



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

**PEPTIDASES INTESTINAIS DE *Danaus plexippus* L. COMO UMA NOVA
PERSPECTIVA NA PRODUÇÃO DE UM LEITE HIPOALERGÊNICO**

JOÃO PEDRO BRASIL DE OLIVEIRA

Fortaleza-CE

2016

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

**PEPTIDASES INTESTINAIS DE *Danaus plexippus* L. COMO UMA NOVA
PERSPECTIVA NA PRODUÇÃO DE UM LEITE HIPOALERGÊNICO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton
Diniz Teixeira de Freitas

Fortaleza-CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O47p Oliveira, João Pedro Brasil de.
Peptidases intestinais de *Danaus plexippus* L. como uma nova perspectiva na produção de um leite hipoalergênico / João Pedro Brasil de Oliveira. – 2016.
62 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas.
1. Leite hipoalergênico. 2. Peptidases. 3. *Danaus plexippus*. I. Título.

CDD 570

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará

Através do Laboratório de Plantas Laticíferas do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Através do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelos financiamentos aos Projetos do laboratório.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas por ter aceitado ser meu orientador na iniciação científica, por ser um exemplo de pesquisador a ser seguido, por todo o apoio e ensinamentos transmitidos durante todo esse período, desde meu primeiro tampão até a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos pelos seus conselhos e críticas, por estar sempre disponível a nos orientar, por aceitar fazer parte da banca examinadora, por todos os momentos de descontração e por ser um profissional inspirador.

Ao Dr. Pedro Filho Noronha de Souza por sua disponibilidade em participar da banca examinadora, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À Zelândia Rocha e Carolina Viana por toda a ajuda e conselhos durante todos esses anos de laboratório.

Ao Daniel de Brito por ser uma pessoa divertida e espirituosa e está sempre disponível para ajudar.

À Dr. Danielle Aragão Pereira pelos conhecimentos transmitidos em relação à lagarta monarca.

À todos os outros membros do laboratório, por todos os ensinamentos, ajuda na experimentação, por todos os momentos de alegria e as histórias contadas e inclusive aos horários do café.

À toda a minha família, em especial meus pais e avó por terem me criado, educado e me apoiado durante toda a minha vida.

Á todos os membros do grupo BESTEIRAS pelos momentos de alegria proporcionado durante esses quatro anos, nas festas, viagens, saídas e conversas durante o almoço. Vocês são os melhores!!!

À Deus, que me guiou por esse caminho que estou hoje e me deu forças durante todos os momentos.

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

Item	Título	Página
1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Enzimas	12
1.2	Peptidases	13
1.3	Enzimas de insetos	14
1.4	Enzimas digestivas insetos	15
1.5	Gênero <i>Danaus</i> : Ecologia e bioquímica	18
1.6.1	Alergia ao leite: Visão geral	20
1.6.2	Alergia ao leite: Principais proteínas do leite	21
1.6.3	Alergia ao leite: Formulações	22
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Obtenção do extrato intestinal	25
3.2	Perfil proteico do extrato intestinal total	25
3.3	Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato	25
3.4	Atividade proteolítica utilizando BApNA como substrato	26
3.5	Ensaio de autólise	26
3.6	Purificação das frações caseína, lactosoro e β - lactoglobulina do leite bovino	27
3.7	Hidrólise das proteínas do leite	27
3.7.1	Zimograma	27
3.7.2	In vitro	28
3.8	Purificação das proteases do EIT	28
3.8.1	Cromatografia de troca iônica	28
3.8.2	Cromatografia de afinidade	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Caracterização das proteases	30
4.2	Ensaio de degradação das proteínas do leite bovino	33
4.3	Etapas cromatográficas	39
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ação de exo e endopeptidases sobre cadeias polipeptídicas.....	13
Figura 2	Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos.....	16
Figura 3	<i>Danaus plexippus</i> (esquerda) e <i>Danaus gilippus</i> (direita) se alimentando de folhas de <i>Calotropis procera</i>	19
Figura 4	Leites hipoalergênicos comerciais.....	23
Figura 5	Eletroforese em gel poliacrilamida (12,5%) do extrato intestinal total de <i>D. plexippus</i> (EIT), na ausência de β -mercaptoetanol.....	30
Figura 6	Atividade proteolítica específica do extrato intestinal total de <i>D. plexippus</i> , utilizando azocaseína 1% como substrato.....	31
Figura 7	Efeito da temperatura e tempo na estabilidade das peptidases intestinais de <i>D. plexippus</i> , em pH 9,0, usando azocaseína 1% como substrato.....	32
Figura 8	Efeito do tempo e temperatura sobre a autólise das peptidases de EIT em pH 9,0.....	32
Figura 9	Eletroforese das frações purificadas.....	33
Figura 10	Zimograma para detecção de atividade proteolítica de EIT sobre diferentes substratos e valores de pH.....	34
Figura 11	Avaliação da hidrólise das caseínas pelas peptidases intestinais de <i>D. plexippus</i> após diferentes tempos e a 37 °C, através de eletroforese em gel de poliacrilamida.....	35
Figura 12	Avaliação da hidrólise das caseínas pelas peptidases intestinais de <i>D. plexippus</i> após diferentes tempos e a 37 °C, através de ensaios espectrofotométricos.....	36
Figura 13	Avaliação da hidrólise do lactosoro bovino pelas peptidases intestinais de <i>D. plexippus</i> , através de eletroforese (A) e espectrofotometria (B)	37

Figura 14	Avaliação da hidrólise da proteína β -lactoglobulina pelas peptidases intestinais de <i>D. plexippus</i> , através de eletroforese (A) e espectrofotometria (B)	38
Figura 15	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de diferentes leites comerciais.....	39
Figura 16	Cromatografia de troca iônica em coluna CM-sepharose fast flow do extrato intestinal de <i>D. plexippus</i> em pH 7,2...	40
Figura 17	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-sepharose fast flow em pH 7,2. (A) Cromatograma das proteínas eluídas em gradiente linear de sal. (B) Atividade proteolítica dos picos para peptidases serínicas	42
Figura 18	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-sepharose fast flow em pH 7,2. (A) Cromatograma. (B) Atividade enzimática e (C) perfil proteico dos picos.....	44
Figura 19	Cromatografia de afinidade para peptidases serínicas do extrato intestinal de <i>D. plexippus</i> em coluna HiTrap-Benzamidina (A). (B) Zimograma para detecção de peptidases e (C) Atividade proteolítica específica para peptidases serínicas dos picos cromatográficos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α LA – α lactalbumina

β LG – β lactoglobulina

BAPNA – Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida

CM – Carboxymethyl

CN – Caseína

DEAE - Diethylaminoethyl

DNA – Deoxyribonucleic acid

EIT – Extrato Intestinal Total

HCl – Ácido clorídrico

IgE – Imunoglobulina E

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

kDa – KiloDalton

MP – Membrana peritrófica

NaCl – Cloreto de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

SDS – Sodium dodecyl sulfate

TCA – Trichloroacetic acid

UA – Unidade de atividade

WAO – World Allergy Organization

RESUMO

PEPTIDASES INTESTINAIS DE *Danaus plexippus* L. COMO UMA NOVA FERRAMENTA NA PRODUÇÃO DE LEITE HIPOALERGÊNICO

A principal fonte de alergia alimentar em crianças é o leite bovino e a falta de tratamento adequado pode trazer sérias consequências para o desenvolvimento da criança, por provocar problemas gastrointestinais, respiratórios e dermatológicos. A alergia está associada às proteínas do leite, principalmente, às caseínas, que representam 80% do total das proteínas do leite. O restante (20%) é constituído das proteínas do soro, principalmente, α -lactalbumina (α -LA) e β -lactoglobulina (β -LG). Muitos são os métodos utilizados para a redução da alergenicidade do leite, dentre eles destaca-se a digestão enzimática de suas proteínas por peptidases. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial das peptidases intestinais de lagartas da espécie *Danaus plexippus* na hidrólise das proteínas presentes no leite. Foram realizados ensaios proteolíticos com as peptidases intestinais em diferentes valores de pH e a atividade proteolítica residual do extrato foi determinada através do tempo de incubação. A capacidade de hidrolisar as proteínas do leite foi analisada por gel zimograma utilizando diferentes substratos e através de ensaios *in vitro*. Foi utilizado cromatografia de troca iônica (CM e DEAE-sepharose) e afinidade (HiTrap-Benzamidina) na tentativa de purificação de uma das proteínas presentes do extrato intestinal total. A atividade enzimática do extrato intestinal de *D. plexippus* foi 2,6 vezes maior em pH 9,0 comparado a pH 6,5. As enzimas proteolíticas presentes nesse extrato mantêm-se estáveis durante uma hora de reação, porém após 24 horas, a atividade residual foi de 44%. As peptidases intestinais foram capazes de hidrolisar extensivamente as caseínas, porém as proteínas do soro foram mais resistentes à hidrólise enzimática, sendo necessário o pré-aquecimento das proteínas presentes nessa fração. Foi demonstrado a ausência de proteínas positivamente carregadas, no extrato total, em pH neutro. Através da coluna de afinidade, foi observado duas peptidases serínicas no extrato total, sendo uma delas capaz de hidrolisar as proteínas do leite. As peptidases intestinais de *D. plexippus* apresentam um potencial para a produção de hidrolisados hipoalergênico do leite bovino, uma vez que são capazes de hidrolisar as proteínas do lactosoro de forma parcial e as caseínas de forma extensiva. Contudo mais ensaios precisam ser realizados para validar o potencial dessas peptidases.

Palavras-chaves: Leite hipoalergênico, peptidases, *Danaus plexippus*

ABSTRACT

GUT PEPTIDASES FROM *Danaus plexippus* L. AS A NEW TOOL IN THE PRODUCTION OF HYPOALLERGENIC MILK

The main source of food allergy in childhood is the bovine milk and the lack of treatment may cause gastrointestinal, breathing and dermatological problems. Milk allergy is caused by its proteins, the caseins represent 80% of all proteins present in milk. The whey protein fraction (20%) is composed, mainly, by α lactalbumin and β -lactoglobulin. The aim of this study was to evaluate the potential of gut peptidases from *Danaus plexippus* in the hydrolysis of milk proteins. Proteolytic assay was performed in different values of pH and the residual proteolytic activity of the extract was determined in different times of reaction. The ability to hydrolyze the milk proteins was determined by zymogram using different substrate and *in vitro* assay. It was performed ion exchange chromatography (CM and DEAE-Sepharose) and affinity chromatography (HiTrap-Benzamidin) to purify one of the proteins of the crude extract. The proteolytic activity of the gut extract was 2.6x higher in pH 9.0 compared to pH 6.5. The gut peptidases from *D. plexippus* stayed stable in the first hour of the reaction, but after 24 hours, the residual activity represented 44% of the original. The gut peptidases were able to hydrolyze the casein fraction (an extensive hydrolysis). The whey proteins fraction presented a significant hydrolysis degree only after pre incubation in denaturant temperatures. It was reported the lack of positive proteins, in the gut extract, in pH 7.2. Two serine peptidases were separated from the gut extract in the affinity chromatography and one of them was able to hydrolyze all the milk proteins tested in this study. The gut peptidases from *D. plexippus* presented a potential in the production of hypoallergenic hydrolysates of the bovine milk once they are able to extensively hydrolyse the casein fraction and partially hydrolyse the whey protein fraction. Further tests, however, need to be performed to validate the potential of these peptidases.

