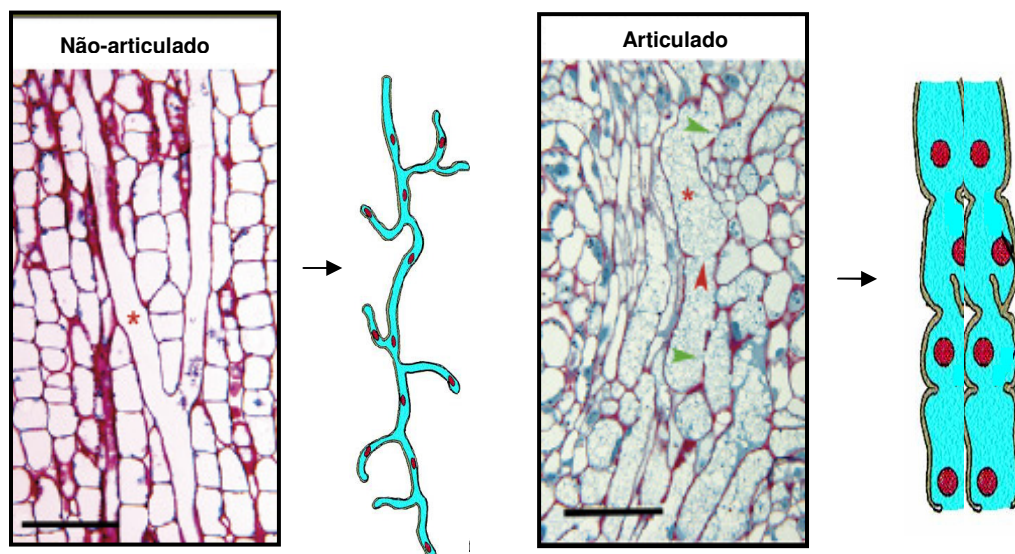


Figura 1- Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos mostrada através de cortes longitudinais do caule de *Nerium oleander* (nã-articulado) e *Papaver somniferum* (articulado). O canal laticífero está indicado pelo asterisco vermelho. Adaptado de HAGEL *et al.*, 2008.

1.2.1 Composição bioquímica do látex

Látex é um fluido que contém variada composição bioquímica. Este pode ser definido como uma suspensão de partículas de borracha (fase dispersa) em um meio aquoso, chamado soro (WISNIEWSKI, 1983).

O látex 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. Poliisoprenos constituem proporcionalmente a principal porção da maioria dos fluidos laticíferos e dão a estes a característica colante do látex recém exsudado.

A fase soro, também chamada como 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, 1986).

Como já ressaltado, o látex possui algumas moléculas frequentemente relacionadas à defesa da planta contra patógenos e herbívoros. Vários estudos têm sido realizados com o intuito evidenciar esta função defensiva.

1.2.3 Látex e defesa vegetal

Em 1887 surgiram as primeiras suposições sobre o papel de defesa do látex. Os primeiros experimentos que demonstraram que o látex é uma característica de resistência foram publicados em 1905. Neste trabalho, 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 *et al.*, (2004) demonstrou que folhas de mamoeiro e *ficus* recortadas em tiras e lavadas, livres de látex, tornaram-se aceitáveis para herbívoros que normalmente perecem em folhas intactas.

O látex contém uma diversidade de componentes biologicamente ativos. Muitos destes proporcionam resistência a herbivoria por efeitos tóxicos ou antinutritivos, enquanto outros estão envolvidos no efeito colante do látex que pode imobilizar alguns 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). O látex de algumas espécies é uma rica fonte de cardenolídeo (glicosídeos cardíacos) (KAMEL, 2001; DUSSOURD; HOYLE, 2000). Além de metabólitos secundários, o látex possui uma variedade de proteínas relacionadas à defesa vegetal.

1.2.3.1 Proteínas de fluidos laticíferos envolvidas na defesa vegetal

A presença de proteínas relacionadas à defesa em fluidos laticíferos é mais uma evidência de que o látex apresenta função defensiva. Vários estudos têm comprovado que proteínas detectadas no látex são inseticidas ou afetam o desenvolvimento de alguns insetos.

No látex de diversas espécies foram encontradas proteases. Têm sido detectadas mais frequentemente proteases serínicas e, principalmente, cisteínicas (PRIOLO *et al.*, 2000; MOUSSAOUI *et al.*, 2001; ANTÃO; MALCATA, 2005; KYNDT *et al.*, 2007). Há evidências para o envolvimento de proteases cisteínicas na resistência contra herbívoros. Experimentos mostraram que a forte toxicidade de folhas de *Carica papaya* e *Ficus virgata* contra a lagarta *Samia ricini* e *Mamestra brassicae* desaparecem quando o látex é drenado ou

quando as folhas são pinceladas com E-64, um inibidor de protease cisteínica. (KONNO *et al.*, 2004).

Inibidores de protease (IP) têm função antinutritiva por se ligarem a proteases e prevenir a digestão de proteínas. Inibidores de tripsina (protease serínica) foram encontrados no látex de *Ficus carica* (KIM *et al.*, 2003) e *Carica papaya* (AZARCAN *et al.*, 2004). Neste ultimo ainda foram encontrados inibidores de proteases cisteínicas (MOUSSAOUI *et al.*, 2001).

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidrato, estas possuem afinidade por moléculas de açúcar específicas. Frequentemente são tóxicas a animais incluindo os insetos. Muitos tipos de lectinas foram encontrados no látex das famílias Euforbiaceae, Moraceae, e Apocynaceae. A heveína, lectina do látex de *H. brasiliensis*, é importante na aglutinação de partículas de borracha (GIDROL *et al.*, 1994). Uma proteína ligante à quitina do látex de *Morus* é altamente tóxica a lagartas, incluindo *Mamestra brassicae* (WASANO, *et al.*, 2009). Proteínas ligantes a quitina podem agir inibindo a síntese da membrana peritrófica de insetos (SALES *et al.*, 2001).

Quitinases são enzimas que degradam a quitina, que é um importante componente da membrana peritrófica de insetos. Estas proteínas são amplamente encontradas no látex de muitas famílias incluindo Caricaceae, Moraceae, Euforbiaceae e Apocynaceae (HOWARD; GLAZER, 1969; FREITAS *et al.*, 2007).

Polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POD) são oxidases comumente reportadas em Euforbiaceae, Moraceae e Anacardiaceae (SABY *et al.*, 2003; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2002). PPOs e algumas PODs são consideradas proteínas de defesa de planta contra herbívoro, por que elas oxidarem mono- ou di-hidroxifenólicos que são convertidos em ultima instância em o-quinonas, as quais posteriormente ligam-se covalentemente a aminoácidos como cisteína e lisina, tornando-os inacessíveis e diminuindo o valor nutritivo de proteína na

folha. Lipoxigenases (LOX) também foram reportadas em plantas laticíferas, sendo implicadas como proteínas de defesa. Desde que foram induzidas por danos mecânicos e ácido jasmônico (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Além destas, outras proteínas com função de defesa foram detectadas no látex de algumas espécies. Como lípases e glutamil ciclases em *Carica papaya* (MOUSSAOUI *et al.*, 2001). Finalmente, também foram encontradas em fluidos laticíferos glicosil hidrolases, que são um diverso grupo de enzimas classificadas em relação à atividade enzimática e mecanismos de hidrólise. Estas proteínas têm sido isoladas no látex de *C. papaya* e *H. brasiliensis* (MOUSSAOUI *et al.*, 2001, CHEYE; CHEUNG, 1995). β -glicosidases são responsáveis por ativar alguns componentes tóxicos quando a planta é injuriada durante a herbivoria. Elas participam da ativação de glicosídeos cianogênicos, avenacosídeos e glucosinolatos (MORANT *et al.*, 2008). Estas enzimas participam ainda na produção de glicosídeos secundários, isto é, cardenolídeos sem a glicose terminal (HORNBERGER *et al.*, 2000).

Estudos recentes demonstraram que proteínas tóxicas foram detectadas no látex da planta *Calotropis procera*. Estes resultados mostram que esta é uma espécie interessante para investigar a função protetora do látex.

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

O gênero desta planta pertence à subfamília Asclepiadoideae (família Apocynaceae), composta por plantas laticíferas. Seu nome científico é originário do grego (“Kalos” = belo, “tropis” = barco) e do latim (“procerus” = alto, esbelto).

C. procera tem sua origem na Índia e África Tropical, mas foi levada como planta ornamental para outras partes do mundo. Esta espécie pode ser encontrada em quase todas as

regiões tropicais da América, incluindo o Brasil, onde foi introduzida também como planta ornamental, em Recife, no início do século XIX. É encontrada com muita facilidade em terrenos baldios, beiras de estrada e dunas. Um fato interessante é que esta planta se desenvolve apenas em áreas ensolaradas.

Esta espécie possui muitos nomes populares, que variam de acordo com a região em que é encontrada: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortências (CE), paninha-de-seda (SP), leiteiro (SP, MG), queimadura e jacaúna (NE).

Esta planta 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 2). A sua disseminação se dá apenas pelo vento (LORENZI ; MATOS, 2002).



Figura 2 - A planta *Calotropis procera* (A). Detalhes da flor (B) e fruto (C).

Vários componentes químicos, incluindo glicosídeos cardíacos, flavonóides, compostos fenólicos e terpenóides, têm sido isolados desta espécie. O látex de *C. procera* contém os glicosídeos cardíacos calotropina, calotoxina, uscaridina, uscarina e proceragenina (ELGAMAL *et al.*, 1999). O látex desta espécie é rico em proteína. A fração protéica foi caracterizada quanto à atividade enzimática por FREITAS *et al.* (2007). Foi detectada forte atividade antioxidante de superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato. Entretanto catalase foi ausente. A atividade proteolítica predominante foi a cisteínica e atividade quitinolítica também foi observada.

Dentre as diversas atividades biológicas detectadas em *C. procera*, a atividade inseticida é de particular interesse para a compreensão das funções de defesa do látex. MOURSY (1997) observou que extratos etanólicos de folhas desta espécie foram tóxicos para diferentes estágios da mosca da carne (*Sarcophaga haemorrhoidalis*). O extrato metanólico de folhas apresentou propriedades larvicida contra *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (SINGH *et al.*, 2005). O látex de *C. procera* a uma concentração de 5% foi capaz de matar e digerir parcialmente larvas da *Musca domestica* em três horas (MORSY *et al.*, 2001). Ramos *et al.* (2006) mostrou que este fluido laticífero possui efeitos tóxicos sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas *Aedes aegypti*. Este trabalho evidenciou o envolvimento de proteínas na atividade larvicida. No entanto, moléculas não protéicas também apresentaram efeito tóxico sobre as larvas. Posteriormente, foi evidenciado o envolvimento de proteases cisteínicas na ação larvicida de alguns fluidos laticíferos contra *A. aegypti*, inclusive do látex de *C. procera* (RAMOS *et al.*, 2009).

RAMOS (2007) demonstrou, 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 feijão de corda), *Zabrotes subfasciatus* (praga do feijão comum, mulatinho), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) e *Ceratitidis capitata* (mosca-das-

frutas). Os resultados sugeriram que a ação inseticida do látex pode estar relacionada à atividade proteolítica do mesmo, na qual se destaca uma forte atividade do tipo cisteínica. No entanto, inibidor de proteinase e quitinase também podem estar envolvidos na atividade inseticida.

Embora o látex de *C. procera* e de muitas outras espécies possuam efeitos tóxicos contra insetos, alguns destes ainda são hábeis para sabotar a defesa proporcionada pelo látex.

1.4 Adaptação de herbívoros às plantas que contêm látex

Existem três maneiras gerais por meio das quais os herbívoros podem lidar com as defesas das plantas. (1) Podem evitar uma defesa selecionando, por exemplo, tecidos nos quais ela não esteja presente ou ativa; (2) podem tolerar as defesas, ou seja, têm a capacidade de entrar em contato ou ingerir uma substância defensiva sem sofrer conseqüências; (3) há ainda o comportamento de desarmar ou sabotar uma defesa através de uma rota metabólica ou comportamento especializado. Pode haver também uma multiplicidade e complementação destas estratégias básicas.

Entre os insetos que evitam o látex, estão os afídeos, como *Aphis nerii*, capazes de introduzir o seu rostro em espaços intercelulares até atingi as células do floema, das quais se alimentam por sucção (BOTHÁ *et al.*, 1972).

Muitos insetos herbívoros têm a capacidade de suportar os efeitos tóxicos ou antinutritivos de plantas laticíferas. Por exemplo, o bicho da seda (*Bombyx mori*) é um especialista em se alimentar de *Morus* spp., o qual contem alcalóides que mimetizam açucars. Para tanto, este inseto desenvolveu sacarase e trealase insensíveis a estes alcalóides (DAIMON *et al.*, 2008)

Para sabotar a defesa do látex, os insetos especialistas em plantas laticíferas rompem as 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, permitindo, portanto, uma alimentação mais eficaz (DUSSOURD; EISNER, 1987). Este processo pode reduzir a ingestão de látex pelo inseto em até 90% (DUSSOURD, 1999). O corte pode ser em local único, o que geralmente acontece nos laticíferos não articulados (Figura 3b) (DUSSOURD, 1999; DUSSOURD; EISNER, 1987). De maneira geral, especialistas que se alimentam de plantas com laticíferos articulados fazem trincheiras lineares ou circulares (Figura 3c) (DUSSOURD; DENNO, 1991).

Entretanto, esta estratégia só é eficiente para insetos que possuam alguma 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). Um inseto que possui esta capacidade é a larva da monarca (*Danaus plexippus*), especialista em plantas laticíferas.

1.5 *Danaus plexippus* (L.) - monarca

As borboletas-monarcas (*Danaus plexippus*) pertencem à ordem Lepidoptera e a família Nymphalidae. Elas 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 quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 4). Durante a fase larval passa por cinco estágios (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2006).