Key words: hypoallergenic milk, peptidases, *D. plexippus*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas

As enzimas são, em sua maioria, proteínas com elevado poder catalítico, acelerando a velocidade de reações químicas sem alterar seu equilíbrio. As enzimas são caracterizadas por atuarem, geralmente, em condições brandas de temperatura e pH, possuírem elevada especificidade a um substrato e alta taxa de renovação (NELSON; COX, 2014).

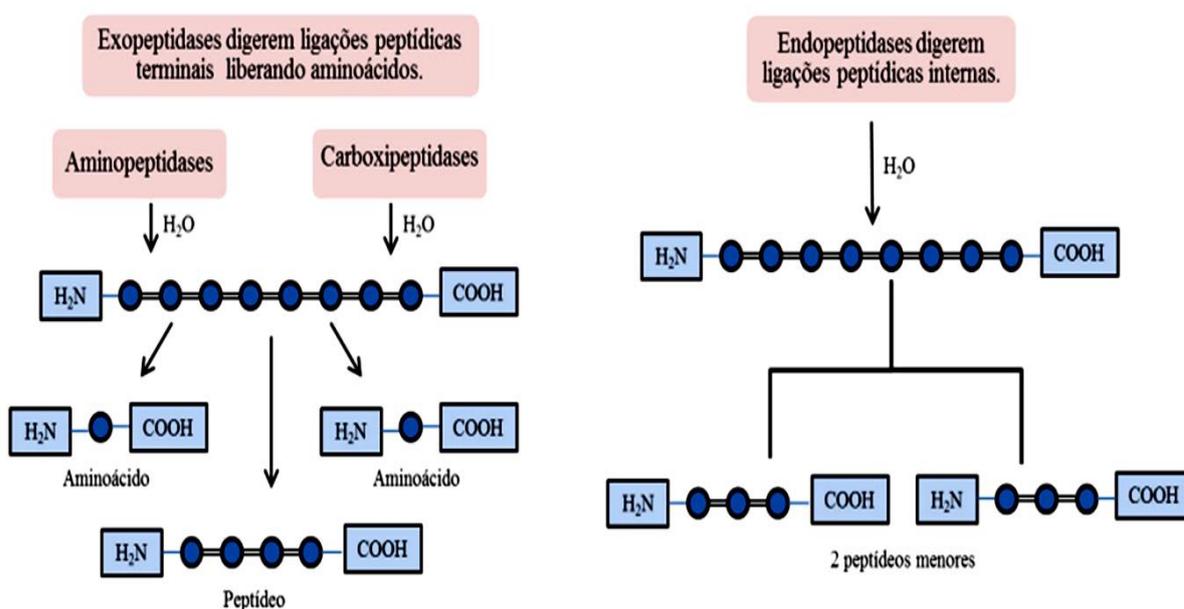
Foi definido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) um sistema de nomenclatura e classificação para as enzimas, dividindo-as em seis classes, baseado no tipo de reação por elas catalisadas. Foi estabelecido que cada enzima deve receber um número de classificação composto por 4 dígitos: o primeiro referente à classe, o segundo à sub-classe, o terceiro referente aos grupos químicos envolvidos na reação e o quarto a enzima propriamente dita (MCDONALD; TIPTON, 2014).

Devido suas características, as enzimas passaram a ser amplamente utilizadas na indústria, principalmente após o desenvolvimento da biotecnologia moderna e da tecnologia do DNA recombinante (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002), por reduzir ou eliminar o uso de compostos químicos, água e energia, além de poder ser reutilizadas após o processo. Elas são atualmente usadas na produção de detergentes (VASANTHABHARATHI et al., 2016), em diversas etapas da indústria têxtil (MOJSOV et al., 2016), na produção de ração animal (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015), papel (SRIDEVI et al., 2016), biocombustíveis (INDIRA et al., 2016), na indústria alimentar (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016) e farmacêutica (RASOR; VOSS, 2001; LALONDE, 2016).

1.2. Peptidases

De acordo com a IUBMB, as peptidases ou proteases são enzimas proteolíticas pertencentes à classe 3 (hidrolases) e a subclasse 4 (hidrolisam ligações peptídicas). As peptidases com capacidade de clivar ligações peptídicas nas porções carboxi e amino terminais são denominadas exopeptidases, enquanto aquelas que clivam ligações internas das proteínas são denominadas endopeptidases (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006) (Figura 1).

Figura 1 – Ação de exo e endopeptidases sobre cadeias polipeptídicas.



Fonte: MÓTYÁN; TÓTH; TÓZSÉR (2013), com modificações.

As peptidases podem ser classificadas como do tipo serina, cisteína, aspártica, glutâmica, asparagina e treonina, de acordo com o aminoácido que é encontrado no seu sítio ativo, ou metalopeptidase se é necessário um metal para sua ativação (RAWLINGS et al., 2014). As peptidases estão envolvidas com o controle de muitos processos biológicos, como por exemplo, a modulação da interação proteína-proteína, regulação do destino, localização e atividade de outras proteínas; e na produção de moléculas bioativas (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Três processos estão envolvidos na regulação da atividade dessas

enzimas: 1- sua secreção; 2- seguida da ativação do precursor zimogênio, esse mecanismo funciona para garantir que a célula produtora não seja danificada pelas peptidases por ela produzidas (KHAN; JAMES, 1998); e 3- por último o reconhecimento do sítio de ligação do substrato.

As peptidases são as enzimas que possuem maior destaque na indústria, sendo utilizadas por exemplo na produção de detergente, couro e papel (PAUL et al., 2016; SAXENA; SINGH-CHAUHAN, 2016). Na indústria alimentar, as peptidases têm grande importância na produção de hidrolisados proteicos pelo fato de muitas proteínas presentes nos alimentos estarem envolvidas no desencadeamento de reações alérgicas, processo que está cada vez mais recorrente nas últimas décadas (FERREIRA; SEIDMAN, 2007; SAVAGE; SICHERER; WOOD, 2016). Estima-se que 60% do mercado das enzimas seja representado pelas peptidases (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006) e que este movimento cerca de 3 bilhões de dólares somente nos Estados Unidos (LEARY et al., 2009).

1.3. Enzimas de insetos

As enzimas têm uma importância fundamental para regular o desenvolvimento dos insetos. Por exemplo, elas estão envolvidas na hidrólise do polissacarídeo estrutural quitina durante o processo de muda. Interessante é o fato que diferentes enzimas podem atuar sinergicamente para otimizar uma resposta biológica, como é o caso entre quitinases e β -N-acetil glicosaminidases, que são fundamentais para que o processo de muda ocorra de forma apropriada (FUKAMIZO; KRAMER, 1985). Muitos insetos pragas da agricultura estão sujeitos a danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas, com isso catalases são fundamentais para que os insetos sobrevivam a esta defesa das plantas (ZHANG et al., 2016). As enzimas também podem estar envolvidas nas respostas de defesa dos insetos aos agentes infecciosos (SAHAR et al., 2016).

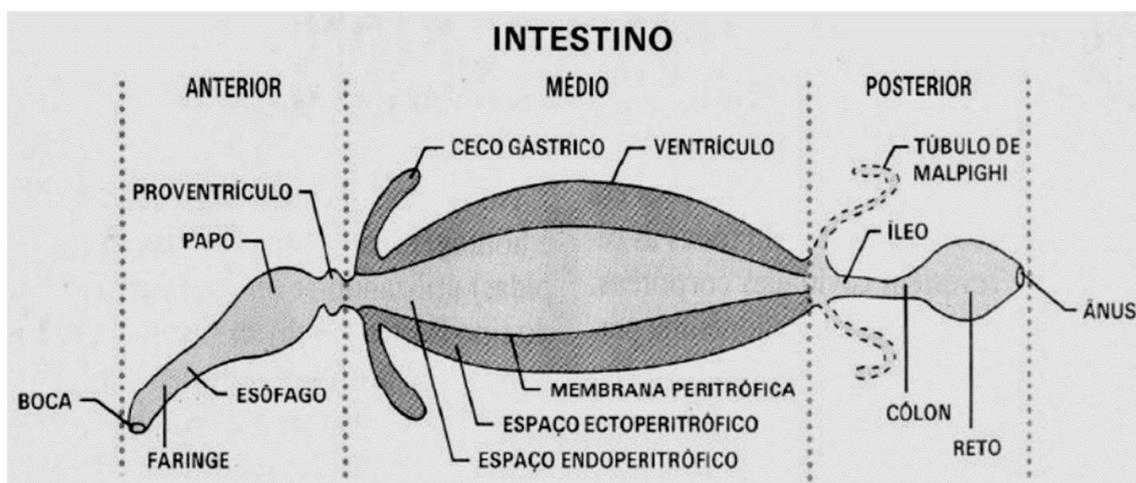
Outra enzima importante para manutenção da homeostase dos insetos são as glutathione-transferases. Elas são responsáveis pela desintoxicação de compostos xenobióticos, principalmente inseticidas e aleloquímicos vegetais, conferindo resistência a muitas classes de inseticidas. O processo de desintoxicação pode ser dividido em 3 partes: Primeiramente, algumas enzimas são responsáveis por introduzir grupos reativos e polares nos compostos tóxicos; posteriormente, esses compostos são conjugados com glutathione, e por fim são removidos através dos túbulos de Malpighi (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

1.4. Enzimas digestivas de insetos

A classe Insecta é a maior e mais distribuída entre os grupos de animais, possuindo representantes em quase todos os ecossistemas do planeta, refletindo em uma grande variedade de hábitos alimentares, incluindo tecidos vegetais, lã, cera, húmus, sangue e, até mesmo, alimentos que seriam tóxicos para outros animais (TERRA et al., 1996). Essa ampla distribuição e capacidade de metabolizar uma grande variedade de alimentos faz com que os insetos sejam responsáveis por grandes danos à economia e à saúde humana. Apesar desta grande diversidade, a composição enzimática em seu trato digestivo tende a ser similar para organismos da mesma ordem (DIAS et al., 2015).

O trato digestório dos insetos é dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Figura 2). No intestino anterior estão presentes as glândulas salivares e primeiras câmaras do trato digestivo. No intestino médio é encontrado a membrana peritrófica e as principais enzimas digestivas. No intestino posterior estão a maioria dos microrganismos simbiotes (WILLIS; MAZAREI; STEWART, 2016).

Figura 2 – Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos.



Fonte: BOLOGNESI (2005).

As enzimas digestivas presentes no intestino das fases larvais dos insetos podem estar aderidas a uma membrana ou excretadas no lúmen. A excreção das enzimas no intestino médio ocorre por exocitose através de processos apócrinos e microapócrinos (JORDÃO et al., 1999; LEHANE et al., 1996) e geralmente o aumento na excreção corresponde a um aumento na ingestão de alimentos (MARANA et al., 1997; WEIDLICH et al., 2015). De acordo com Woodring e Weidlich (2016), a taxa de secreção está relacionada com o crescimento e o desenvolvimento do intestino médio ao longo dos processos de muda, que aumenta a quantidade de células secretoras. Estudos conduzidos por Mohammadi e colaboradores (2015) relatam a relação da atividade enzimática com o ciclo circadiano, mostrando que a atividade digestiva é maior durante o dia e as proteases têm sua atividade aumentada durante o período de 12 às 18 horas. Apesar dessas contribuições, os mecanismos envolvidos na regulação da excreção de enzimas digestiva ainda precisam ser melhor compreendidos.

Em muitos insetos, o epitélio do intestino médio é coberto por uma membrana semipermeável formada principalmente por quitina e proteínas, conhecida como membrana peritrófica (MP). A MP tem a função de proteger o intestino contra danos mecânicos causados pelo alimento, formando uma barreira para entrada de patógenos, além de estar envolvida nos processos de excreção e absorção (TERRA, 1990, 2001; KAWAKITA et al., 2016). As

proteínas da MP são divididas em estruturais e não estruturais. As proteínas não estruturais incluem as enzimas digestivas e as enzimas responsáveis por modificar a quitina presente na própria membrana (TERRA et al., 1979). As proteínas estruturais são caracterizadas por possuírem domínios de ligação a quitina e uma de suas funções é lubrificar a passagem do alimento pelo intestino (WANG; GRANADOS, 1997; SARAUER et al., 2003).

Dentre as principais enzimas encontradas no trato digestório dos insetos pode-se destacar as peptidases, amilases, celulasas e hemicelulasas (TERRA, 1990; KOUADIO et al., 2016). Vários trabalhos na literatura relatam a importância das peptidases para a digestão e no caso das larvas da ordem Lepidóptera já foram identificadas peptidases do tipo tripsina, quimotripsina, elastase, aminopeptidase e carboxipeptidases A e B, sendo as peptidases do tipo serínicas responsáveis por 95% do processo digestório (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). O tipo da peptidase que pode ser encontrada no intestino médio varia de acordo com o seu pH. Por exemplo, peptidases serínicas estão presentes geralmente em pH mais alcalino enquanto que peptidases cisteínicas e aspárticas estão presentes em pH neutro ou levemente ácidos, respectivamente (HOUSEMAN; DOWNE, 1982; MURDOCK et al., 1987).

A presença de peptidases do tipo aspártica no intestino médio de insetos foi demonstrada em um estudo de proteômica comparativa realizado com representantes das ordens Himenóptera, Lepidóptera, Díptera e Phthiraptera, revelando similaridade entre as sequências de 19 peptidases (SEDDIGH; DARABI, 2016). Vários outros estudos foram conduzidos para identificar, em insetos, peptidases do tipo serínicas (ALARCÓN et al., 2002; LIU et al. 2016; TERESHCHENKOVA et al. 2016) e cisteínicas (EDMONDS et al., 1996; GRUDEN et al., 1998; WU et al., 2016), contudo metalopeptidases parecem não exercerem influência significativa na digestão enzimática no intestino médio (CHRISTELLER et al., 1989).

1.5. Gênero *Danaus*: Ecologia e bioquímica

As borboletas-monarca, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae), são originalmente nativas das Américas do Sul e do Norte, contudo desde o século XVII é relatada sua presença em outros continentes (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2011). Essa espécie é bastante conhecida por sua migração, chegando a percorrer mais de 2.200 km em decorrência das mudanças de estação do ano (OBERHAUSER; SOLENSKY, 2011). Atualmente, existe um banco de dados genômico de *D. plexippus*, Monarch Base (ZHAN et al., 2011), contendo 15.130 genes. Esse banco de dados foi criado com o objetivo de proporcionar um melhor entendimento em relação a capacidade da borboleta-monarca realizar migrações de longas distância. O ciclo de vida de *D. plexippus* é dividido em cinco estágios larvais e uma fase reprodutiva na forma de borboleta (PEREIRA et al., 2010), ocorrendo no hemisfério ocidental a presença de duas subespécies, *Danaus plexippus plexippus* e *Danaus plexippus erippus*.

A ovoposição das borboletas-monarca ocorre apenas em plantas saudáveis da família Apocynaceae (WELLS; WELLS, 1992), os ovos eclodem, geralmente após $2,2 \pm 1,1$ dias (PEREIRA et al., 2010) e durante os estágios larvais, ocorre um aumento de massa na ordem de 1000 vezes (URQUHART, 1960). As larvas da monarca (Figura 3) podem adquirir uma defesa química extraíndo cardenólídeos de plantas da família Asclepiadaceae (BROWER; MOFFIT, 1974), todavia elevadas concentrações desse composto possui um efeito tóxico. Além disso, as larvas dessa espécie estão sujeitas aos efeitos adversos provocados pelo látex, como a colagem do aparelho bucal (ZALUCKI; MALCOLM, 1999) e os efeitos tóxicos de proteínas laticíferas. Ramos e colaboradores (2015) apresentaram os efeitos in vitro das peptidases laticíferas sobre a membrana peritrófica de *D. plexippus*, através de microscopia de força atômica, destacando os danos provocados na membrana, contudo o mesmo resultado não foi observado in vivo com as larvas se alimentando do látex de *C. procera*, corroborando com o observado por Pereira e colaboradores (2010) em que larvas de monarca alimentadas em uma dieta artificial contendo proteínas laticíferas apresentaram maior aumento na massa corporal comparado ao grupo controle. Foi também observado que as peptidases intestinais da lagarta são capazes de hidrolisar as proteínas do látex, indicando assim uma estratégia

evolutiva em que as larvas de *D. plexippus* sobrepõem o efeito tóxico das proteínas do látex.

Figura 3 – *Danaus plexippus* (esquerda) e *Danaus gilippus* (direita) se alimentando de folhas de *Calotropis procera*.



Fonte: autor. As barras equivalem a 1 cm.

Outro representante do gênero *Danaus* é a borboleta-rainha *Danaus gilippus*. Elas são menores e possuem a cor das asas em um marrom mais escuro comparada a *D. plexippus*. A fase larval possui um corpo cilíndrico, com listras pretas e três pares de “tentáculos” (BROWER, 1958) (Figura 3). As borboletas-rainha podem ser encontradas desde regiões tropicais a temperadas e apesar de saírem de locais no período de seca para áreas de maior altitude (McLAUGHLIN; MYERS, 1970), não fazem grandes migrações como a borboleta monarca. Plantas da família Asclepiadaceae estão envolvidas ao longo de todo o ciclo de vida da borboleta-rainha, todavia a espécie também pode ser encontrada em plantas da família Solanaceae e Apocynaceae com a larva se alimentando de *C. procera*.

1.6 . Alergia ao leite

1.6.1. Visão geral

O leite é um alimento de alto valor nutricional. É composto por água, gorduras, carboidratos, proteínas e vitaminas (ZANELLA et al., 2015), mas quando se refere a alergia ao leite são as proteínas que merecem maior destaque. Para a Organização Mundial da Alergia (WAO), a alergia é definida como uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos (FIOCCHI et al., 2010). Em 2001, após uma revisão na nomenclatura dos alérgenos, foi estabelecido o termo hipersensibilidade ao leite para se referir a intolerância ao leite, causada geralmente por uma deficiência na enzima lactase (intolerância a lactose); e hipersensibilidade alérgica ao leite se referindo a alergia às proteínas do leite (FIOCCHI et al., 2010). O leite bovino é a principal causa de alergia alimentar nos primeiros meses de vida, correspondendo a aproximadamente 77% dos casos (RESTANI et al., 2009). A falta de tratamento adequado pode ser prejudicial para o desenvolvimento da criança. A exposição de recém nascidos às proteínas do leite bovino pode desencadear efeitos clínicos e imunológicos devido à baixa atividade de enzimas digestivas durante essa fase da vida, limitando assim a hidrólise das proteínas alergênicas do leite (SAKAI et al., 2016). Do ponto de vista imunológico, a alergia ao leite é uma reação às proteínas nele presentes mediada por IgE, porém respostas mediadas por células parecem ter sua importância nesse processo (FIOCCHI et al., 2010). Pacientes com alergia ao leite podem desenvolver sintomas gastrointestinais em até 60% dos casos, sintomas na pele em até 90% dos casos e anafilaxia em até 9% dos casos (FIOCCHI et al., 2010). Em geral, alergia ao leite de vaca é mais frequente em crianças, com 2 a 3% de incidência, tendo seu pico no primeiro ano de idade (SPERGEL, 2013).

1.6.2. Principais proteínas do leite

O leite contém aproximadamente 20 proteínas que podem ser responsáveis pelas reações alérgicas. Porém, pode-se destacar algumas principais, entre elas as caseínas. As caseínas (CN) representam 80% das proteínas do leite e estão entre as principais causadoras das respostas imunes das reações alérgicas (RESTANI et al., 2009). Essas proteínas se organizam em micelas que são compostas por 4 proteínas (α_{s1} , α_{s2} , β e k-caseína) com pouca homologia sequencial entre elas. As caseínas possuem baixa solubilidade em pH 4.6 devido ao seu ponto isoelétrico, o que causa a sua precipitação. A maioria das reações de hipersensibilidade ocorre com as α - e k-caseínas. A α -lactalbumina (α LA) é uma proteína encontrada no soro do leite e é uma subunidade regulatória da lactose sintase (MCKENZIE, 1995). Essa proteína é produzida pelas glândulas mamárias e já foi encontrada em todos os leites já estudados (FIOCCHI et al., 2010). A β -lactoglobulina (β LG) é a proteína mais abundante do lactosoro bovino, sua função é ainda investigada mas acredita-se que esteja envolvida no transporte de retinol (TANG et al., 2016). Em condições fisiológicas pode ocorrer na forma de monômeros, dímeros ou até mesmo octâmeros, quando está no seu pl. Esta proteína não é produzida em humanos, contudo sua presença já foi relatada no leite materno principalmente após ingestão de leite de vaca. Essa proteína é absorvida pela mucosa do intestino e depositada no leite materno (WAL, 2004). As proteínas albumina sérica bovina (BSA) e imunoglobulinas também são potenciais alérgenos encontrados no leite bovino, entretanto enquanto que os mecanismos envolvidos na sensibilização a CN, β LG e α LA são semelhantes, a sensibilização a BSA parece ser completamente diferente (FIOCCHI et al., 2004).