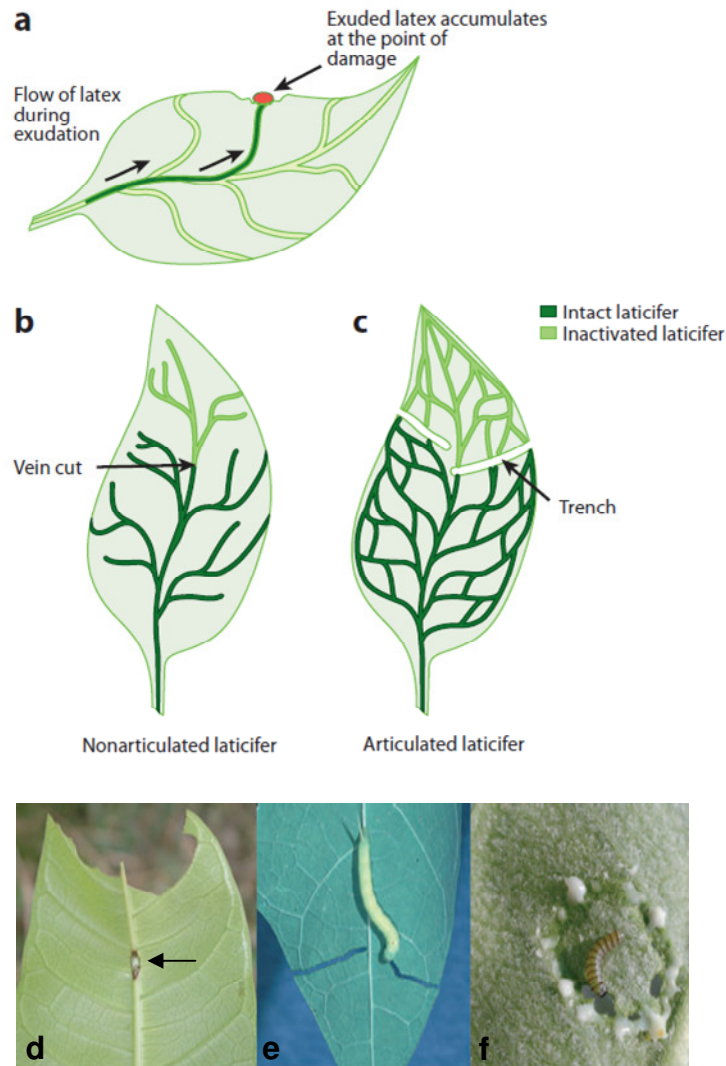


Figura 3 - Estratégias de sabotagem do látex. (a) O látex concentrado no ponto danificado (vermelho). (b) Comportamento de corte da nervura de especialistas se alimentando de plantas com laticíferos não articulados e (c) trincheiras formadas por especialistas se alimentando de planta com laticíferos articulados. (d) Corte da nervura central (seta) de uma folha de *Ficus virgata* (laticíferos não articulados); (e) larva de *Erinnys* trinchanto folhas de *Carica papaya* (laticíferos articulados); e (f) primeiro estágio da lagarta monarca (*Danaus plexippus*) empregando uma trincheira circular sobre uma planta com laticíferos não articulados. Figura adaptada de AGRAWAL e KONNO (2009)

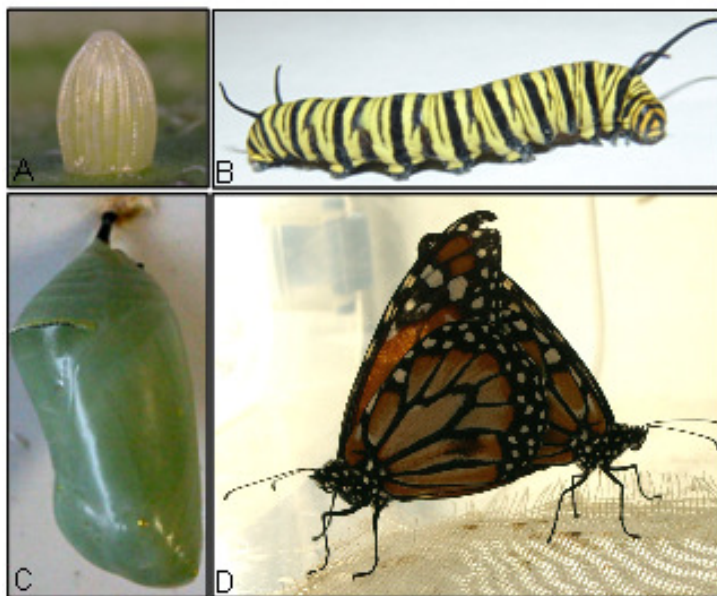


Figura 4 - Fases do ciclo de vida da monarca. (A) ovo; (B) larva; (C) casulo e (D) borboletas acasalando.

As larvas da monarca são herbívoras especialistas, consumindo apenas as plantas hospedeiras asclépias, pertencentes à subfamília Asclepiadoideae. (WOODSON, 1954). As asclépias fornecem as monarcas uma defesa química eficaz contra vários predadores. As monarcas extraem os cardenolídeos (também denominados glicosídeos cardiotônicos) presentes nas folhas de asclépias (BROWER E MOFFIT, 1974), tornando-se venenosas à maioria dos vertebrados. Estes cardenolídeos inibem a Na^+K^+ -ATPase. 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). No entanto, esta espécie parece ser afetada negativamente pelo consumo de plantas com elevados teores de cardenolídeos e, de fato, podem morrer de inanição quando a mandíbula fica colada ou o corpo imobilizado numa gota de látex (ZALUCKI; MALCOLM, 1999; ZALUCKI *et al.*, 2001).

Para reduzir o risco de serem imobilizadas e para evitar o efeito tóxico do látex, a lagarta monarca apresenta dois comportamentos distintos. Na primeira fase larval faz

trincheiras circulares para diminuir o fluxo de látex. Quando maior mastiga e corta a base da nervura central da folha, interrompendo o fluxo de látex viscoso para o restante da folha, (DUSSOURD; EISNER, 1987).

As larvas de *D. plexippus* podem ser encontradas em diversas espécies de asclépias como *Asclepias syriaca*, *Asclepias incarnata*, *Cynanchum laeve* e etc. No estado do Ceará são facilmente encontradas se alimentando de folhas de *C. procera*. Esta observação leva ao questionamento de como a monarca poderia resistir aos efeitos deletérios de proteínas do látex que foram observados para outros insetos, inclusive para uma lagarta (Lepidoptera).

II – OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os aspectos bioquímicos da herbivoria de *Danaus plexippus* sobre as folhas de *Calotropis procera*. Através deste estudo objetiva-se entender por que as proteínas do látex que possuem ação tóxica para outros insetos não causam efeitos deletérios sobre a monarca. Ainda é objetivo do trabalho, avaliar a resposta da planta ao ataque da lagarta, avançando na caracterização de proteínas do látex envolvidas na defesa vegetal.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a atividade proteolítica do extrato intestinal da larva de *Danaus plexippus*;
- Verificar se as proteases do extrato intestinal da larva são capazes de degradar as proteínas do látex de *C. procera* e de outros fluidos laticíferos;
- Verificar a atividade de inibição de protease do látex sobre a atividade proteolítica das enzimas digestivas da larva;
- Avaliar, através de dietas artificiais, a toxicidade das proteínas do látex de *Calotropis procera* sobre as larvas;
- Fracionamento do látex para obtenção de sua fração protéica;

- Verificar, através de eletroforese bidimensional, se o perfil protéico do látex de *C. procera* é alterado quando folhas são atacadas pela monarca ou submetidas a danos mecânico;
- Verificar alterações nas atividades de diferentes proteínas envolvidas na defesa vegetal, tais como inibidores de proteases, proteases, quitinases e enzimas antioxidantes de plantas atacadas pela monarca ou submetidas a danos mecânicos.

III – JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm evidenciado o papel de defesa do látex contra insetos e patógenos (AGRAWAL; KONNO, 2009). Dentre estes, alguns ressaltam a importância de proteínas relacionadas à defesa, reforçando a hipótese de que o látex tem função protetora (KONNO *et al.*, 2004; AGRAWAL; KONNO, 2009). No entanto, alguns insetos conseguem sabotar esta defesa vegetal, para tanto é necessária alguma resistência ao efeito tóxico do látex (DUSSOURD, 2003).

Foi demonstrado que o látex da planta *Calotropis procera* possui proteínas com atividade inseticida contra pragas agrícolas pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (FREITAS, 2006). No entanto, a larva da monarca (*Danaus plexippus*) consome vorazmente esta planta. A monarca é uma espécie especialista em plantas laticíferas. Muitos estudos abordam sua resistência em relação à toxicidade dos cardenolídeos de fluidos laticíferos (HOLZINGER *et al.*, 1992). Entretanto, pouco se sabe sobre a resistência em relação as proteínas tóxicas do látex.

Portanto, é importante avançar no entendimento da resistência da monarca às proteínas tóxicas do látex de *C. procera* e na caracterização de proteínas relacionadas à defesa desta planta. Este estudo reforçará a hipótese de que o látex tem função protetora, avançando no entendimento de estratégias de defesa de plantas e contra-defesa de insetos para transpor tais barreiras defensivas.

IV – 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, Quitina coloidal, Persulfato de amônio, Polyvinilpyrrolidone (PVP), Piridina, Tiouréia, Uréia, Iodacetamida (IAA) e Membranas de diálise *cut off* (8 kDa) foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co., USA. Acrilamida, Ácido tricloro-acético (TCA), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), Ditioneitol (DTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. 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 ou 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 a larva da borboleta *Danaus plexippus* L., popularmente conhecida como monarca. Lagartas foram coletadas no campo alimentando-se de folhas da planta *Calotropis procera*. Foram, posteriormente, levadas ao laboratório de entomologia da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram identificadas e, a partir destas, foi estabelecida uma criação em laboratório.

4.3 Material vegetal

Três espécies vegetais pertencentes à família Apocynaceae foram escolhidas para a coleta de fluidos laticíferos: *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra*; todas localizadas na cidade de Fortaleza ou em sua região metropolitana. Tais espécies tiveram suas excisatas depositadas no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com os números (N. 32663), (N. 040409) e (N. 15018), respectivamente.

Sementes de *C. procera* também foram coletadas em campo a fim de serem cultivadas em casa de vegetação e utilizadas nos experimentos referentes à resposta da planta *C. procera* ao ataque da lagarta monarca. Para tanto, as sementes foram semeadas em tubetes contendo substrato vermiculita e, após duas semanas, transferidas para vasos de 10 litros contendo humos de minhoca e areia na proporção 1:1. Plantas com quatro meses de vida foram utilizadas neste experimento.

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).

4.5 Criação da monarca

As borboletas foram criadas em caixas de plástico com dimensões de 30 x 30 x 20cm (Figura 5) e alimentadas com uma solução de mel 10% (Figura 6A). Nestas caixas ocorreu o acasalamento e a postura dos ovos sobre folhas de *C. procera*, as quais eram trocadas diariamente (Figura 6B). 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 12cm (Figura 7). 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 (12h luz/12h escuro). Foram determinados, sob as condições estabelecidas, o tempo (em dias) e o tamanho ou peso dos animais em cada fase de

desenvolvimento da monarca. Para tanto, 10 animais foram observados a cada 24 horas, durante todo o ciclo de vida. As larvas obtidas da criação foram utilizadas como matéria-prima para os ensaios enzimáticos *in vitro* e bioensaios.

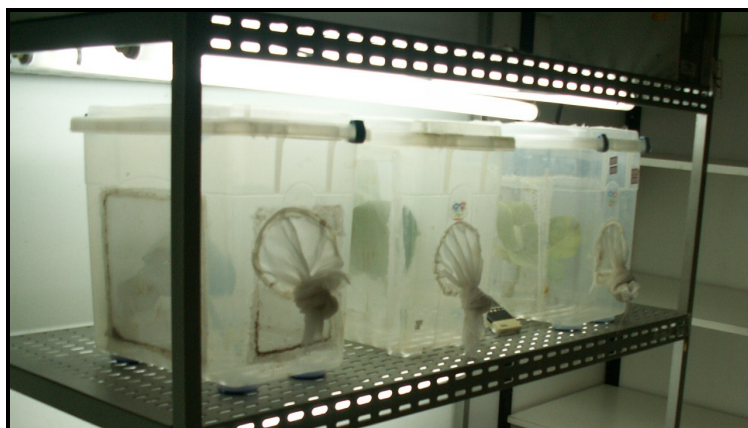


Figura 5 - Caixas de criação de borboletas.



Figura 6 - Borboletas se alimentando com solução de mel a 10% (A) e ramo de folhas de *C. procera* para ovoposição das borboletas (B).



Figura 7 - Caixa de criação das lagartas.

4.6 Caracterização bioquímica do extrato do trato digestório da monarca no 5º estágio larval

4.6.1 Extração do trato digestório

Larvas que estavam no segundo dia do 5º estágio (aproximadamente 10 dias) foram utilizadas para extração do trato digestório. Os tratos digestórios foram retirados, com auxílio de pinça, e homogeneizados em NaCl 0,15M. Todo o procedimento de retirada do trato digestório foi realizado sobre um recipiente contendo gelo. Este extrato foi centrifugado a 5.000 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em algodão, obtendo-se o homogenato do trato digestório da lagarta monarca. Esta amostra foi alvo de caracterização bioquímica.