1.6.3. Formulações

A forma mais efetiva de evitar os sintomas da alergia é cessar o consumo das proteínas do leite, contudo por ser um alimento de grande importância para o desenvolvimento da criança, eliminar o consumo pode não ser a solução. Em alguns casos, o leite bovino é substituído na dieta por leite de soja ou de cabra, porém as proteínas da soja também são potencialmente alergênicas, enquanto que muitas das proteínas do leite de cabra são similares as do leite bovino, podendo haver reação cruzada (HALKEN; HØST, 1997).

Desde a década de 1940, quando as primeiras fórmulas hipoalergênicas foram desenvolvidas (ROSENDAL; BARKHOLT, 2000), existem no mercado diversos produtos capazes de substituir o uso do leite integral por crianças alérgicas. Essas fórmulas podem ser compostas por aminoácidos, sendo indicadas nos casos mais extremos de alergia, porém na maioria dos casos são produzidas por hidrólise enzimática das proteínas do leite, podendo gerar de acordo com o grau de hidrólise, leites parcialmente e extensivamente hidrolisados. Apesar do constante uso desses termos na literatura, não há critério bem definido para classificar o leite hidrolisado em uma dessas categorias (HALKEN; HØST, 1997). Alguns exemplos de leites hipoalergênicos são: Enfamil Gentlease (parcialmente hidrolisado) e Aptamil Pepti (extensivamente hidrolisado) (Figura 4).

Figura 4 – Leites hipoalergênicos comerciais



Legenda: (A) leite parcialmente hidrolisado e (B) leite extensivamente hidrolisado. Fonte: <http://www.drogaraia.com.br/>

Apesar dos benefícios à saúde, alguns fatores são relatados como limitantes à utilização dessas fórmulas hipoalergênicas. Primeiramente, leites hidrolisados podem apresentar gosto desagradável. Leites extensivamente hidrolisados são relatados como amargos devido a uma concentração elevada de peptídeos hidrofóbicos (ROSENDAL; BARKHOLT, 2000), fator que pode ser crítico para a aceitação do produto por crianças. Além disso, leites extensivamente hidrolisados e, principalmente, os compostos apenas por aminoácidos livres possuem preços elevados, sendo muitas vezes inacessível.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Determinar o potencial das peptidases do extrato intestinal de *D. plexippus* na produção de um leite hipoalergênico.

Objetivos específicos

1. Extrair as peptidases do intestino de lagartas da espécie *D. plexippus*;
2. Determinar a atividade proteolítica do extrato;
3. Purificar as frações caseínas, lactosoro e β -lactoglobulina do leite bovino;
4. Determinar o potencial de hidrólise das peptidases intestinais de *D. plexippus* sobre as frações purificadas, por zimograma, eletroforese e ensaios *in vitro*;
5. Comparar por eletroforese os hidrolisados obtidos com fórmulas hipoalergênicas comerciais;
6. Utilizar estratégias cromatográficas para purificar uma peptidase a partir do extrato intestinal de *D. plexippus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do extrato intestinal

O trato digestório de larvas de *D. plexippus* foi retirado com o auxílio de pinças em recipientes contendo gelo. O intestino foi retirado e homogeneizado em NaCl 0,15 M. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi filtrado em algodão, dialisado contra água destilada, usando membranas de diálise com poros de 8 kDa e liofilizado. O material obtido foi denominado de extrato intestinal total (EIT).

3.2. Perfil protéico do extrato intestinal total

Alíquotas do EIT foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,31 M pH 6,8 contendo SDS 5% e glicerol 10% e aplicada em um gel de empilhamento contendo 5% de acrilamida e 1% de SDS, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. As proteínas foram separadas no gel de separação contendo acrilamida 12,5% e SDS 1% em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8. As dimensões do gel de separação foram 8 x 7,5 x 0,1 cm. A corrida eletroforética ocorreu sob condições constantes (130 V, 30 mA e 25°C). Utilizou-se para a corrida tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (LAEMMLI, 1970). O gel de eletroforese foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,2%) e descorado em uma solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6 (v/v/v). A quantidade de proteína em EIT foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976).

3.3. Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato

A atividade proteolítica total do EIT foi determinada usando azocaseína (1%) como substrato inespecífico. Foram utilizados 50 µL do EIT (0,5 mg/ml em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0 ou 6,5) mais 250 µL do tampão em que o EIT estava dissolvido. Foram adicionados 200 µL de azocaseína 1% e as reações foram incubadas por uma hora a 37 °C. Após esse período, as reações foram paradas com adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Os tubos

foram centrifugados a 10000 x g por 10 minutos e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados pela adição de 400 µL de NaOH 2 N. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata (XAVIER-FILHO et al., 1989). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01.

3.4. Atividade proteolítica utilizando BApNA como substrato

A atividade específica para peptidases do tipo serínicas foi realizada usando BApNA como substrato (GOMES et al., 2005). Foram utilizados 50 µL de EIT não liofilizado mais 250 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Foram adicionados 200 µL de BApNA (1,25 mM) e as reações foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. As reações foram interrompidas pela adição de 150 µL de ácido acético 30%. A leitura da absorbância ocorreu em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5. Ensaio de autólise

A fração EIT (2 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,0) foi mantida em diferentes temperaturas (37, 25 e 4 °C). Alíquotas de 50 µL foram retiradas nos tempos: 0 (controle), 1, 2, 4 e 24 horas para determinação da atividade proteolítica residual de acordo como descrito no item 3.3. Foram retiradas alíquotas de 100 µL nos mesmos intervalos e misturadas com 25 µL de tampão Tris-HCl 0,31 M (pH 6,8) contendo SDS 5% e glicerol 10%. A solução foi aquecida por 5 minutos a 100 °C e o grau de autólise foi visualizado em gel de poliacrilamida 12,5% como descrito no item 3.2.

3.6. Purificação das frações caseína, lactosoro e β -lactoglobulina do leite bovino

Leite bovino integral e pausterizado, obtido comercialmente, foi centrifugado a 2100 x g por 30 minutos a 32 °C, para separação da gordura. Ao sobrenadante, foi adicionado HCl 1 M até pH 4,6, seguido de nova centrifugação a 1500 x g por 20 minutos a 20 °C para separação das caseínas das proteínas do soro (EGITO et al., 2007). A fração precipitada (caseínas) foi lavada três vezes com água e centrifugadas como citado acima. O sobrenadante (lactosoro) e a fração contendo as caseínas foram dialisados contra água destilada usando membranas de diálise com poro de 8 kDa por 48 horas a 4 °C. As duas frações foram liofilizadas separadamente para os ensaios posteriores.

Para a purificação da proteína β -lactoalbumina o pH da fração lactosoro foi ajustado para 2,0 pela adição de HCl 2 N. A solução foi incubada com pepsina na proporção 1:200 (massa/massa) por 1 hora a 37 °C. Após o tempo de reação com a enzima, as proteínas foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio 75%, permanecendo overnight. A solução foi centrifugada a 20.800 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada e liofilizado.

3.7. Hidrólise das proteínas do leite

3.7.1. Zimograma

A atividade proteolítica do EIT sobre diferentes substratos foi analisada em gel de poliacrilamida 12,5%. O gel foi preparado conforme explicado no item 3.2, porém o gel de separação continha gelatina (0,1%), caseína (0,2%), lactosoro (0,2%) ou β -lactoglobulina (0,2%). Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi lavado 2 vezes de 20 minutos cada, com Triton X-100 2,5% e posteriormente incubado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,0 ou 6,5, por 1 hora. Os géis foram corados em solução de Comassie Brilliant Blue R-250 (0,2%). Bandas transparentes indicaram a atividade proteolítica.

3.7.2. In vitro

Alíquotas das frações purificadas (caseína, lactosoro e β -lactoglobulina) foram separadamente incubadas a 37 °C com EIT em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,0 mantendo as seguintes proporções de enzima:substrato 1:25, 1:50 e 1:100 (massa/massa). Foram coletadas das reações alíquotas de 100 μ L nos tempos 1, 2, 4 e 24 horas e misturadas a 25 μ L do tampão Tris-HCl 0,31 M, pH 6,8, contendo SDS 5% e glicerol 10%. A solução foi aquecida a 100 °C por 5 min e posteriormente foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% conforme descrito no item 3.2.

A quantificação da hidrólise ocorreu utilizando TCA (RUTHERFURD, 2010). Foram retiradas alíquotas de 200 μ L dos hidrolisados proteicos nos tempos mencionados anteriormente e a estes hidrolisados foram adicionados 200 μ L de TCA 12%. Os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 10 minutos a 10 °C e a absorbância do sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm.

Ensaio de hidrólise independentes foram realizados utilizando a proteína β -lactoglobulina pré-aquecida a 85 °C por 30 minutos.

3.8. Purificação das proteases do EIT

3.8.1. Cromatografia de troca iônica

Foram aplicados 0,5 mL de EIT nas colunas CM Sepharose Fast Flow (trocadora de cátions) e em DEAE Sepharose Fast Flow (trocadora de ânions) acopladas a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (AKTA). As colunas foram previamente equilibradas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2. As proteínas não ligadas nas colunas foram lavadas com o tampão de equilíbrio, constituindo o pico não retido. As proteínas retidas nas colunas foram eluídas em gradientes lineares e stepwise de sal (NaCl) a um fluxo de 1 mL/minuto. Os picos foram detectados a 280 nm e foram coletados para serem analisados por eletroforese e quanto a sua atividade específica utilizando BApNA como substrato.