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O homogenato do trato digestório, obtido de acordo com o item 4.6.1, 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 0,1cm. O gel de aplicação continha 5% de acrilamida e 10% de SDS em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de separação, contendo 12,5% de acrilamida e 1% de SDS, foi montado em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8. Tampão de corrida (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, contendo SDS 2 %) foi adicionado à amostra (proporção de 1:4) para posterior aplicação no gel. A eletroforese foi realizada sob amperagem constante de 40mA, voltagem inicial de 100V, a 25°C, usando-se como tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, pH 8,3, contendo glicina 0,192M 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*, preparado em uma solução de água, ácido acético e metanol, respeitando as proporções de 8:1:3,5 (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 protéicas.

4.6.3 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

O homogenato do trato digestório também foi caracterizado quanto ao seu perfil protéico por eletroforese bidimensional (2-D). Na preparação da amostra foi realizada a extração de proteínas do homogenato do trato digestório. Para tanto, 30µL do homogenato foram adicionados a 20mg de PVP e 400µL de tampão de extração (50mM piridina, 10mM

tiouréia, SDS 1%, pH 5.0). Esta mistura foi, então, centrifugada a 20.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e a este se adicionou um volume, aproximadamente quatro vezes maior, de acetona gelada contendo 10% de TCA. Esta amostra foi armazenada durante 12 horas, a 20°C, e submetida à outra centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em metanol gelado. A centrifugação e ressuspensão do precipitado ocorreram três vezes com metanol e duas vezes com acetona. Posteriormente à última ressuspensão com acetona, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a vácuo. Este foi a amostra utilizada na eletroforese bidimensional.

A solução de hidratação utilizada foi composta de: 8M uréia; 2M tiouréia, 0,5% de tampão IpG apresentando anfólitos com os gradientes de pH supracitados, 2,8% de DTT, 2,8% CHAPS e traços de azul de bromofenol.

A amostra obtida da extração de proteína foi dissolvida em solução de uréia 8M e tiouréia 2M. 87µL desta solução (aproximadamente 200µg de proteína) foram adicionados a 113µL de solução de hidratação. Esta mistura foi depositada em um dos poços do suporte *Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, onde as tiras de *Immobiline DryStrip* de 13cm, pH 4-7, foram gentilmente deitadas sobre a solução, de maneira que, o lado da tira contendo o gel ficou voltado para baixo, em íntimo 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 das tiras ocorreu durante 16 horas, à temperatura ambiente.

Após este período, foi realizada a focalização isoeétrica das proteínas. As tiras foram rapidamente imersas em água Milli-Q para retirada do excesso do *Cover Fluid*, posicionadas no aparelho focalizador *Multiphor II*, ligado a um sistema refrigerado, e submetidas às seguintes condições de corrida: 1 mA e 5 W a 200-100 V/h, 500-250 V/h, 1000-500 V/h,

2500-2500 V/h e 3500-14000 V/h, de forma não linear (em *steps*). A focalização foi realizada a uma temperatura de 18°C.

Após a etapa de focalização, as tiras foram submersas na solução de equilíbrio (Tris-HCl pH 8,8, 2% de SDS, 6M de uréia, 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, 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 180V e 25 mA, por placa, e realizada à temperatura ambiente. O tampão de corrida utilizado foi Tris 0,025M pH 8,3 contendo glicina 0,192M e SDS 0,1 %. O tempo de corrida foi em torno de 6 ou 7 horas.

Ao final do processo, os géis foram fixados durante 1 hora em etanol, ácido acético e água (4:1:5; v/v/v), sendo posteriormente 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. Após isto, os géis foram descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização dos *spots* protéicos.

4.6.4 Ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato

A atividade proteolítica total do extrato intestinal foi determinada utilizando o substrato inespecífico azocaseína, em diferentes pH. Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50mM pH 5,0; fosfato de Sódio 50mM pH 6,0; Tris-HCl 50mM pH 7, 8 e 9 . Para cada tampão utilizou-se 490µL, aos quais foram adicionados 10µL do extrato

do trato digestório da monarca diluído (1:2). Após 10 minutos, foram adicionados 200µL de azocaseína 1% e a solução foi incubada a 37°C por uma hora. A reação foi interrompida com a adição de 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. As soluções obtidas desta reação foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi alcalinizado com 500µL de NaOH 2N. A leitura no espectrofotômetro foi realizada em uma absorvância de 420nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorvância a 420nm em 0,01. Este ensaio foi realizado em triplicata (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989)

4.6.5 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 da larva, a atividade proteolítica do extrato foi avaliada na presença de ativadores e inibidores de proteases. Foram utilizados os seguintes inibidores: E-64 0,18mM e Iodoacetamida (IAA) 1mM (inibidores de proteases cisteínicas); PMSF 5mM e leupeptatina 2mM (inibidores de proteases serínicas, o último também inibidor de proteases cisteínicas); pepstatina 10mM (inibidor de proteases aspárticas) e EDTA 10mM (inibidor de metaloproteases). O ensaio foi realizado ainda com os seguintes ativadores de proteases cisteínicas na concentração de 3mM: cisteína, DTT e Beta-mercaptanol. Este ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 da mesma forma relatada no item 4.6.4. No entanto, antes do substrato ser adicionado à amostra, a mesma foi incubada por 30 minutos com 20µL de inibidor ou ativador.

4.6.6 Atividade proteolítica em diferentes faixas de temperatura

Para avaliar a estabilidade das atividades proteolíticas em função da temperatura, o extrato intestinal foi incubado sob diferentes temperaturas (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) e as atividades proteolíticas dos sobrenadantes foram mensuradas utilizando azocaseína como substrato, seguindo a metodologia do item 4.6.4. Este ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5.

4.6.7 Ensaio de atividade proteolítica utilizando BANA como substrato

A atividade proteolítica também foi avaliada em diferentes pH utilizando como substrato N-benzoil-arginina-naftitilamida (BANA). Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50 mM pH 5,0; fosfato de Sódio 50mM pH 6,0; Tris-HCl 50mM pH 7, 8 e 9. Utilizou-se 490µL de cada tampão, aos quais foram adicionados 10µL do extrato do trato digestório da monarca diluído (1:2). Após 10 minutos, foram adicionados 200µL de BANA 1mM. As soluções foram, então, incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 500µL de uma solução de HCl 2% em etanol e 500µL de 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA) 0,06% em etanol. Após 40 minutos, os resultados colorimétricos foram mensurados por absorvância a 540nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorvância a 540nm em 0,01. Todos os ensaios ocorreram em triplicata (ABE *et al.*, 1992).

4.6.8 Ensaio de atividade proteolítica utilizando BApNA como substrato

A atividade proteolítica também foi avaliada em diferentes pH utilizando como substrato α -benzoi-DL-arginina- p -nitroanilida (BApNA). Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 50mM pH 5,0; fosfato de Sódio 50mM pH 6,0; Tris-HCl 50mM pH 7, 8 e 9. Utilizou-se 490 μ L de cada tampão, aos quais foram adicionados 10 μ L do extrato do trato digestório da monarca diluído (1:2). Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de uma solução de BApNA e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com o acréscimo de 120 μ L de ácido acético 30%. Os resultados colorimétricos foram mensurados por absorvância a 405nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementou a absorvância a 405nm em 0,01. Todos os ensaios ocorreram em triplicata (GOMES *et al.*, 2005).

4.6.9 Zimograma para detecção de atividade proteolítica

O perfil de proteases do extrato intestinal da monarca foi analisado por meio de zimograma. Para tanto, o gel foi preparado nas mesmas condições descritas para eletroforese (item 4.6.2), todavia, o gel de separação continha gelatina 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada em 2,5 horas, sob amperagem constante de 20mA por gel, voltagem de 100 V, a 25°C, usando-se como tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, pH 8,3, contendo glicina 0,192M e SDS 0,1%. Após o término deste passo, 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 tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5. Os géis foram corados com solução de 0,2% de *Coomassie Brillhante Blue R-250*.

4.7 Inibição de proteases do homogenato do trato digestório da monarca pela fração PL de *C. procera* aquecida

Foi avaliado se a fração PL de *C. procera* possui inibidores de proteases capazes de inibir a atividade proteolítica do extrato intestinal da monarca (obtido como descrito no item 4.6.1). Para tanto, foi realizado um procedimento para eliminar a atividade proteolítica da fração PL. Neste procedimento, uma solução de PL com concentração de 5mg/mL foi aquecida a 100°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi centrifugada (10.000 x g, 10 minutos) e o sobrenadante liofilizado, obtendo-se a fração denominada PLaq (PL aquecido). Foram realizados ensaios de inibição da atividade proteolítica utilizando os substratos BANA e BApNA, de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.6.7 e 4.6.8, todavia, foram adicionados 250µL de PLaq (10mg/mL) 30 minutos antes da adição do substrato.

Para verificar a inibição da atividade proteolítica do extrato intestinal da larva pela fração PLaq, também foi realizado um zimograma seguindo a metodologia do item 4.6.9. Para tanto, 50µL de uma solução diluída (1:2) do extrato intestinal foram incubados com 250µL de PLaq (10 mg/mL) e 200µL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5 por 30 min. Também foi incubada uma amostra contendo apenas extrato intestinal (50µL de uma solução diluída 1:2) e 450µL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5. Estas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 1% de gelatina (zimograma). Foram aplicados 10, 20 e 30µL de cada amostra, correspondendo a 2, 4 e 6 µg de proteínas do extrato da lagarta e 4, 8 e 12 µg de proteína do PLaq.

4.8 Ensaio de digestibilidade das proteínas do látex de *Calotropis procera*, *Plumeria rubra* e *Cryptostegia grandiflora* frente às enzimas digestivas da larva monarca

As frações protéicas de *C. procera*, *P. rubra* e *Cryptostegia grandiflora* foram submetidas a ensaio de digestibilidade pelas enzimas digestivas da monarca no 5º estágio larval de desenvolvimento de acordo com RAMOS *et al.* (2007). As frações PL dos fluidos laticíferos das três espécies utilizadas neste experimento foram obtidas de acordo com o descrito no item 4.4. Cada fração PL foi dissolvida em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 e incubada com extrato do trato digestório da monarca a 37°C. As quantidades adicionadas da solução de PL e do extrato do trato digestório foram determinadas de forma que a quantidade de proteína de ambos fosse equivalente. A quantidade de proteína das amostras foi determinada através do método de BRADFORD (1976). As frações PL foram incubadas separadamente, sob as mesmas condições, a fim de demonstrar que não houve autodegradação das mesmas no decorrer do tempo. Foram retiradas alíquotas de todas as amostras no início do experimento (tempo zero) e após 4, 8 e 24 horas de incubação. 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 poliácridamida. Este procedimento foi adotado com o intuito de comparar o perfil protéico das frações PL na presença e ausência do extrato do trato digestório da monarca, verificando se houve digestão das proteínas do látex pelas enzimas digestivas do trato digestório das lagartas. Para confirmar se a extração das enzimas digestivas do extrato do trato digestório e o seu armazenamento foram adequados, o extrato foi incubado com BSA (albumina sérica bovina), seguindo os mesmo procedimentos citados acima.

4.9 Bioensaios com a lagarta Monarca (*Danaus plexippus*)

4.9.1 Desenvolvimento da dieta artificial

A dieta artificial foi adaptada do trabalho de GLASS e AN (1983), o qual desenvolveu uma dieta para a fase larval da monarca que continha o pó da folha de plantas laticíferas (*Aesclepias syriaca*, *A. incaenata* ou *A. currassavica*) como fagoestimulante. A principal adaptação foi a utilização do pó da folha de *Calotropis procera*. Folhas frescas foram coletadas de plantas saudáveis, lavadas e cortadas em tiras de aproximadamente 5cm. Estas tiras foram novamente lavadas com água para a retirada de todo o látex exsudado. As folhas foram enxutas, liofilizadas e trituradas para a preparação do 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. Por fim, a dieta foi colocada nos recipientes e esperou-se a solidificação. A mistura de vitaminas utilizada na dieta encontra-se na Tabela 2.

Foi realizado o acompanhamento de larvas alimentadas com a dieta artificial em comparação a larvas alimentadas com folhas de *C. procera*. Foram observadas características como tamanho da larva e tempo em cada estágio. Para tanto, 10 animais foram observados a cada 24 horas. A alimentação foi trocada diariamente.

Tabela 1: Ingredientes utilizados na dieta artificial.

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	0.07
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

Tabela 2: Composição da mistura de vitaminas utilizada na dieta artificial.

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 Bioensaio com monarca alimentada com dieta artificial contendo a fração PL de *Calotropis procera*

As larvas foram alimentadas com dieta controle (sem a adição de PL) desde o primeiro dia de vida. A partir do segundo dia do 5º estágio foram submetidas por três dias à alimentação com dieta artificial, na qual um percentual da fonte protéica (caseína) foi substituído pela fração PL do látex de *C. procera*. Alíquotas de 100µL de uma solução de PL em água foram adicionadas a blocos de dieta de aproximadamente 1g, os quais passaram a conter 1% e 5% de PL. Para tanto, os blocos de dieta foram preparados contendo 1% e 5% a menos de caseína, respectivamente.

Durante este experimento foram determinados o peso e a mortalidade das larvas. O controle consistiu de larvas alimentadas com dieta base (sem fração PL) durante toda fase larval. Cada grupo experimental constou de 10 larvas. A dieta artificial foi trocada diariamente.

4.10 Resposta da planta *C. procera* ao ataque da lagarta monarca

Foram desenvolvidos experimentos para avaliar os efeitos da herbivoria da larva monarca sobre plantas de *C. procera*. Para tanto, foram plantadas 45 mudas de *C. procera*, as quais foram mantidas em casa de vegetação por quatro meses. Após este período, um grupo de plantas foi submetido ao ataque de lagartas por três dias, onde cada planta continha três lagartas no quinto estágio de desenvolvimento. Outro grupo de plantas foi submetido a danos mecânicos (corte de aproximadamente 5cm em cada folha), nos quais as plantas foram danificadas uma vez por dia, durante três dias. O látex foi coletado no terceiro dia e processado para a obtenção da fração PL de acordo com o item 4.4. O grupo controle foi constituído por plantas sadias sem nenhum tipo de dano. Para cada tratamento e controle, o látex foi coletado em triplicata, onde cada replicata correspondeu ao látex obtido de cinco plantas.

4.10.1 Atividade proteolítica

As frações PL obtidas de plantas atacadas pela monarca, plantas submetidas a dano mecânico e plantas controle foram avaliadas quanto à atividade proteolítica utilizando os substratos azocaseína e BANA. Estes ensaios foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.6.7 e 4.6.8, respectivamente. A atividade proteolítica foi

avaliada em tampão acetato de Sódio 50mM pH 6,0 e foram utilizadas 30 μ L de uma solução de PL a 1mg/mL.

4.10.2 Atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica das frações PL obtidas de plantas controle e plantas submetidas aos tratamentos foi avaliada segundo o método descrito por BOLLER (1993). Neste ensaio há a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica da enzima sobre a quitina coloidal. Para tanto, 250 μ L de soluções das frações PL (1 mg/mL em tampão acetato de sódio 50mM pH 6,0) foram incubados com 250 μ L de quitina coloidal (10 mg/mL) a 37°C, por 60 minutos. A reação enzimática foi interrompida através de fervura em banho-maria por 5 minutos. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, 25°C, por 20 minutos. A 300 μ L do sobrenadante foram adicionados 10 μ L de uma solução de enzima glucoronidase, sendo feita incubação a 37°C por 60 minutos. Após este período, a reação foi interrompida por fervura em banho-maria por 10 minutos. Então, foram adicionados 190 μ L de tampão acetato de sódio 50mM pH 6,0 e 100 μ L de tetraborato de sódio e potássio 0,6M. Esta mistura reacional foi fervida em banho-maria por 5 minutos. Após resfriamento, 1mL de ρ -dimetilaminobenzaldeído (DMAB) foi adicionado a mistura reacional, sendo esta incubada em banho-maria a 37°C por 20 minutos. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 585nm.

O cálculo da quantidade de NAG liberado na reação foi feito a partir de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de NAG, variando de 10 a 500 μ M. A atividade quitinásica foi expressa em nanokatal (nKat) por mg de proteína, onde 1 nKat corresponde a liberação de 1 μ M de NAG por mililitro por minuto.

A quitina coloidal utilizada como substrato para determinação da atividade quitinolítica foi preparada a partir de quitosana, segundo a metodologia descrita por BOLLER (1992), com algumas modificações. A solução de glucuronidase usada no ensaio foi diluída dez vezes em água grau MilliQ a partir do preparado bruto de *Helix pomatia* (Sigma Chemical Co-Type HP – 2.132.000 unidades/mL) e dialisada exaustivamente contra água Milli-Q, sendo armazenada em freezer (-20°C). A solução de DMAB foi preparada pela dissolução de 10g de DMAB em 100mL de ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico.

4.10.3 Detecção quantitativa de enzimas antioxidantes

Na preparação das amostras para os ensaios de enzimas antioxidantes, as frações PL (2mg/mL) provenientes de plantas controle e submetidas aos tratamentos foram dissolvidas em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0 contendo EDTA 0,1mM. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, a 5°C. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de enzimas antioxidantes. A quantidade de proteínas solúveis foi estimada pelo método de BRADFORD (1976).

4.10.3.1 Peroxidase do ascorbato

A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) foi avaliada nas frações PL através do método espectrofotométrico no qual a enzima APX catalisa a reação em que o H₂O₂ é degradado (NAKANO; ASADA, 1981). A solução reacional conteve 1.100µL de tampão fosfato 50mM pH 6,0 (contendo EDTA 0,05mM), 300µL da amostra, 50µL da solução de peróxido de hidrogênio 30mM e 50µL de ácido ascórbico 15mM. A leitura das absorbâncias foi medida a 290nm. A atividade da enzima foi mensurada utilizando o

coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ P}$ (P: proteína solúvel).

4.10.3.2 Peroxidase do guaiacol

A atividade da enzima peroxidase do guaiacol (GPX) foi avaliada nas frações PL através de adaptação do método espectrofotométrico descrito por COSTA *et al.*, (2005), no qual a enzima GPX catalisa a reação em que o H_2O_2 é degradado. A solução reacional conteve $500\mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,0 (contendo EDTA $0,1\text{mM}$), $500\mu\text{L}$ do extrato enzimático, $500\mu\text{L}$ de guaiacol 20mM e $500\mu\text{L}$ de H_2O_2 60mM . A leitura das absorbâncias foi medida a 470nm . A atividade da enzima foi mensurada utilizando o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gP}^{-1}$ (gP: grama de proteína solúvel).

4.10.3.2 Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada nas frações PL através de método espectrofotométrico, fundamentado na capacidade da enzima catalisar a reação de degradação do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso (BEERS; SIZER, 1952). A mistura reacional conteve $850\mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,0 (contendo EDTA $0,1\text{mM}$), adicionados de $500\mu\text{L}$ da amostra e $60\mu\text{L}$ de solução de peróxido de hidrogênio 500mM . A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático, a redução de H_2O_2 foi monitorada a 240nm e quantificada pelo coeficiente de extinção molar ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ gP}^{-1}$ (gP: grama de proteína solúvel).

4.10.3.3 Superóxido dismutase

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi determinada mensurando sua habilidade em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium clorídrico (NBT). A mistura reacional conteve 750 μ L de tampão fosfato 50mM pH 7,8 (contendo EDTA 0,1mM e metionina 19,5mM), 300 μ L do extrato enzimático, 150 μ L de solução de NBT 750 μ M e 300 μ L de riboflavina 10 μ M. As amostras foram transferidas para uma caixa iluminada por uma lâmpada fluorescente de 20W, durante 15 minutos. Após este período, a luz foi desligada e os tubos cobertos com uma capa escura. A leitura da absorbância foi feita a 560nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima para causar uma redução de 50% na taxa fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em U gP⁻¹ (gP: grama de proteína solúvel).

4.10.4 Eletroforese bidimensional

As frações PL obtidas de plantas controle e plantas submetidas aos tratamentos foram avaliadas quanto ao perfil protéico em eletroforese bidimensional. Para tanto foi realizada a extração de proteínas das amostras de acordo com o item 4.6.3, sendo que na extração foram utilizados 10 mg de fração PL.

Na realização da primeira dimensão, foram utilizadas tiras de gel linear *Immobiline DryStrip* (13cm), pH 4-7. Os procedimentos para a realização da primeira e segunda dimensões estão descrito no item 4.6.3. Foram aplicados 200 μ g de proteína de cada amostra. Os géis foram analisados pelo programa ImageMaster 6.0. Os parâmetros utilizados na análise dos géis foram “smooth” (4), área mínima (12) e saliência (35).

4.11 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. Ciclo de vida da monarca


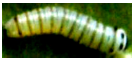





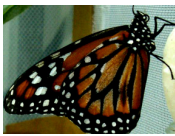
Para uma maior padronização dos experimentos com a monarca (*Danaus plexippus*), estas foram criadas sob condições controladas em laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60-70% umidade relativa e fotoperíodo de 12/12 h).

O ciclo de vida da monarca nas condições estabelecidas está descrito na Tabela 3, o qual foi concluído em um tempo médio de aproximadamente 37 dias. A fase larval durou em média 11,8 dias, cada estágio durando aproximadamente 2 dias, com exceção do quinto estágio que durou em média 4 dias. Este estágio foi também caracterizado pelo maior ganho de tamanho pelas larvas. Os experimentos subsequentes foram realizados com larvas do quinto estágio, aproximadamente 10 dias de vida.

5.2. Caracterização bioquímica do trato digestório de larvas da monarca do 5º estágio

Como as larvas da monarca foram alimentadas com folhas frescas de *C. procera* e estas continham látex, os primeiros ensaios foram realizados com o objetivo de verificar se os extratos intestinais obtidos estavam livres das proteínas e conseqüentemente das proteases do látex. Para isso foram obtidos extratos intestinais de larvas recém alimentadas com as folhas, após jejum de 24 h e de larvas alimentadas com dieta artificial sem as proteínas do látex.

Tabela 3: Ciclo de vida da monarca criada em condições de laboratório.

Fase	Foto	Tamanho (mm)	Tempo por estágio (dias)	Tempo Total (dias)
Ovo		ND*	2.2 ± 1.1	2.2 ± 1.1
Larvas (Estágio)	1° 	4.0 ± 0.7	2.2 ± 0.7	4.4 ± 1.8
	2° 	6.0 ± 1.0	2.1 ± 0.5	6.5 ± 2.3
	3° 	12.0 ± 3.0	1.8 ± 0.4	8.3 ± 2.7
	4° 	18.0 ± 4.0	1.6 ± 0.5	9.9 ± 3.2
	5° 	33.0 ± 7.0	4.1 ± 0.5	14.0 ± 3.7
Casulo		Peso (g) 1.2 ± 0.1	7.4 ± 0.5	21.4 ± 4.2
Borboleta		ND*	15.3 ± 2.9	36.7 ± 7.1

Na determinação do ciclo de vida da monarca, as larvas foram alimentadas com folhas frescas de *Calotropis procera* e os adultos com uma solução de mel a 10%. Os valores representam a média de 10 animais com seus respectivos desvios padrões. *ND = Não determinado.

Através da eletroforese unidimensional, é possível sugerir que os três extratos intestinais obtidos foram livres de proteínas do látex de *C. procera* e que apresentaram, essencialmente, o mesmo perfil protéico (Figura 8). O zimograma mostrou que os extratos intestinais obtidos estavam livres das proteases do látex de *C. procera*, já que neste predominaram bandas com atividades proteolíticas com massas moleculares na faixa de 25-66 kDa, diferentes das bandas com atividade proteolítica obtidas nos extratos intestinais.

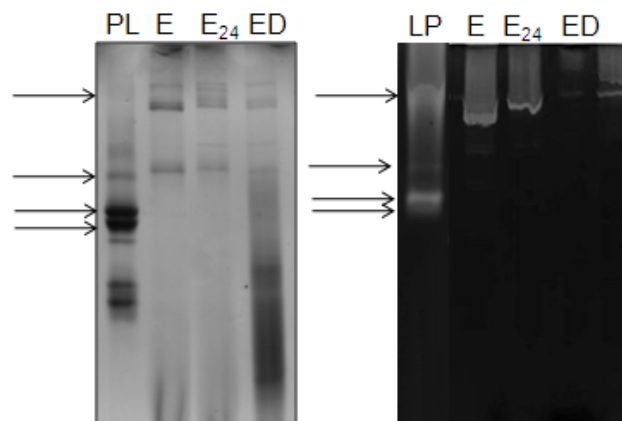


Figura 8: Eletroforese e zimograma das proteínas do látex de *C. procera* e de extratos intestinais de larvas da monarca no 5° estágio. PL: fração protéica do látex de *C. procera*; E, E₂₄ e ED: extrato intestinal de larvas alimentadas com folha frescas de *C. procera*, submetidas a jejum de 24 h ou alimentadas com dieta artificial sem as proteínas do látex, respectivamente. Na eletroforese foram adicionados 16 µg de proteínas e no zimograma 20 ng, exceto para ED do qual foram adicionados 20 e 60 ng. As setas referem-se às bandas protéicas do látex de *C. procera* com atividade proteolítica.

Apesar do perfil protéico não ter sofrido alterações, os três extratos intestinais diferiram na intensidade da atividade proteolítica (Tabela 4). A atividade proteolítica dos extratos intestinais de larvas recém alimentadas com folhas de *C. procera* foi maior que dos extratos obtidos de larvas em jejum e de larvas alimentadas com dieta artificial, independente do substrato utilizado. Em vista destes resultados, o extrato intestinal de larvas sem jejum foi escolhido para posterior caracterização da atividade proteolítica.

Tabela 4: Atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas recém alimentadas com folhas de *C. procera*, em jejum de 24 h e alimentadas com dieta artificial sem as proteínas do látex.

Extrato	Atividade Proteolítica (UA/μg de Proteína)		
	Substrato		
	Azocaseína	BANA	BApNA
E	0,95 \pm 0,26	0,74 \pm 0,08	10,60 \pm 0,16
E ₂₄	0,27 \pm 0,10	0,49 \pm 0,02	16,59 \pm 1,36
ED	0,07 \pm 0,01	0,0 \pm 0,0	0,54 \pm 0,04

E, E₂₄ e ED: extrato intestinal de larvas recém alimentadas com folha frescas de *C. procera*, submetidas a jejum de 24 h ou alimentadas com dieta artificial sem as proteínas do látex, respectivamente. As atividades proteolíticas foram realizadas em pH 7.5. Os ensaios foram realizados em triplicata, os valores referem-se às médias \pm desvio padrão.

Na eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram observadas proteínas com massas moleculares de 30-90 kDa no extrato intestinal, sendo que prevaleceram as proteínas com massas de 70 kDa (Figura 9A). O zimograma revelou a presença de pelo menos quatro proteases, sendo que a banda protéica com maior atividade proteolítica apresentou massa molecular aparente de, aproximadamente, 70 kDa (Figura 9B).

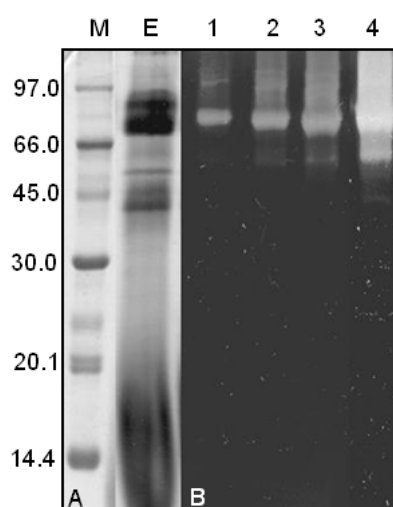


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5% (A) e zimograma para proteases (B) do extrato intestinal de larvas do 5º estágio da monarca alimentadas com folhas de *C. procera*. Legenda: M, marcador de massa molecular (GE Helthcare); E, extrato intestinal das larvas recém alimentadas com folhas de *C. procera* (30 µg de proteína); 1-4, extrato intestinal das larvas (E) em diferentes concentrações (20, 40, 80 e 100 ng de proteína, respectivamente).