3.8.2. Cromatografia de afinidade

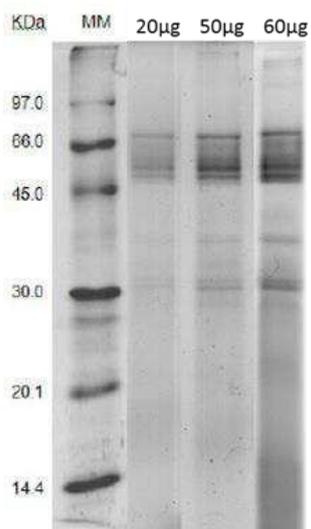
Foram aplicados 0,5 ml de EIT em uma coluna HiTrap-Benzamidina (coluna utilizada para a purificação de proteases serínicas), acoplada a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (AKTA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M. As proteínas não ligadas à coluna foram lavadas com o tampão de equilíbrio, constituindo o pico não retido. As proteínas retidas na coluna foram eluídas em tampão glicina 50 mM, pH 3,0 a um fluxo de 1 ml/minuto. Os picos protéicos tiveram sua absorvância determinada a 280 nm e foram coletados para serem analisados em gel zimograma contendo gelatina 0,1% e quanto a sua atividade específica utilizando BApNA como substrato.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das proteases

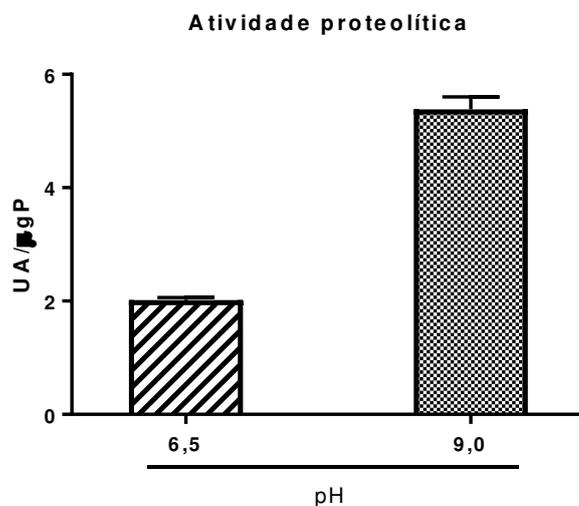
O perfil proteico do extrato intestinal total (EIT) revelou, por eletroforese, uma predominância de proteínas de alta massa molecular (Figura 5). A atividade proteolítica total do EIT foi mensurada por ensaio colorimétrico realizado a pH 9,0 e 6,5. Foi demonstrado que a atividade específica (UA/ μ gP) foi 2,6 vezes maior em pH 9,0, quando comparado a atividade da mesma amostra em pH 6,5 (Figura 6).

Figura 5 – Eletroforese em gel poliacrilamida (12,5%) do extrato intestinal total de *D. plexippus* (EIT), na ausência de β mercaptoetanol.



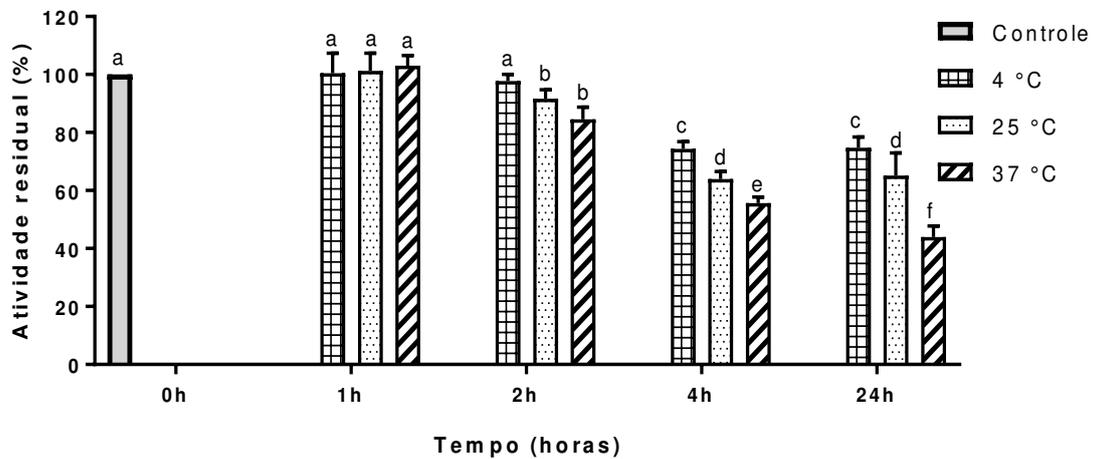
Os valores indicam a quantidade de proteínas aplicada em cada poço. Proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Figura 6 – Atividade proteolítica específica do extrato intestinal total de *D. plexippus*, utilizando azocaseína 1% como substrato.



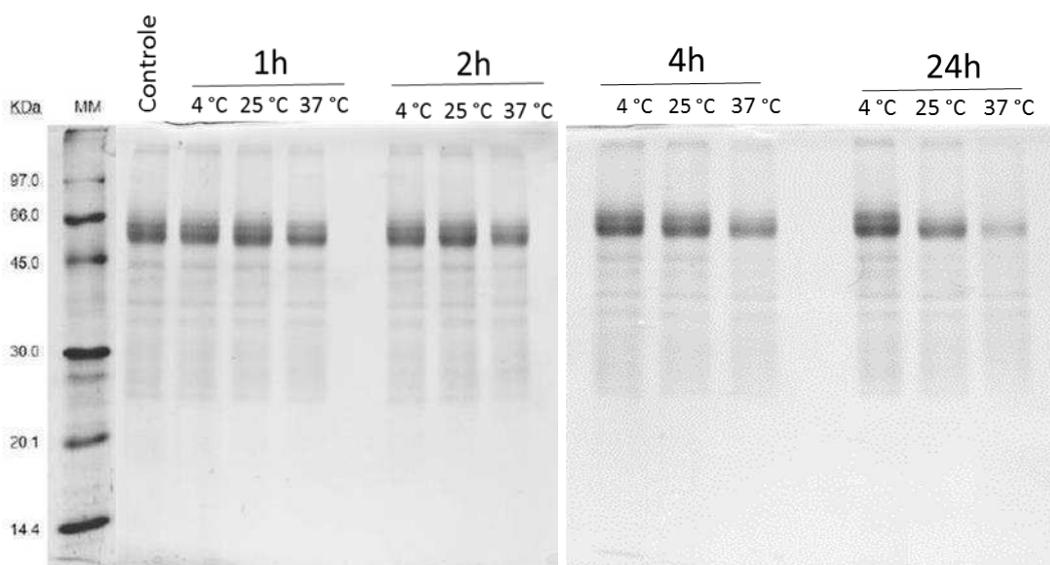
As peptidases intestinais foram testadas quanto a capacidade de se manterem ativas em solução através do tempo e da temperatura (Figura 7). Foi verificado que após 1 hora a atividade proteolítica é mantida constante em todas as temperaturas testadas, não sendo observado também, por eletroforese, autólise das bandas proteicas durante esse período (Figura 8). Após 4 horas a 37 °C, ocorreu uma redução de aproximadamente 50% da atividade proteolítica e após 24 horas, a atividade proteolítica residual foi registrada como sendo 44% da atividade inicial. Esses resultados colaboram com aqueles da eletroforese (Figura 8), em que houve uma redução da intensidade das bandas proteicas, demonstrando que a diminuição da atividade pode ser devido a autólise das peptidases.

Figura 7 – Efeito da temperatura e tempo na estabilidade das peptidases intestinais de *D. plexippus*, em pH 9,0, usando azocaseína 1% como substrato.



Legenda: As letras diferentes (a,b,c,d,e,f) indicam que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA, Teste de Tukey.

Figura 8 – Efeito do tempo e temperatura sobre a autólise das peptidases de EIT em pH 9,0.

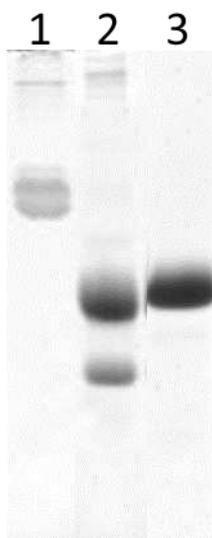


Gel de poliacrilamida 12,5%. Proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.2. Ensaio de degradação das proteínas do leite bovino

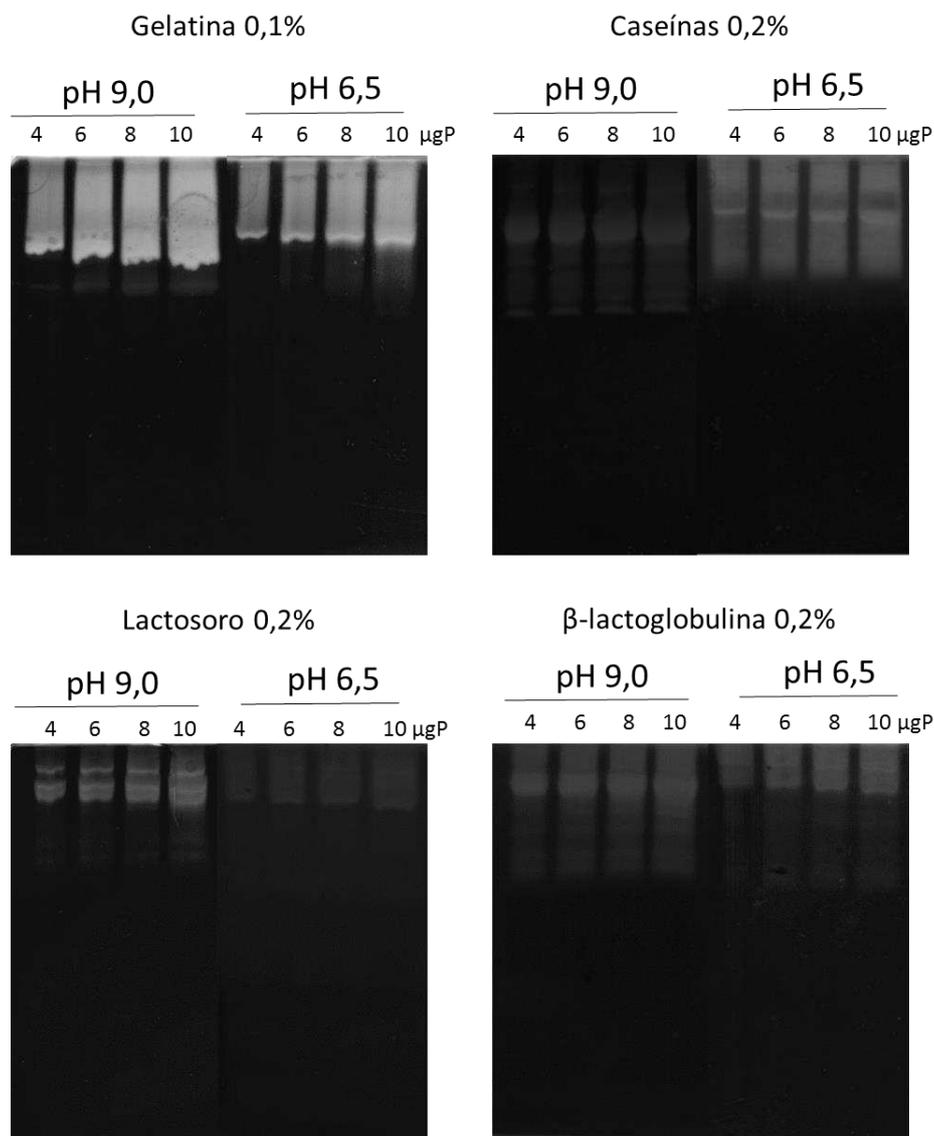
As frações caseínas, lactosoro e β -lactoglobulina do leite bovino foram isoladas (Figura 9) e utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática para determinar o potencial hidrolítico das peptidases intestinais (EIT) de *D. plexippus*. Foi demonstrado, através de zimogramas, que as peptidases intestinais foram capazes de hidrolisar gelatina (controle), caseínas, lactosoro e β -lactoglobulina (Figura 10). As hidrólises foram mais significativas em pH 9,0 para todos os substratos, corroborando com os resultados obtidos da atividade proteolítica *in vitro* (Figura 6).