Proteases presentes no trato intestinal foram capazes de degradar os três substratos testados (azocaseína, BANA e BApNA) com ótimo de atividade em pH 10.0 (Figura 10). A hidrólise dos substratos BANA e BApNA apresenta fortes indícios da predominância de

proteases do tipo serínicas, pois ambos os substratos são específicos para este tipo de proteases. A atividade ótima em pH alcalino também fortalece a hipótese da presença destas proteases. A atividade proteolítica foi fortemente dependente da temperatura (Figura 10). Quando o extrato foi aquecido a 45 °C por 15 min, a atividade proteolítica foi perdida em 25 %. A partir de 60 °C, toda a atividade foi anulada.

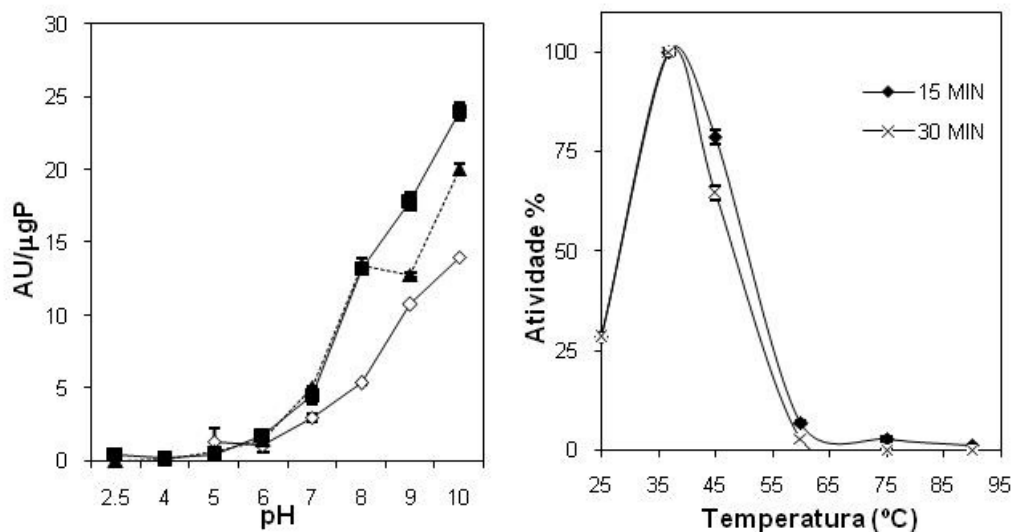


Figura 10: Efeito do pH e temperatura sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas da monarca no 5º estágio. Substratos utilizados: (■) BApNA, (▲) BANA e (○) azocaseína. O ensaio de termoestabilidade das proteases foi realizado em pH 7.5 utilizando azocaseína 1% como substrato. Os valores representam a média de três repetições com seus respectivos desvios padrões.

A atividade proteolítica foi avaliada também na presença de ativadores de proteases cisteínicas (DTT, β-mercaptoetanol e L-cisteína) e de diferentes inibidores de proteases (Figura 11). Na presença dos ativadores, a atividade proteolítica não aumentou. Dando fortes indícios da ausência de proteases cisteínicas. Contudo, E-64 e Iodoacetamida (IAA), dois inibidores de proteases cisteínicas, foram capazes de diminuir a atividade em 34% e 26%,

respectivamente. EDTA, inibidor de metaloprotease, e pepstatina A, um inibidor de proteases aspárticas, não foram capazes de inibir a atividade proteolítica. PMSF e leupeptina, inibidores para proteases serínicas, inibiram a atividade proteolítica em 44% e 50%, respectivamente. Esses resultados mostram que proteases serínicas são as principais responsáveis pela digestão de proteínas presentes na dieta da monarca. Contudo, a presença de proteases cisteínicas não pode ser descartada.

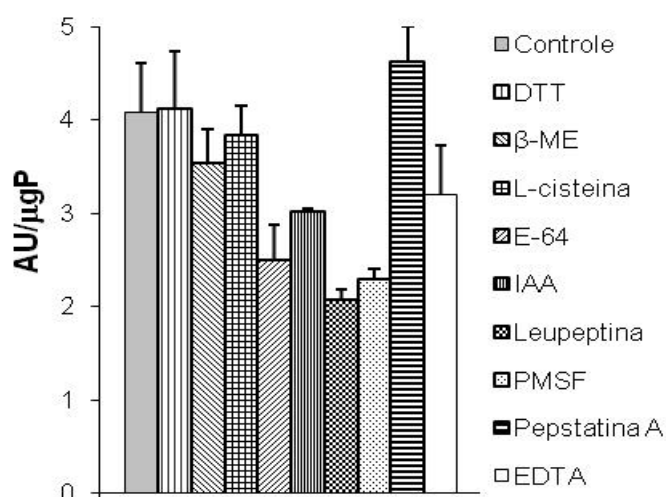


Figura 11: Efeitos de ativadores e inibidores na atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas da monarca no 5° estágio utilizando azocaseína 1% como substrato em pH 7,5.

5.3 Inibição das proteases intestinais da monarca pela fração do látex de *C. procera* rica em inibidor de protease.

Foi verificado se as proteases intestinais das larvas são inibidas pelo inibidor de protease presente no látex de *C. procera*. Para isto, a fração protéica do látex foi

primeiramente aquecida por 30 min a 100 °C para eliminar toda a atividade proteolítica. A fração solúvel após aquecimento foi denominada de PLaq, descrita como rica em inibidor de protease. A atividade proteolítica do trato digestório foi inibida pela fração PLaq em 58 e 79% utilizando BANA e BApNA como substratos, respectivamente. Também foi avaliada a capacidade da fração PLaq em inibir a atividade de proteases purificadas. As atividades proteolíticas da papaína, uma protease cisteínica, e da tripsina, protease serínica, foram inibidas em 87 e 29 %, respectivamente.

O efeito da fração PLaq sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal das larvas foi avaliado também por zimograma. Para isto, o extrato digestório (2, 4 e 6 µg) foi incubado por 30 minutos com a fração PLaq (4, 8 e 12 µg). Como pode ser observado na Figura 12, uma protease com massa molecular de aproximadamente 30 kDa do extrato intestinal da larva foi inibida pela fração PLaq.

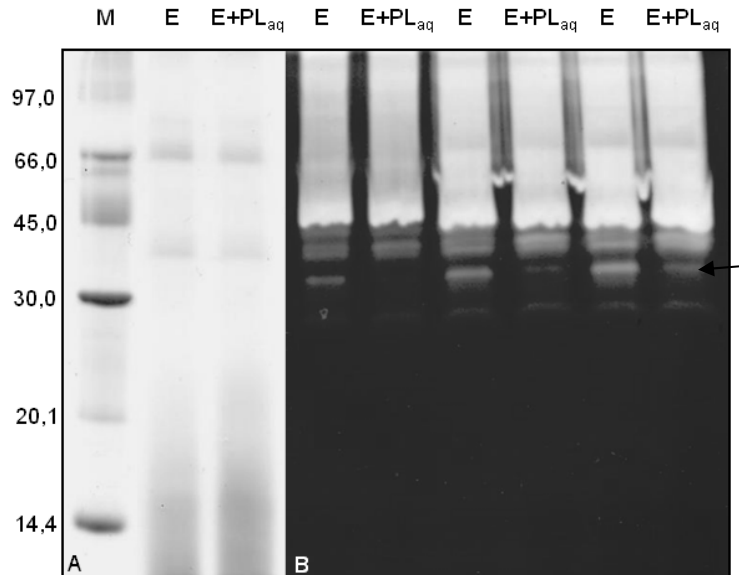


Figura 12: Eletroforese (A) e zimograma (B) para detecção de atividade proteolítica do extrato intestinal da larva monarca no 5^o estágio inibido pela fração PL_{aq} de *C. procera*. E: extrato do trato digestório da monarca no 5^o estágio; PL_{aq}: fração solúvel do PL de *C. procera* aquecido por 30 minutos a 100 °C. O extrato foi incubado por 30 minutos com a fração PL_{aq} e posteriormente submetida ao zimograma. Na eletroforese foram aplicadas 6 e 12 µg de proteínas de E e PL_{aq}, respectivamente. No zimograma foram aplicados 2, 4 e 6 µg de proteínas de E e 4, 8 e 12 µg de PL_{aq}, respectivamente.

5.4 Ensaio de digestibilidade das proteínas do látex de *Calotropis procera*, *Plumeria rubra* e *Cryptostegia grandiflora* frente às proteases intestinais da larva monarca

Um ensaio de digestão *in vitro* foi realizado para verificar se as frações protéicas do látex de três espécies são digeridas pelas enzimas digestivas da monarca. A digestão das proteínas foi verificada através de eletroforese (Figura 13). No grupo controle foi verificado que as enzimas digestivas da larva foram aptas para digerir a BSA desde o tempo zero. Isto demonstra que o extrato do trato digestório possuía capacidade de digestão, evidenciando que os processos de obtenção e armazenamento do extrato foram adequados. A fração PL de *C. procera* foi totalmente digerida pelas enzimas da larva, sendo que a digestão começou já no tempo zero (poucos minutos). Contudo, as proteases da larva foram capazes de digerir apenas fracamente a fração PL de *P. rubra*, sendo visualizada a digestão de uma única banda de 14,4 kDa. De maneira semelhante, não foi observada digestão das proteínas do látex de *C. grandiflora*, com exceção de uma banda protéica com massa molecular menor que 14,4 kDa.

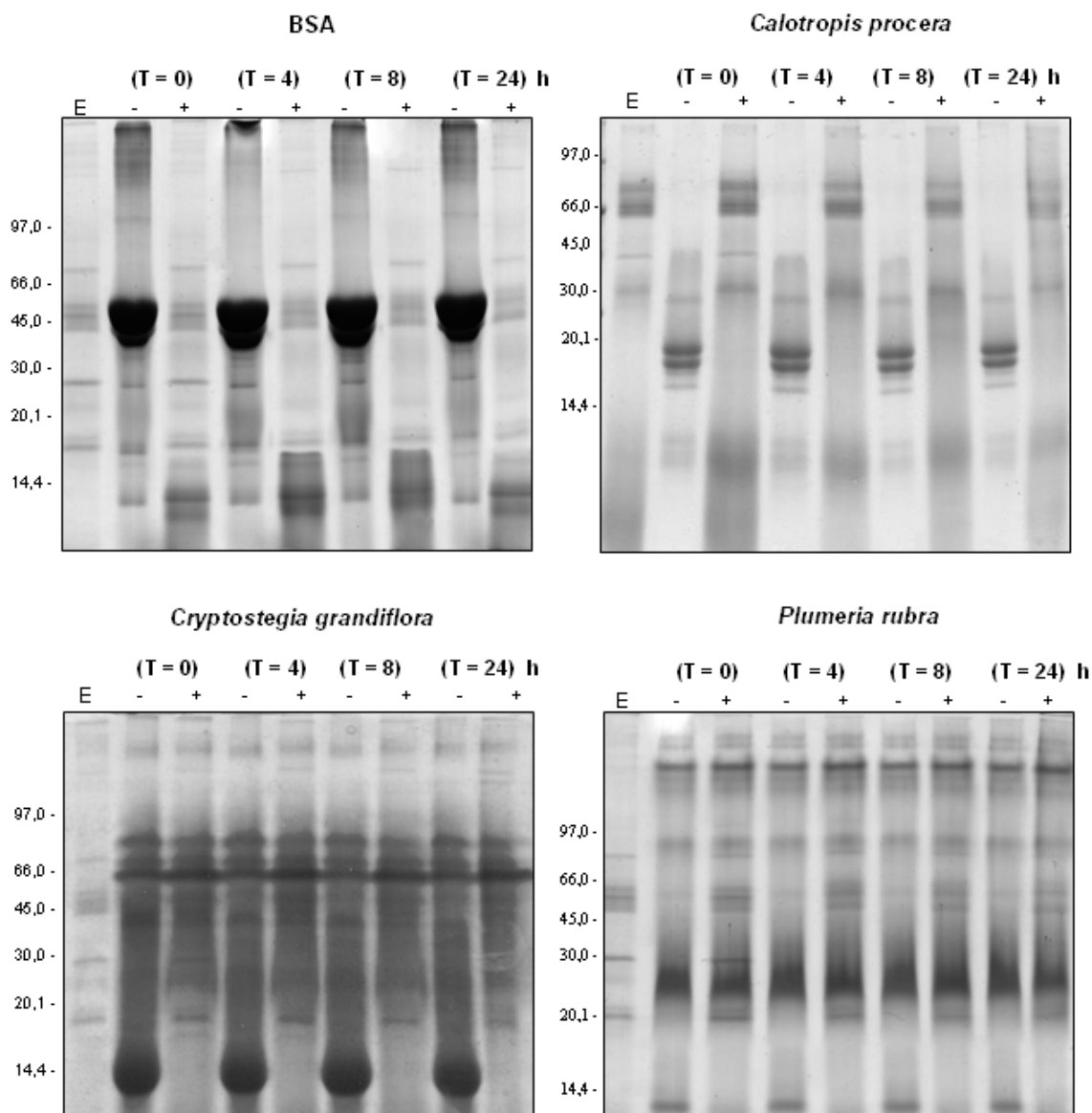


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das proteínas do homogenato intestinal de *Danaus plexippus* no 5º estágio larval quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com albumina sérica bovina, proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera*, *Plumeria rubra* e *Cryptostegia grandiflora*. Legenda: extrato da homogenato intestinal (E); fração PL (-); facção PL + E (+); albumina sérica bovina (BSA). Para E, frações PL das três espécies e BSA foram aplicadas 30 µg de proteínas.

5.5 Proteínas do látex de *C. procera* resistentes à digestão da larva monarca.

O extrato intestinal da lagarta foi avaliado por eletroforese bidimensional (Figura 14 A). A maior parte das proteínas apresentou massas moleculares aparentes abaixo de 66,0 kDa. Comparando a eletroforese bidimensional da fração PL de *C. procera* (Figura 14B), foi observado que o extrato intestinal possui algumas proteínas em comum com látex (ressaltado na figura pelo quadrado). Este resultado é uma evidência de que algumas proteínas do látex são resistentes a proteólise por enzimas digestivas da larva.

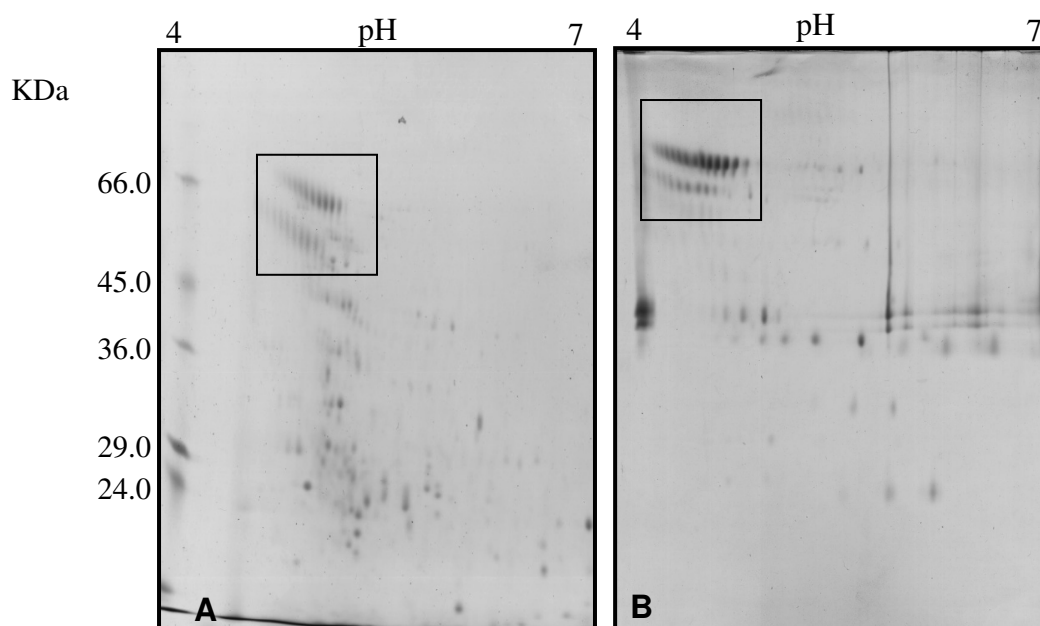


Figura 14: Eletroforese bidimensional do homogenato intestinal da lagarta monarca no 5º estágio (A) e da fração PL de *C. procera* (B). As lagartas foram alimentadas durante a fase larval com folhas de *C. procera*. Foram aplicados 200 µg de proteína, as quais foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*.

5.6 Bioensaios com a larva da monarca (*Danaus plexippus*)

Para verificar o efeito da fração protéica do látex de *C. procera* sobre o desenvolvimento da larva monarca, foram realizados bioensaios nos quais a fração PL foi adicionada à dieta artificial ofertada às larvas. Com o intuito de verificar a adaptação da larva à dieta artificial foi realizada uma comparação entre larvas alimentadas com folhas de *C. procera* e com a dieta artificial (Tabela 5). As larvas alimentadas com dieta artificial chegaram ao quinto estágio após 20 dias de ensaio. Enquanto as larvas alimentadas com folhas demoraram aproximadamente 12 dias. Além do tempo maior, as larvas alimentadas com a dieta artificial foram menores no 1° e 4° estágios. Não foi observada diferença entre os pesos dos casulos. Embora o tempo do estágio larval tenha sido maior para larvas alimentadas com dieta artificial, as mesmas conseguiram se desenvolver gerando borboletas férteis. Desta forma, a dieta artificial foi considerada adequada para a realização dos bioensaios.

Depois de estabelecida a dieta artificial, foi realizado um ensaio no qual uma parte da principal fonte protéica da dieta (caseína) foi substituída pela fração PL de *C. procera*, resultando em 1 e 5% de PL na dieta. Foi observado que quanto maior a concentração de PL na dieta, mais rapidamente as larvas aumentavam de peso (Figura 15). Esta constatação tornou-se ainda mais evidente no último dia de tratamento, no qual houve diferença estatística entre os tratamentos e entre estes e o controle. O peso das larvas alimentadas com dieta artificial contendo 5% PL foi aproximadamente o dobro do peso das larvas alimentadas com dieta controle. Não foi observada mortalidade durante o experimento.

Tabela 5: Desenvolvimento da monarca quando alimentada com folhas de *C. procerca* e dieta artificial

Fase	Folha			Dieta artificial		
	Tamanho (mm)	Tempo / estágio (dias)	Tempo Total (dias)	Tamanho (mm)	Tempo / estágio (dias)	Tempo Total (dias)
Larvas	1º	4,0 ± 0,7*	2,2 ± 0,7	3,0 ± 0,7*	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	2º	6,0 ± 1,0	2,1 ± 0,5	6,0 ± 1,5	3,4 ± 0,5	6,4 ± 0,5
	3º	12,0 ± 3,0*	1,8 ± 0,4*	6,1 ± 1,6	3,9 ± 0,4*	10,3 ± 0,9
	4º	18,0 ± 4,0	1,6 ± 0,5*	7,7 ± 2,1	4,0 ± 0,6*	14,3 ± 1,5
	5º	33,0 ± 7,0	4,1 ± 0,5*	11,8 ± 2,6	6,0 ± 0,7*	20,3 ± 2,2
Casulo	Peso (g)			Peso (g)		
	1,2 ± 0,1	7,4 ± 0,5	19,2 ± 3,2	1,0 ± 0,1	7,8 ± 0,8	21,1 ± 3,0

No experimento 10 animais foram observados a cada 24 horas durante todo o ciclo de vida. Os valores representam a média ± DP. * denota diferença significativa ($p < 0,05$) (ANOVA – teste de Dunnett).

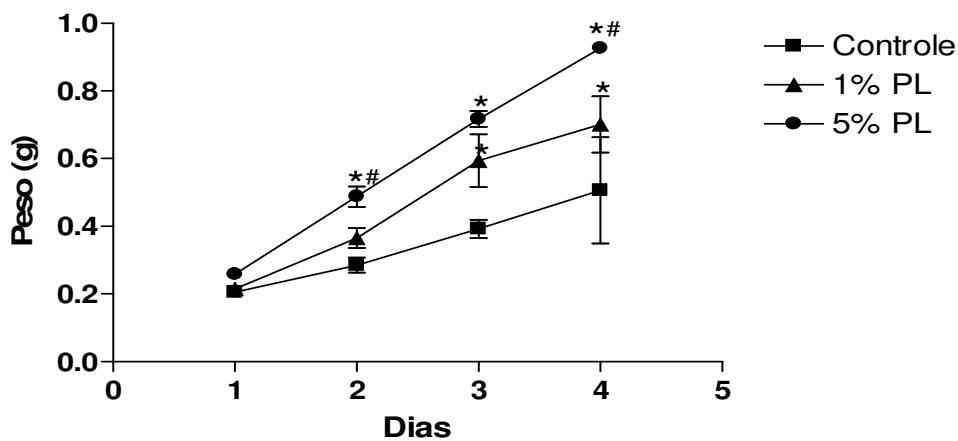


Figura 15: Efeito da fração PL de *C. procera* sobre o desenvolvimento da larva monarca. Durante o experimento 10 animais foram observados a cada 24 horas durante. Os valores representam a média \pm DP. * denota diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos e controle (ANOVA – teste de Dunnett); # denota diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (ANOVA – teste de Tukey).

5.7 Resposta da planta *C. procera* ao ataque da lagarta monarca

Com o intuito de avaliar a resposta de *C. procera* ao ataque da larva, foi realizado um experimento no qual as frações PL de plantas atacadas pela monarca ou submetidas a dano mecânico foram comparadas ao PL de plantas saudáveis (controle). Para tanto foram realizados vários ensaios bioquímicos, como eletroforese bidimensional, atividade proteolítica, atividade de inibição de protease cisteínica e atividade de enzimas antioxidantes (APX, SOD, CAT e GPX).

As frações PL de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a danos mecânicos foram analisadas através de eletroforese bidimensional utilizando tiras com intervalo de pH de 4-7 (Figura 16). Foi verificado que os spots 1 a 13, 14 a 24 e 25 da fração PL de plantas atacadas pela monarca apresentaram maior volume relativo, aproximadamente o dobro em relação ao controle, bem como maior intensidade relativa, mais do que o triplo do controle (Tabela 6). Enquanto que os spots correspondentes na fração PL de plantas submetidas a danos mecânicos (1 a 11, 12 a 17 e 18) apresentaram valores menores, mas mais próximos dos valores do controle, volume e intensidade relativos foram aproximadamente a metade dos valores detectados nos spots de plantas controle.

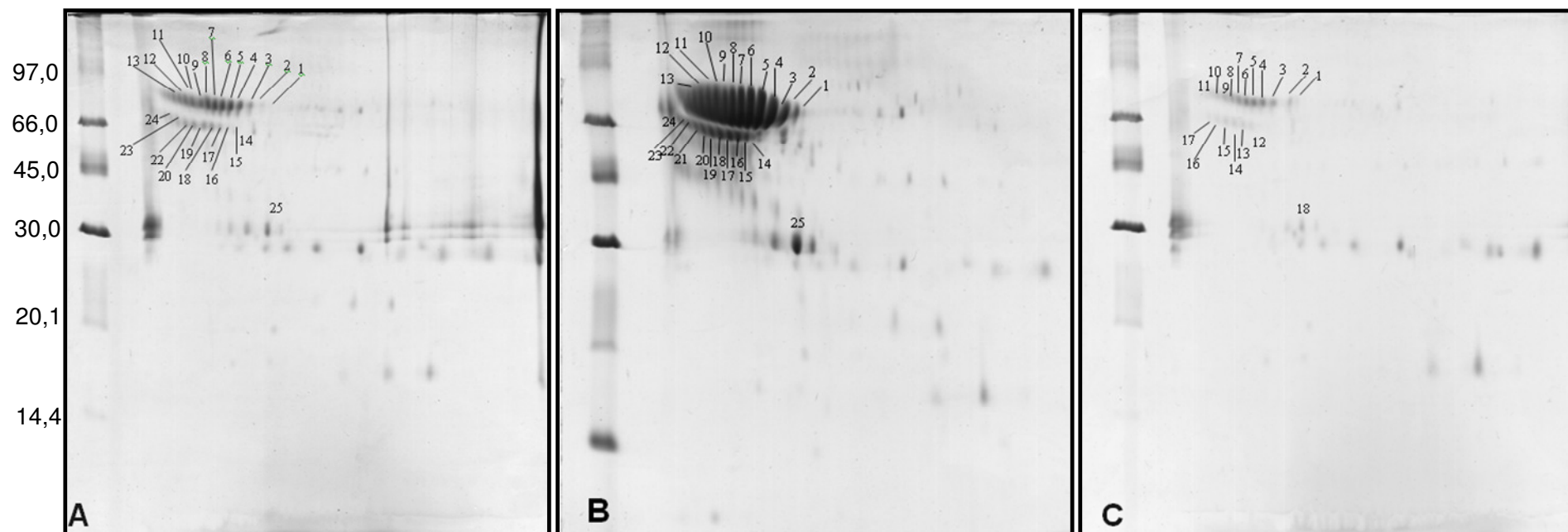


Figura 16: Eletroforeses bidimensionais das frações PL de *Calotropis procera* obtidas de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a dano mecânico. Foram aplicadas 200 µg de proteína em cada gel, as quais foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*.

Tabela 6: Diferença na intensidade e volume relativos de spots das frações PL obtidas de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a danos mecânicos.

Spot	Tratamento	Intensidade relativa*(%)	Volume relativo*(%)
1 - 13	Controle	1,2	0,9
1 - 13	Atacada	2,5	4,4
1 - 11	Dano mecânico	0,7	0,4
14 - 24	Controle	0,4	0,2
14 -24	Atacada	1,2	0,6
12 - 17	Dano mecânico	0,2	0,1
25	Controle	0,9	0,6
25	Atacada	2,8	2,0
18	Dano mecânico	0,4	0,2

Intensidade ou volume relativos: referem-se à intensidade ou volume de um spot em relação a todos os spots do gel. *: na análise de mais de um spot, os valores referem-se às médias.

As proteínas referentes aos spots 1 a 25 nos quais foram detectadas diferenças na intensidade e volume relativos foram, anteriormente, identificadas por espectrometria de massas (MADI-TOF-TOF) no trabalho de FREITAS (2009). Estas proteínas foram identificadas como glicosilases por similaridade com uma proteína da bactéria *Sphigomonas wittchii* pelo programa *MASCOT* utilizando como banco de dados NCBI. A Tabela 7 mostra que as proteínas do látex apresentam massas moleculares e pontos isoelétricos semelhantes com a da referida bactéria. Estes resultados demonstram que as plantas de *C. procerca* quando atacadas pela monarca produzem maior quantidade de glicosilases.