Figura 9 – Eletroforese das frações purificadas



Legenda: 1 – Caseínas (~23,6 kDa); 2 – Lactosoro contendo β -lactoglobulina (~18,2 kDa) e α -lactalbumina (~14, kDa); 3 – β -lactoglobulina (~18,2 kDa).

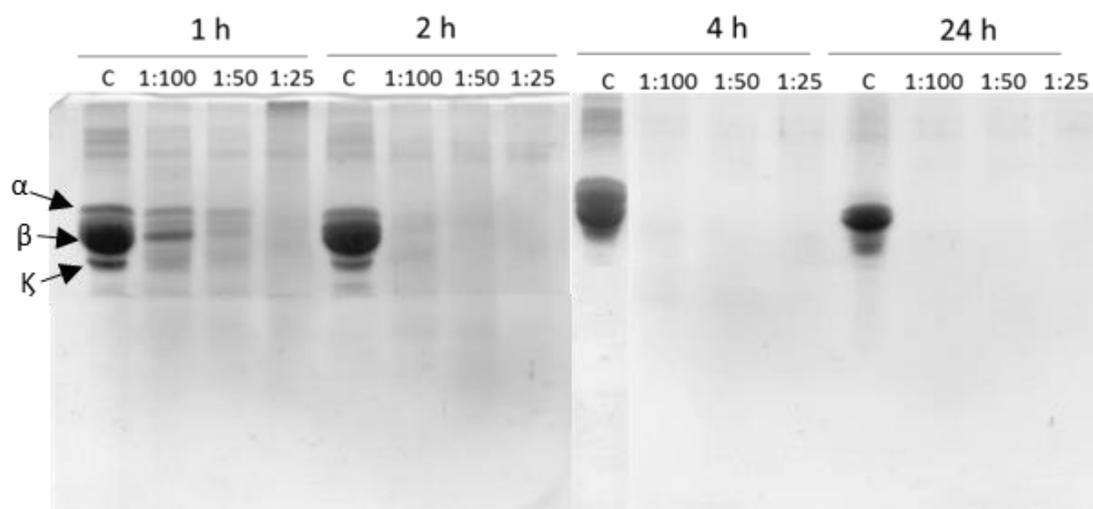
Figura 10 – Zimograma para detecção de atividade proteolítica de EIT sobre diferentes substratos e valores de pH.



Os géis foram incubados a 37 °C por uma hora em pHs 6,5 e 9,0.

As peptidases intestinais foram capazes de hidrolisar as três caseínas, α -, β - e κ -caseína (Figura 11), logo após 1 hora de incubação e na maior diluição (1:100). Na menor diluição (1:25), houve uma hidrólise extensiva das bandas proteicas das caseínas. Após 2, 4 ou 24 horas, foi observado uma hidrólise de 100% das caseínas, mesmo na menor concentração de enzima testada (1:100).

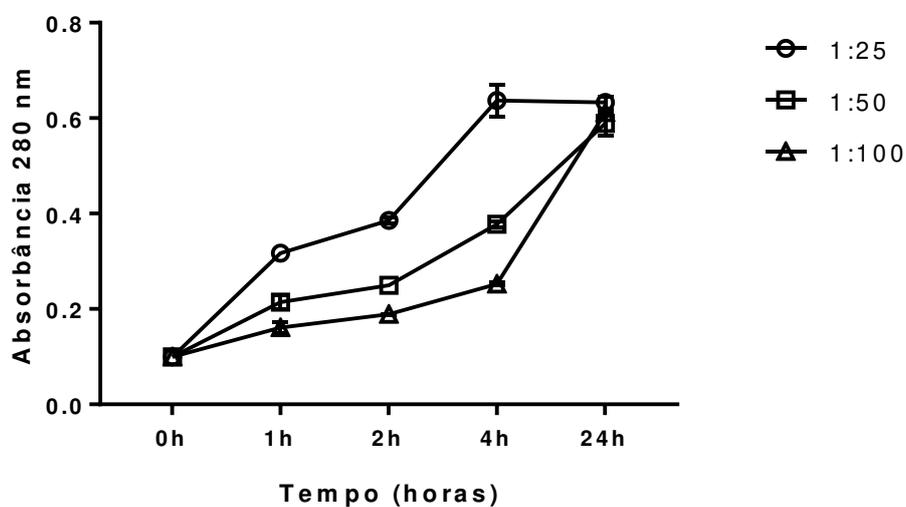
Figura 11 – Avaliação da hidrólise das caseínas pelas peptidases intestinais de *D. plexippus* após diferentes tempos e a 37 °C, através de eletroforese em gel de poliacrilamida.



Perfil de hidrólise das caseínas pelas peptidases intestinais em gel de poliacrilamida 15%, foi aplicado 50 µg de proteína em cada poço.

A hidrólise das caseínas também foi avaliada por espectrofotometria a 280 nm, utilizando as mesmas amostras avaliadas por eletroforese (Figura 11). Pode ser observado um aumento da absorbância a 280 nm entre os intervalos de 2, 4 e 24 horas, colaborando com os resultados da eletroforese (Figura 11).

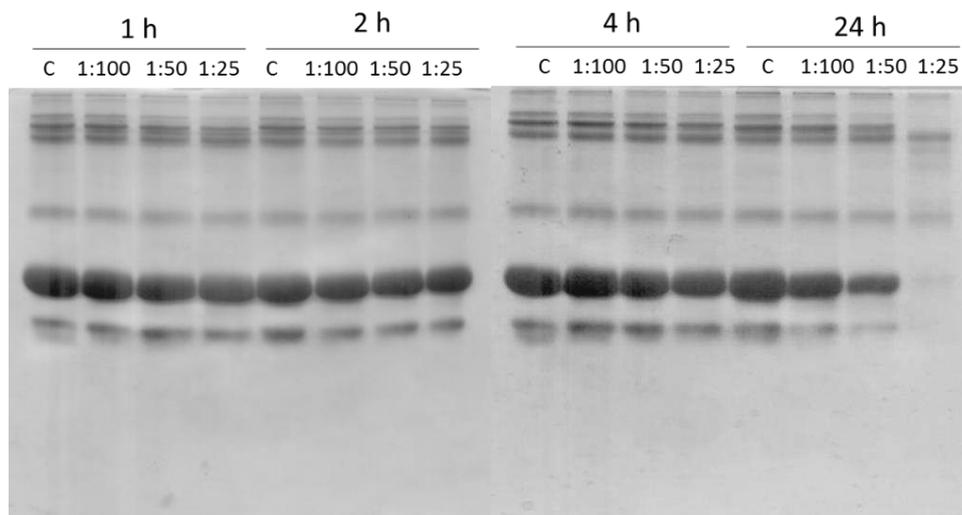
Figura 12 - Avaliação da hidrólise das caseínas pelas peptidases intestinais de *D. plexippus* após diferentes tempos e a 37 °C, através de ensaios espectrofotométricos.



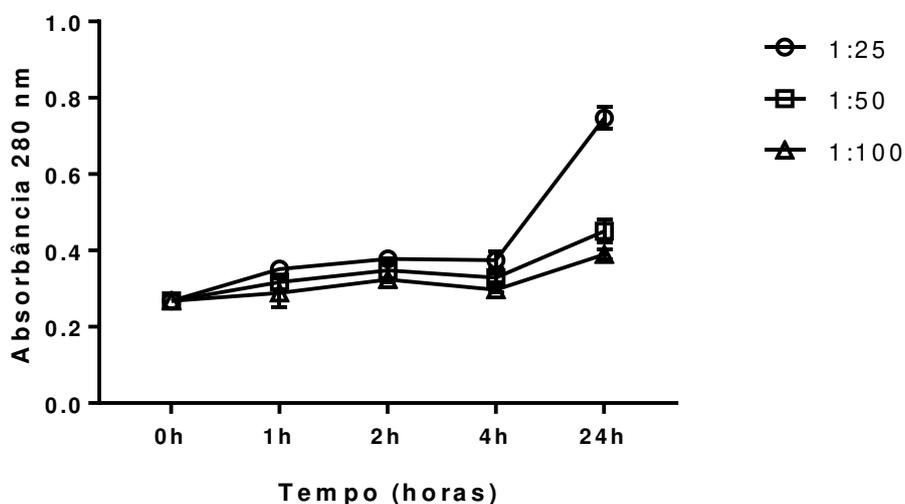
A fração lactosoro mostrou-se resistente a hidrólise pelas peptidases intestinais, a pH 9,0 e 37 °C, sendo observado, em gel de eletroforese, uma constância nas bandas proteicas referentes à α -lactalbumina e β -lactoglobulina (Figura 13A). Entretanto após 24 horas de incubação, foi observado uma redução na intensidade das bandas proteicas (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) nas maiores concentrações de enzima utilizadas (1:50 e 1:25). Esses resultados foram confirmados pelo aumento da absorvância a 280 nm (Figura 13B).

Figura 13 – Avaliação da hidrólise do lactosoro bovino pelas peptidases intestinais de *D. plexippus*, através de eletroforese (A) e espectrofotometria (B).