Tabela 7: Proteínas identificadas da fração PL de *C. procera* por MALDI-TOF-TOF*

Spot	Teórico/ Experimental		Escore proteína / íon	Íons parietais	Sequência de todos os peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição/origem
	MM	pI					
1 - 24	68,2/68,7	5.3/4,5	68/68	1153.55	ELFEEMLSR	gil148556511	glicosilase se [<i>Sphingomonas wittichii</i>]
25/18	68,2/29,8	5,33/5,7	68/68	1153.56	ELFEEMLSR	gil148556511	glicosilase [<i>Sphingomonas wittichii</i>]

Dados obtidos de FREITAS (2009).

Quando foram avaliadas as atividades proteolíticas total e cisteínica das frações PL de plantas controle, atacadas pela monarca e submetidas a dano mecânico, não foi observada diferença significativa (Figura 17). De maneira semelhante, a atividade quitinolítica não foi significativamente alterada (Figura 17).

Foi avaliado também se a atividade de inibição de proteases cisteínicas das frações PL de plantas atacadas pela monarca ou submetidas a dano mecânico foi alterada. Para tanto, as frações PL foram aquecidas a 100 °C por 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante liofilizado, resultando em uma fração denominada PLaq (PLaquecido). Este procedimento foi realizado com o intuito de eliminar a atividade proteolítica das frações PL, preparando as amostras para verificar a atividade de inibição de protease. Foi realizado um ensaio de inibição da atividade proteolítica da papaína, uma protease cisteínica, utilizando BANA como substrato. Foi observado que as frações PLaq inibem a atividade proteolítica da papaína, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle (Figura 17).

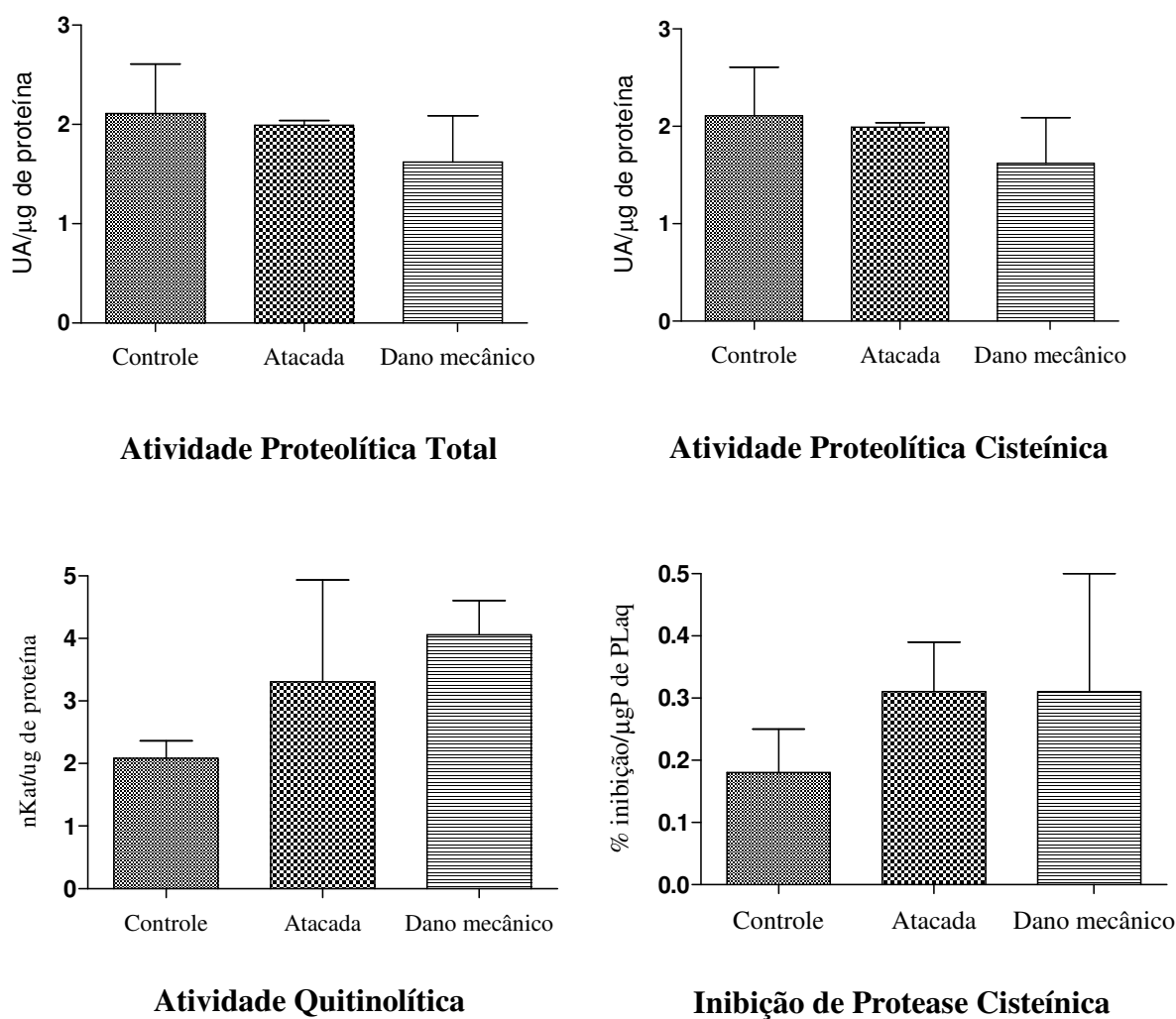


Figura 17: Atividade proteolítica inespecífica, cisteínica, quitinolítica e inibição de protease cisteínica das frações PL de plantas atacadas pela monarca ou submetidas a dano mecânico. PL_{aq}: fração solúvel do PL aquecido por 30 minutos a 100 °C. As colunas referem-se às médias das triplicatas de cada tratamento e as barras ao DP. A quantidade de proteínas solúveis foi estimada através do método de BRADFORD (1976). * ($p < 0,05$) denota diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnett); # ($p < 0,05$) denota diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA – teste de Tukey).

As frações PL foram avaliadas ainda quanto às atividades das enzimas antioxidantes peroxidase do ascorbato (APX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do guaiacol (GPX). As frações PL apresentaram atividade de APX e SOD, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle. As atividades de CAT e GPX não foram detectadas (Tabela 8).

Tabela 8: Atividade de enzimas antioxidantes na fração PL de *C. procera*.

Enzimas antioxidantes	Atividade enzimática da fração PL de <i>C. procera</i>		
	Controle	Atacada	Dano mecânico
Peroxidase do ascorbato ($\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	7,07 \pm 1,03	8,13 \pm 1,78	6,87 \pm 0,92
Superóxido dismutase (UA g^{-1})	3956,60 \pm 1362,29	4495,04 \pm 1671,62	3844,23 \pm 1671,62
Peroxidase do guaiacol	ND	ND	ND
Catalase	ND	ND	ND

Os valores referem-se às médias das triplicatas de cada tratamento \pm DP. A atividades estão expressas por grama de proteína. A quantidade de proteínas solúveis foi estimada através do método de BRADFORD (1976). * ($p < 0,05$) denota diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnett); # ($p < 0,05$) denota diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA – teste de Tukey).

VI – DISCUSSÃO

A larva da monarca alimenta-se exclusivamente de plantas laticíferas pertencentes à subfamília Asclepiadoideae (família Apocynaceae) e é um exemplo de um inseto especialista que utiliza diferentes estratégias para superar as defesas desempenhadas pela planta hospedeira (DESPRÉS *et al.*, 2007). O látex de algumas plantas contém cardenolídeos de alta toxicidade que variam em quantidade e tipo. A larva da monarca concentra os cardenolídeos, os quais são conservados no adulto como defesa contra predadores (BROWER; MOFFIT, 1974).

Uma das plantas laticíferas que serve de alimento para esta larva é *Calotropis procera*. FREITAS (2006) demonstrou, em ensaios com dietas artificiais, que a fração protéica extraída do látex desta espécie foi significativamente deletéria para pragas agrícolas pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera. Muitos estudos abordam a resistência da monarca em relação à toxicidade dos cardenolídeos. No entanto, pouco se sabe sobre a resistência em relação as proteínas tóxicas do látex. No presente trabalho foi realizado um estudo bioquímico sobre a herbivoria da lagarta monarca sobre a planta *C. procera*, dando ênfase à resistência da larva às proteínas do látex, bem como à resposta da planta ao ataque da lagarta.

Para uma maior padronização dos experimentos com as larvas, estas foram mantidas sob condições controladas. O ciclo de vida do inseto nestas condições foi similar ao descrito na literatura (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2006). Larvas do quinto estágio (aproximadamente dez dias de vida) foram escolhidas para a realização dos experimentos subsequentes. Este foi escolhido devido ser o estágio no qual a larva atinge o maior tamanho e

com maior número de dias. Portanto, o manuseio e a extração do trato digestório são mais fáceis, além do que, nos bioensaios as larvas podem ser observadas por mais tempo no mesmo estágio.

O extrato intestinal de larvas do quinto estágio foi caracterizado quanto à atividade proteolítica. As enzimas digestivas foram capazes de degradar substratos específicos para proteases serínicas (BANA e BApNA) e a atividade proteolítica total foi inibida por PMSF e leupeptatina, ambos inibidores deste tipo de protease. Estes resultados demonstram que a atividade proteolítica predominante é do tipo serínica, a qual apresentou atividade ótima em pH 10,0. Similarmente, proteases serínicas com pH máximo de 11,5 foram detectadas no extrato intestinal de *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) (CHOUGULEA *et al.*, 2008). Este tipo de protease é comumente reportada em espécies de Lepidoptera, como *Anticarsia gemmatalis* (OLIVEIRA, *et al.*, 2005), *Spodoptera littoralis* (LEE; ANSTEE; 1995) e *Helicoverpa armigera* (PATANKAR *et al.*, 2001). A atividade proteolítica foi fortemente dependente da temperatura, sendo que o máximo de atividade foi detectada na temperatura de 37 °C. Quando o extrato intestinal foi aquecido a 60 °C por 15 minutos perdeu completamente a atividade. Estes resultados foram similares aos reportados para outras espécies de Lepidoptera, como *Anticarsia gemmatalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Ditiotreitol (DTT), β -mercaptoetanol (β -ME) e L-cisteine não alteraram a hidrólise sobre a azocaseína pelo extrato intestinal da larva, evidenciando a ausência de proteases cisteínicas. Entretanto, a atividade proteolítica total do extrato foi parcialmente reduzida por E-64 (38%) e iodoacetmida (25%), dois inibidores de proteases cisteínicas. Alguns trabalhos mostraram que E-64 foi hábil em inibir proteases serínicas do tipo tripsina, oriundos de larvas de algumas espécies de Lepidoptera (NOVILLO *et al.*, 1997). No entanto, não é possível descartar a presença de proteases cisteínicas no extrato intestinal de larvas do quinto estágio da monarca, levando em consideração que este tipo de protease já foi detectada no extrato

intestinal de espécies de Lepidoptera, embora, com menos frequência. (PATANKAR *et al.*, 2001).

Em ensaios *in vitro*, as enzimas digestivas da larva monarca foram hábeis em digerir a fração protéica (PL) do látex de *C. procera* em poucos instantes. A habilidade da monarca em digerir prontamente as proteínas do látex pode explicar, pelo menos em parte, como este inseto supera a ação defensiva que as proteínas do látex desempenham na planta. A fração PL de *C. procera* não foi digerida pelo extrato intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pirrocoridae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) 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. Interessantemente, a fração PL de *C. procera* mostrou atividade deletéria contra larvas de *D. peruvianus* e *C. maculatus* em doses de 1,0% e 0,1%, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2007, 2010). Esta ação inseticida pode ser resultado da alta eficiência de digestão da fração protéica de *C. procera* sobre as proteínas intestinais das larvas, que é desempenhada, predominantemente, por proteases do tipo cisteínica (FREITAS *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que proteases cisteínicas de plantas têm função defensiva, inclusive proteases detectadas em fluidos laticíferos (KONNO *et al.*, 2004). Por isso, alguns insetos produzem inibidores de proteases para se defenderem da ação proteolítica das plantas das quais se alimentam. Como exemplo, a lagarta *Trichoplusia ni* possui inibidor de protease cisteínica que a protege da atividade proteolítica de sua planta hospedeira (LI *et al.*, 2009). Este tipo de contra-defesa pode ter sido desenvolvida pela monarca, no entanto, são necessárias mais investigações quanto a esta hipótese.

O extrato intestinal da monarca não exerceu uma expressiva digestão sobre as proteínas dos fluidos laticíferos de *P. rubra* e *Cr. grandiflora*. A falta de hidrólise sobre as

proteínas do látex destas espécies pela monarca pode ser um importante aspecto para estas plantas poderem driblar a herbivoria da lagarta.

Um inibidor de protease foi recentemente detectado na fração PL de *C. procerca* onde, sua detecção foi possível apenas após a eliminação da atividade proteolítica endógena de PL, através do aquecimento desta fração (RAMOS *et al.*, 2010). A atividade proteolítica do trato digestório da lagarta foi inibida pela fração PL aquecida (PLaq) em 58 e 79% utilizando BANA e BApNA como substratos, respectivamente. Em zimograma foi possível visualizar a inibição de uma banda de protease do extrato intestinal. Estes resultados induzem ao questionamento de como a monarca não é afetada, *in vivo*, pela atividade de inibição de protease detectada no látex. Resultados de experimentos *in vitro* combinando extratos intestinais de insetos e inibidores de proteases (IP) indicaram que muitos dos IPs testados inibem a atividade proteolítica das enzimas digestivas, no entanto, experimentos *in vivo* frequentemente não demonstram efeitos deletério sobre os insetos (JONGSMA; BOLTER, 1997). Para explicar por que isto acontece muitos fatores precisam ser considerados, como a concentração do IP e estabilidade do mesmo no trato digestório. No ensaio de inibição não foi utilizado o inibidor purificado, apenas uma fração enriquecida de inibidor (PLaq), portanto, não é conhecida a quantidade de inibidor utilizada. Esta pode ter sido muito elevada em relação às quantidades encontradas naturalmente no látex. YANG *et al.*, (2009) demonstrou que *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Yponomeutidae) inativa especificamente o inibidor de protease de sua planta hospedeira após 3 horas de incubação, demonstrando que a insensibilidade da larva ao inibidor de protease pode ser explicada pela degradação do inibidor.

Quando as larvas da monarca foram alimentadas com dieta artificial contendo a fração PL (1% e 5%), foi observado que, quanto maior a concentração de PL na dieta mais rapidamente as larvas ganhavam peso. Estes resultados estão em concordância com os obtidos

no ensaio de digestão *in vitro* da fração PL, sugerindo que as proteínas do látex são apropriadas para a digestão pelas enzimas da monarca. A fração PL de *C. procera* a uma concentração de 1% também não foi deletéria para as larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). No entanto, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo 0.5% (p/p) apresentou redução de massa corporal e de sobrevivência, LD50 = 0.48% (FREITAS, 2006).

Comparando o perfil bidimensional das proteínas do extrato intestinal das larvas com o perfil das proteínas do látex de *C. procera* (Figura 14), foi possível observar que o extrato intestinal estava essencialmente livre das proteínas do látex, com exceção de um conjunto de proteínas com massa molecular aparente de 66,0 kDa (destacado no quadrado). Assim, estas proteínas podem ser resistentes às proteases intestinais da larva. Proteínas de *C. procera* com massa molecular em torno de 66,0 kDa, não foram observadas no gel da Figura 13, o que demonstra a digestão da fração PL pelas enzimas da monarca. Ao analisar um gel bidimensional das proteínas do látex separadas em uma faixa de pH maior (3 a 10), observou-se que proteínas com massa molecular aparente de 66,0 kDa são pouco abundantes, sendo mais abundantes proteínas com massa molecular aparente de 20 a 14kDa (FREITAS *et al.*, 2007), o que está de acordo com o que foi mostrado na Figura 13. Portanto, fica claro que as proteínas com massa molecular aparente de 66,0 kDa não foram visualizadas no ensaio de digestão por existirem em pouca quantidade.

Curiosamente, este conjunto de proteínas estava aumentado em amostras de PL obtidos de plantas submetidas à herbivoria pela monarca durante 3 dias. Estas proteínas foram, anteriormente, identificadas por espectrometria de massas (MADI-TOF-TOF) no trabalho de FREITAS (2009). Uma sequência única de aminoácidos (ELFEEMLSR) foi obtida para todos os *spots*. A análise das seqüências obtidas através do Mascote MS/MS, uma ferramenta de pesquisa do banco de dados NCBI, sugeriu que todos os *spots* analisados

corresponderam a isoformas de uma única proteína, identificada como uma glicosil hidrolase bacteriana de *Sphingomonas wittichii*, com massa molecular e pI (68,2 kDa e pI 5,3) similares aos do látex de *C. procera*. Quando a mesma pesquisa foi restrita à taxonomia Viridiplantae não houve nenhuma identificação. A mesma seqüência foi analisada pela ferramenta BLAST, do banco de dados NCBI, e foi comparável com a seqüência EIFEEMLSR de uma proteína desconhecida de 61,2 kDa e pI 8,0 de *Arabidopsis thaliana* (gi |240256396). Em relatos anteriores, uma proteína do látex de *Papaver somniferum* de 52 kDa e pI 4,8 foi identificada como uma glicosil hidrolase (beta-glucosidase) de *Thermotoga maritima* (DECKER *et al.*, 2000). Usando a ferramenta BLAST do NCBI, o fragmento obtido desta proteína (KRFQIVYVDYK) foi comparável apenas com proteínas hipotéticas ou desconhecidas de diferentes plantas, como sorgo (*Sorghum bicolor*) (gi | 241928760) e milho (*Zea mays*) (gi | 226490809). Estes resultados mostraram que a função desse tipo de glicosil hidrolase em plantas ainda é desconhecida. Glicosil hidrolase ou glicosidases são as enzimas amplamente distribuídas na natureza capazes de hidrolisar ligações glicosídicas. Essas enzimas supostamente desempenham várias funções no metabolismo da parede celular, defesa vegetal, ativação e mobilização de moléculas de sinalização, dentre outras (MINIC, 2007). Algumas das glicosidases isoladas de plantas parecem desempenhar importantes papéis no metabolismo de metabólitos secundários, que são sintetizados como compostos glicosilados e armazenados como compostos inativos (MORANT *et al.*, 2008). Isto ocorre com a cardenolídeo-hidrolase β -D-glucosidase de 65 kDa e pI 6,2 isolada de folhas jovens de *Digitalis lanata* (HORNBERGER *et al.*, 2000). Recentemente, RASMANN *et al.*, (2009) mostraram um aumento significativo (30%) nos cardenolídeos induzidos pela monarca ou ácido jasmônico no látex de *Asclepias barjoniifolia*. Entretanto, a monarca não sofre os efeitos adversos dos cardenolídeos. Esses resultados corroboram com os descritos neste trabalho, uma vez que foi encontrada uma grande expressão de glicosil hidrolases no látex das folhas de *C. procera*

atacadas pela monarca. Possivelmente, essas proteínas estão envolvidas no metabolismo dos cardenolídeos no látex de *C. procera*.

Experimentos simulando danos mecânicos causados por insetos têm sido realizados para avaliar a reposta da planta. No entanto, o processo de alimentação por insetos é contínuo, freqüentemente acompanhado por simultânea introdução de saliva e secreções intestinais. Um simples dano mecânico é geralmente inábil para gerar uma resposta consistente (KESSLER; BALDWIN, 2002). Entretanto, danos mecânicos provocados regularmente foram suficientes para causar resposta no látex de *Carica papaya*, como a ativação da papaína (protease cisteínica) e acúmulo de inibidor de tripsina e quitinase, onde plantas danificadas apenas uma vez apresentaram pouca ou nenhuma resposta (AZARCAN *et al.*, 2004). Em *Calotropis procera*, danos mecânicos realizados uma vez por dia (durante três dias) não foram suficientes para causar a alteração observada em plantas atacadas pela larva durante o mesmo período, o aumento de glicosidases. Isto sugere que, provavelmente, uma interação química entre a larva e a planta é necessária para causar esta resposta. No entanto, estudos avaliando uma maior intensidade de danos mecânicos devem ser realizados para verificar se estes realmente não causam esta resposta na planta.

Proteases, quitinases e inibidores de proteases são proteínas envolvidas na defesa vegetal encontradas em fluidos laticíferos (KONNO *et al.*, 2004; AZARCAN *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que a quantidade destas moléculas pode ser aumentada em reposta à herbivoria (TSCHARNTKE, *et al.*, 2001). No entanto, as atividades destas proteínas não foram alteradas em folhas de *C. procera* atacadas durante três dias pela larva da monarca, ou submetidas a danos mecânicos em relação às plantas saudáveis, sugerindo que estas proteínas de defesa são produzidas constitutivamente.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla proveniente da expressão em inglês “reactive oxygen species”) é um fenômeno comum em reposta a estresses biótico e

abiótico de plantas. Estas moléculas em baixas concentrações podem agir como sinalizadores e em altas concentrações como defesa direta contra patógenos (APEL; HIRT, 2004). ROS são geradas em resposta a danos mecânicos e ataque por herbívoros. A presença de ROS em resposta à herbivoria pode ser vantajosa para prevenir infecção microbiana na zona injuriada. Como as ROS podem danificar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, a célula vegetal possui um sistema enzimático para removê-las, promovendo um balanço entre a produção de ROS para a defesa e produção de enzimas antioxidantes. Dentre as enzimas envolvidas têm-se a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX) (MANFFEI *et al.*, 2007). No entanto, *C. procera* não apresentou mudanças na atividade de enzimas antioxidantes de plantas atacadas pela monarca, ou submetidas a danos mecânicos, em relação às plantas saudáveis. De maneira similar a herbivoria de *Agelastica alni* sobre *Alnus glutinosa* não resultou em alteração da atividade de enzimas antioxidantes (TSCHARNTKE *et al.*, 2001).

VI - CONCLUSÃO

A habilidade das enzimas digestivas da monarca em digerir prontamente as proteínas do látex de *C. procera* pode explicar, pelo menos em parte, como este inseto supera a ação defensiva das proteínas do látex. Esta habilidade é devida, principalmente, a ação de proteases serínicas. A falta de hidrólise das proteínas do látex de *Plumeria rubra* e *Cryptostegia graniflora* pela monarca pode ser um importante aspecto para estas plantas não sofrerem herbivoria desta larva.

As enzimas digestivas da monarca são inibidas pelo inibidor de protease do látex de *C. procera*. No entanto, são necessárias investigações sobre a estabilidade do inibidor no intestino da larva, bem como, a determinação da quantidade de inibidor presente no látex para avaliar o efeito deste sobre a larva em condições reais.

Quando *C. procera* é atacada pela lagarta monarca há um aumento na produção de glicosidases, que podem estar envolvidas nas vias metabólicas de produção de cardenolídeos. Enquanto que outras moléculas envolvidas na defesa vegetal, como quitinases, inibidor de protease, proteases e enzimas antioxidantes (peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase) são produzidas constitutivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

ANTÃO, C. M. & MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:637-650, 2005.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 55:373-99, 2004.

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.

AZARKAN, M.; WINTJENSB, R.; LOOZEB, Y.; BAEYENS-VOLANTA, D. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. **Phytochemistry**, 65:525-534, 2004.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, **J. Biol. Chem.**, 195:133-140, 1952.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and beta-1-3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology**: S. J. Gurr, M.J. Mc Pherson and D.J.Bowles. eds. IRL Press New York, p. 23-29, 1993.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and beta-1-3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology: A practical Approach**. Edited by S. J. Gurr, M.J. Mc Pherson, and D.J.Bowles. v. II. 1992.

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.

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.

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

CHESIN, M.; ZIPF, A. E. Alarm systems in higher plants. **The Botanical Review**, 56:193-235, 1990.

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.

CHOUGULEA, N. P.; DOYLEA,E.; FITCHES, E.; GATEHOUSEA, 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.

COSTA, P. H. A.; NETO, A. D. A.; BEZERRA, M. A.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(4):353-361, 2005.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 48:355-81, 1997.

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.

DECKER, .V.; WANNER, G.; ZENK, M. H.; LOTTSPREICH, S. Characterization of proteins in latex of the *Opium poppy* (papaver somniferun) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. **Electroforesis**, 21:3500-3516, 2000.

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

DESPRE´ S, S.; DAVID, J; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Ecology and Evolution**, 22(6): 298-307, 2007.

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.

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-cardenolides isolated from *Calotropis procera* R. BR. **Journal of Molecular Structure**, 477 :201-208, 1999.

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.

GLASS JR, H. W.; PAN, M. L. Laboratory rearing of monarch butterflies (Lepidoptera: Danaidae), using an artificial diet. **Annals of the Entomological Society of America**, 76: 475-476, 1983.

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 *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiol. Biochem.**, 43:1095-1102, 2005.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**, 13:631-639, 2008.

HARBORNE, J. B. Biochemical Plant Ecology. **Plant Biochemistry**, 14: 503-516,1997.

HEATH, C. M. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology.**, 3:315-319, 2000.

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

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.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant Immunity to Insect Herbivores. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 59:41-66, 2008.

KAMEL, M. S.; ASSAFA, M. H.; ABEB, Y.; OHTANIB, K.; KASAIB, R.; YAMASAKIB, K. Cardiac glycosides from *Cryptostegia grandiflora*. **Phytochemistry**, 58 537-542, 2001.

KARBAN, R.; MYERS, J. H. Induced plant responses to herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, 20:331-18, 1989.

KEKWICK, R.; Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-6, 2001.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 53:299–328, 2002.

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 Physi.** 44:412-14, 2003.

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.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Endoproteases from the Midgut of Larval *Spodoptera lit torah* Include a Chymotrypsinlike Enzyme with an Extended Binding Site. **Insw Biochem. Molec. Biol.** 25(I): 49-61, 1995.

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.

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

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.

MAFFEI, M. E.; MITHOFER, A.; BOLAND, W. Before gene expression: early events in plant–insect interaction. **Plant Science**, 12(7): 310-316, 2007.

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.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiol.**, 14(2):71-81, 2002.

MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, 227:723-740, 2008.

MORANT, A. V.; JORGENSEN, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, L.; BAK, S. b-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, 69:1795-1813, 2008.

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.; VINCENNELLI, 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.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts, **Plant Cell Physiol.** 22:867-880, 1981.

NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Inhibition of Digestive Trypsin-Like Proteases from Larvae of Several Lepidopteran Species by the Diagnostic Cysteine Protease Inhibitor E-64. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 27(3): 247-254, 1997.

OBERHAUSER K. S., SOLENSKY, M. J. Ecologia da Boborleta-Monarca. Disponível em: <http://www.ecologia.info/borboleta-monarca.htm> Acesso em: 17 Jan. 2010.

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.

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.

PATANKAR, A. G.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; SAINANI, M. N.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA. V. S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31:453–464, 2001.

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**, 1001(5)503-510, 2006.

RASMANN, S.; JOHNSON, M. D.; AGRAWAL, A. A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. **J Chem Ecol.**, 35:1326-1334, 2009.

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.

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.

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.

TSCHARNTKEA, T.; THIESSENA, S.;DOLCHA, R.; BOLAND, R. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 29:1025-1047, 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.

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.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:1-8, 2002.

WOODSON, R. E. The North American species of *Asclepias* L. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 41:1-211, 1954.

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.