(A)



(B)

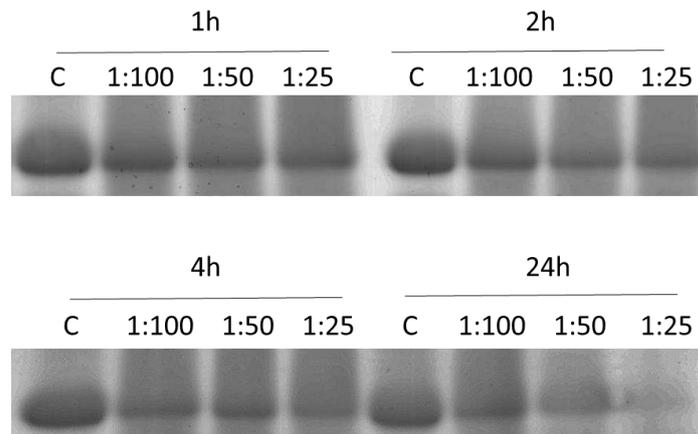


A proteína β -lactoglobulina foi purificada da fração lactosoro, para estudar melhor o grau de hidrólise desta proteína pelas peptidases intestinais de *D. plexippus* (Figura 9). Devido à alta resistência desta proteína à hidrólise enzimática (Figura 13), ela foi pré-aquecida a 85 °C por 30 minutos e depois incubadas com as peptidases intestinais de *D. plexippus* em diferentes

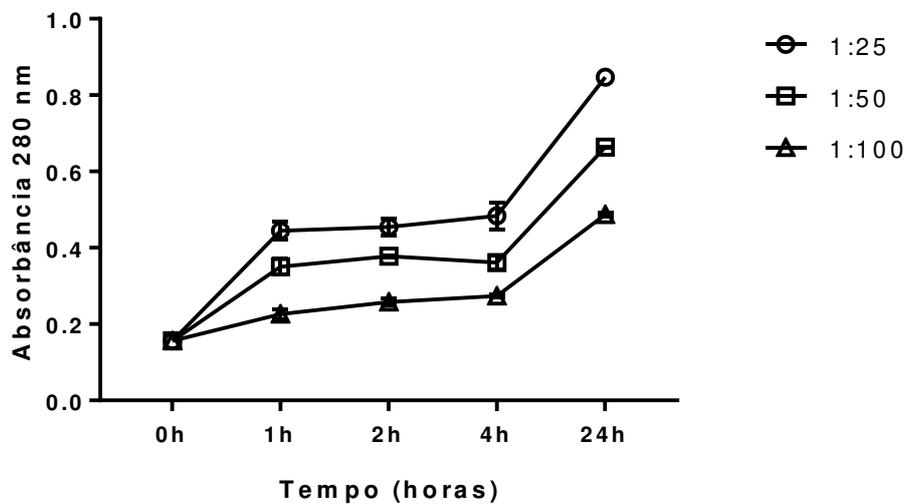
concentrações e tempo (Figura 14A). Os resultados mostram uma redução das bandas proteicas em gel de eletroforese a partir de 1 hora de incubação. Um maior grau de hidrólise dessa proteína pôde ser verificado após 4 e 24 horas de incubação. O aumento do grau de hidrólise da proteína β -lactoglobulina também foi observado pelo aumento da absorbância a 280 nm (Figura 14B), confirmando os resultados da eletroforese.

Figura 14 – Avaliação da hidrólise da proteína β -lactoglobulina pelas peptidases intestinais de *D. plexippus*, através de eletroforese (A) e espectrofotometria (B).

(A)

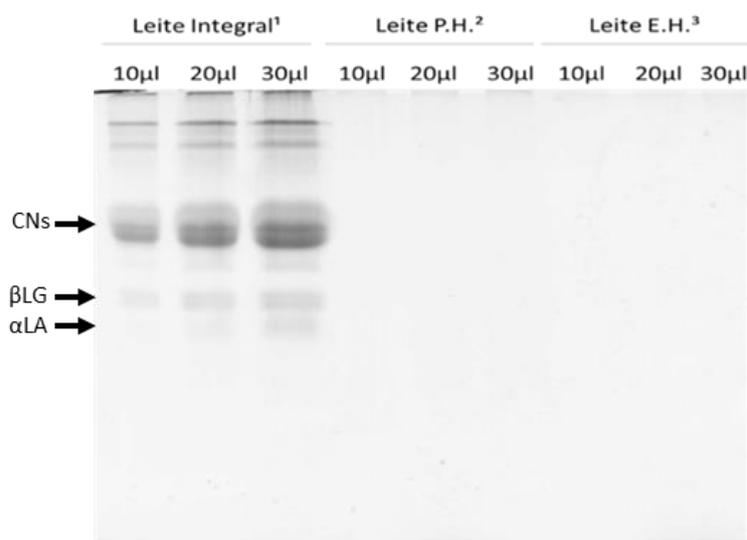


(B)



Diferentes leites hidrolisados, obtidos comercialmente, foram estudados por eletroforese para fins de comparação com o leite hidrolisado pelas peptidases intestinais de *D. plexippus*. Foram utilizados três leites, um parcialmente hidrolisado (Enfamil Gentlease), um extensivamente hidrolisado (Aptamil Pepti) e um integral como controle (Ninho). A eletroforese mostrou que no leite integral Ninho as caseínas e as proteínas do lactosoro estão presentes intactas, enquanto nas fórmulas hidrolisadas elas estavam ausentes (Figura 15).

Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de diferentes leites comerciais.

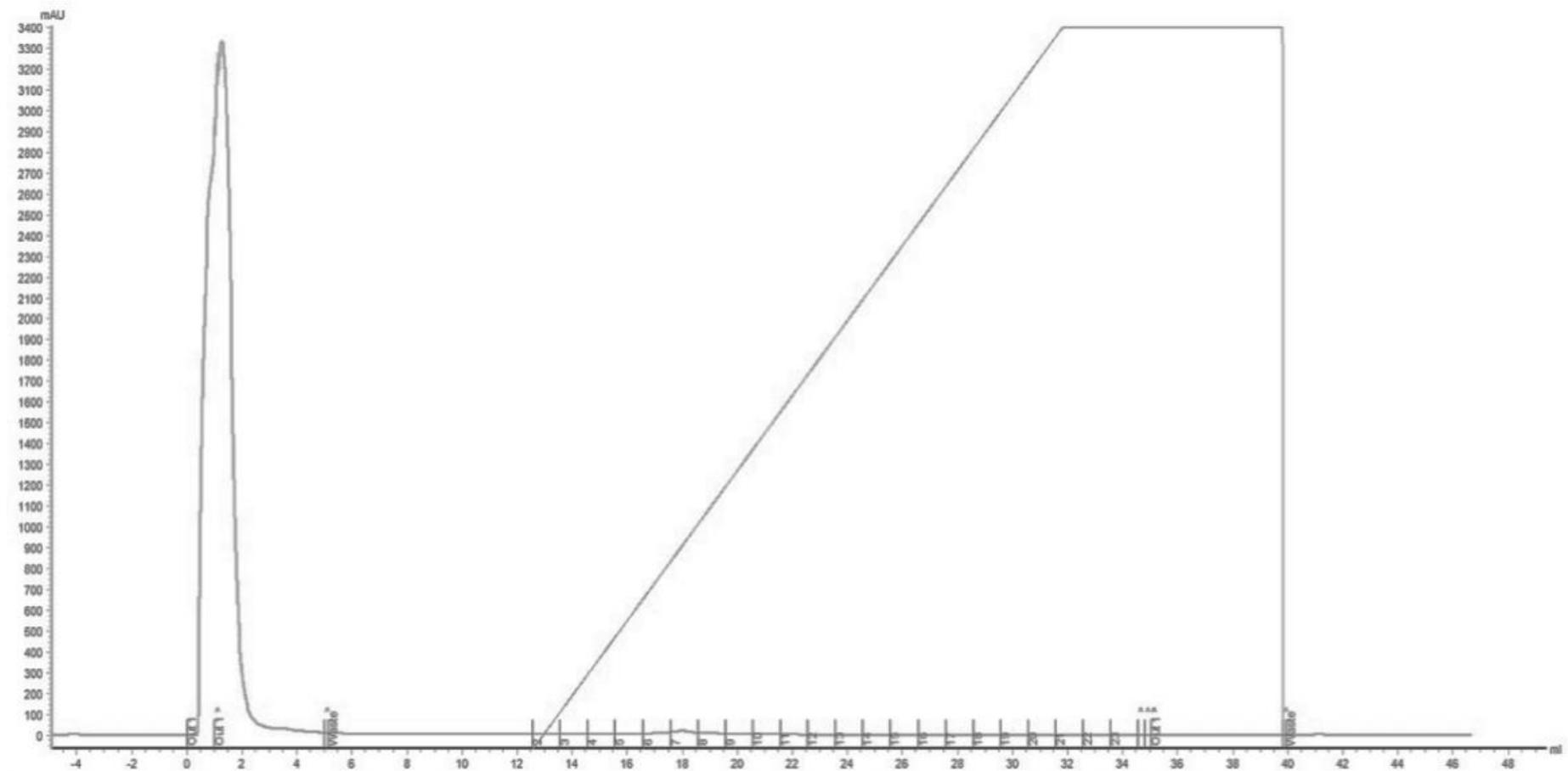


Legenda: 1 - Leite Integral: Ninho; 2 - Leite parcialmente hidrolisado: Enfamil Gentlease; 3 - Leite extensivamente hidrolisado: Aptamil Pepti; CNs – Caseínas; βLG – β-lactoglobulina; αLA - α-lactalbumina. Leites na concentração de 10 mg/ml. É indicado na figura a quantidade aplicada em cada poço.

4.3. Etapas cromatográficas

O extrato intestinal de *D. plexippus* foi submetido a diferentes cromatografias com o objetivo de purificar as suas peptidases. A primeira cromatografia foi realizada em coluna de CM- sepharose fast flow a pH 7,2. Como mostrado na figura 16, não houve proteínas retidas na coluna, indicando a ausência de proteínas positivamente carregadas no pH 7,2.

Figura 16 – Cromatografia de troca iônica em coluna CM-sepharose fast flow do extrato intestinal de *D. plexippus* em pH 7,2.

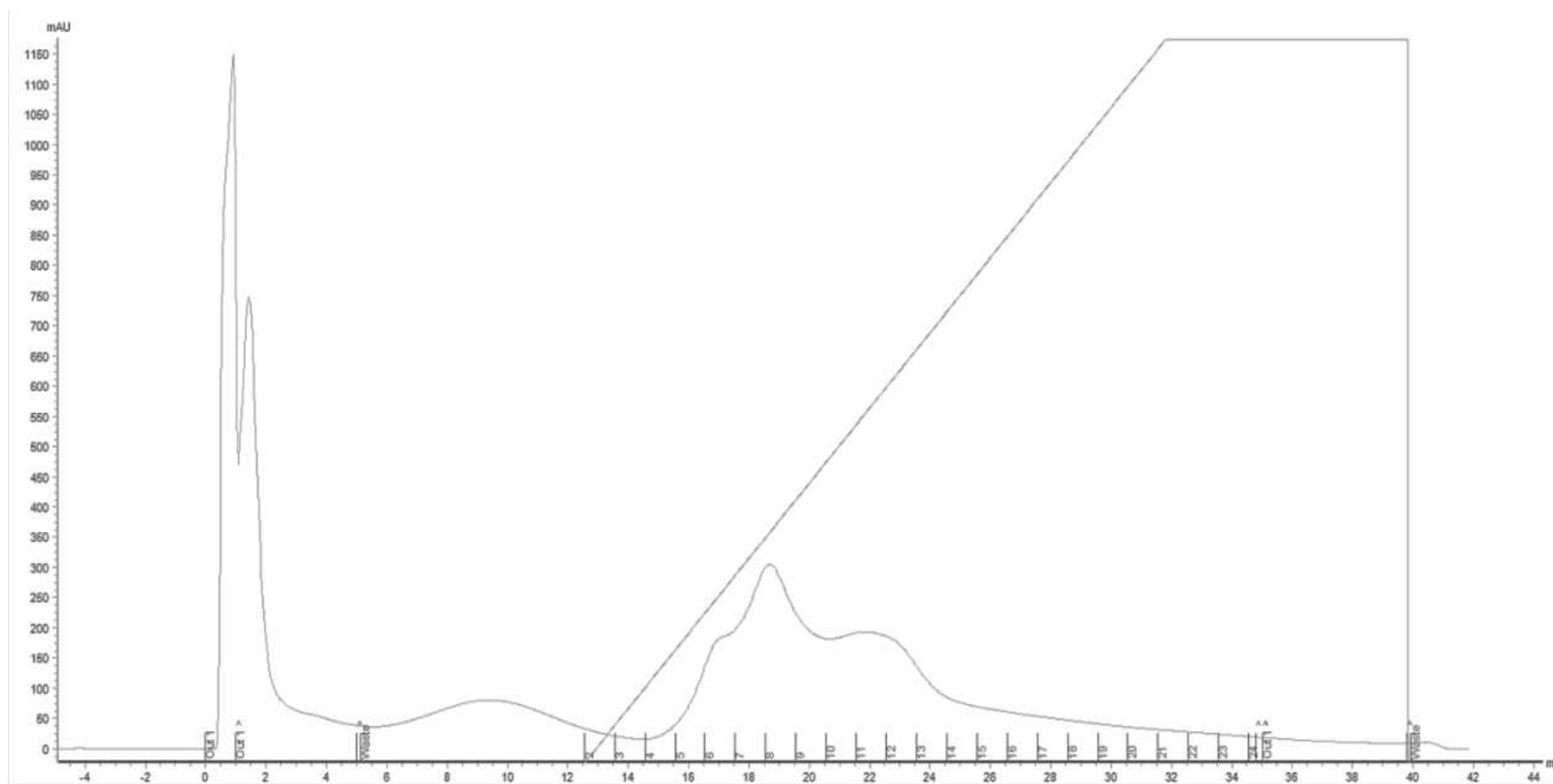


Legenda: Coluna de 1 ml. Fluxo 1 ml/min. Abs a 280 nm. O gradiente salino utilizado foi de 20 ml (0 - 1 M NaCl).

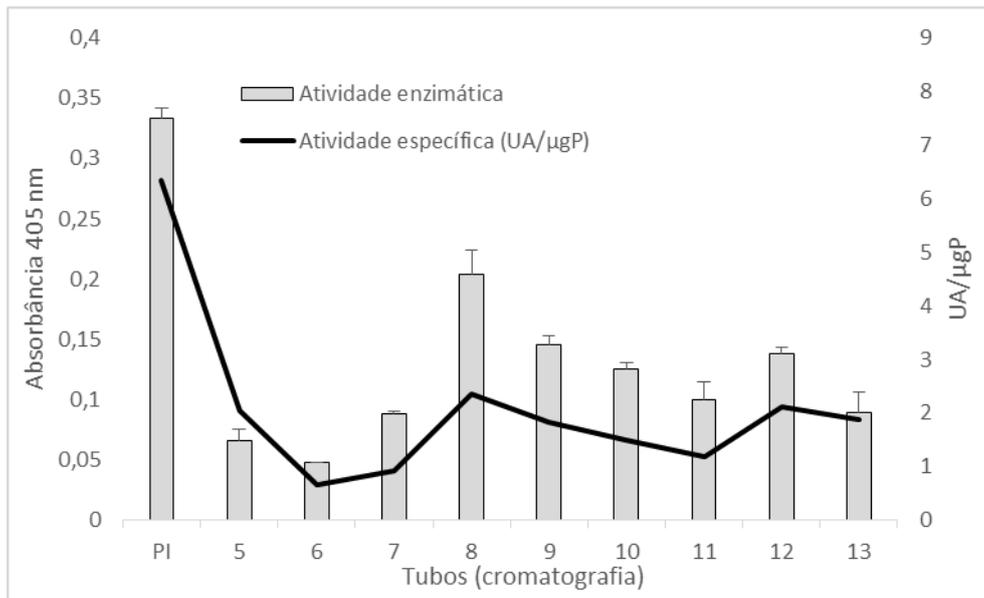
Como não houve proteínas retidas na cromatografia de troca iônica em coluna de CM-sepharose fast flow (pH 7,2), o extrato intestinal foi aplicado em uma coluna de DEAE sepharose fast flow nas mesmas condições de tampão e pH. Foram obtidos 4 picos: um pico não retido e três picos eluídos em um gradiente de sal (Figura 17). As frações foram coletadas e as atividades proteolíticas determinadas usando BApNA como substrato (Figura 17). A atividade específica foi maior no pico não retido, apresentando 3 vezes mais atividade que as frações retidas na coluna.

Figura 17 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-sepharose fast flow em pH 7,2. (A) Cromatograma das proteínas eluídas em gradiente linear de sal. (B) Atividade proteolítica dos picos para peptidases séricas.

(A)



(B)

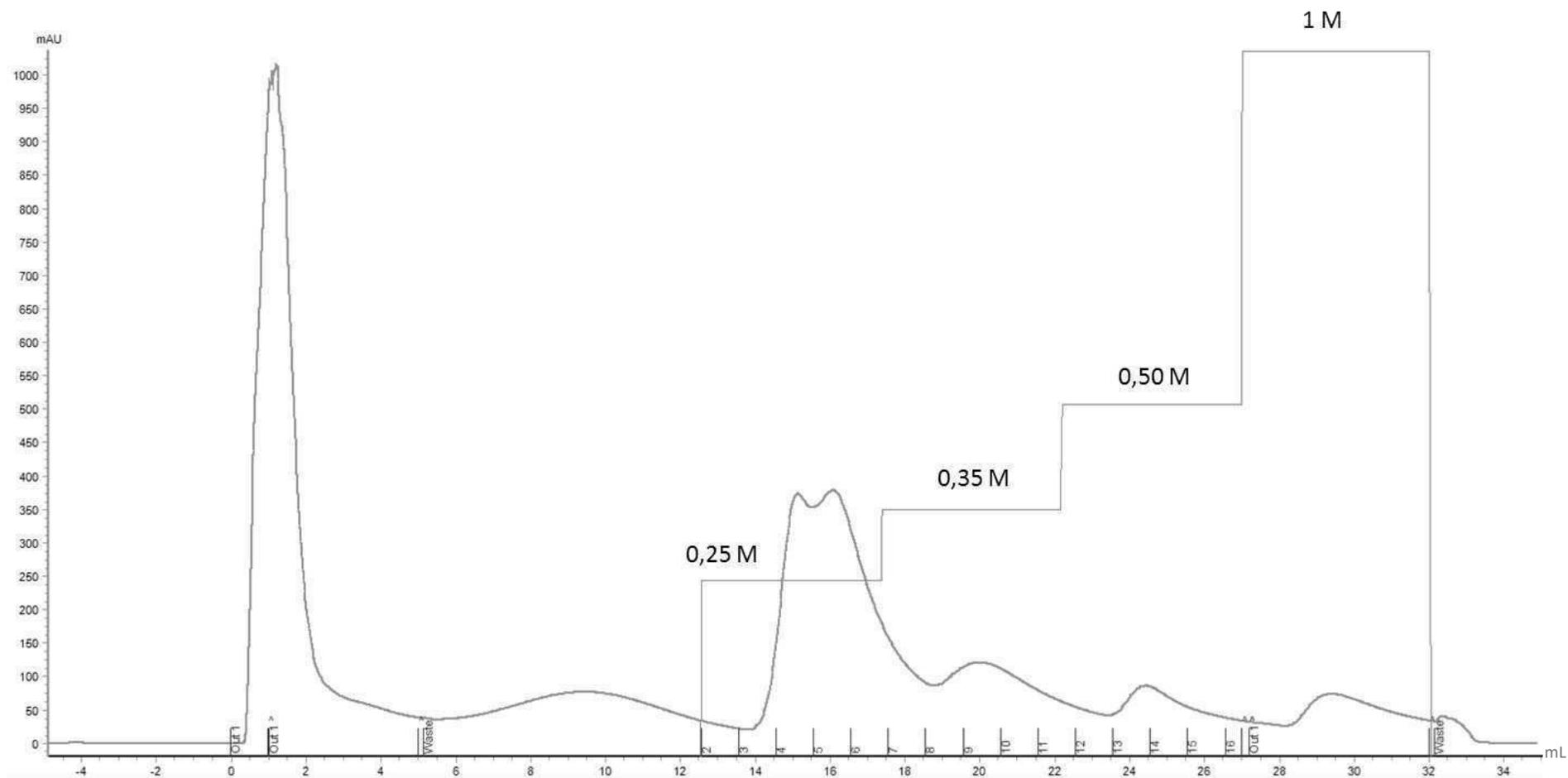


(A) Coluna de 1 ml. Fluxo 1 ml/min. Abs a 280 nm. O gradiente salino utilizado foi de 20 ml (0 - 1 M NaCl). As proteínas foram eluídas em tampão Tris pH 7,2. (B) Atividade enzimática para peptidases serínicas x atividade específica das peptidases ao longo dos picos obtidos. PI: pico não retido.

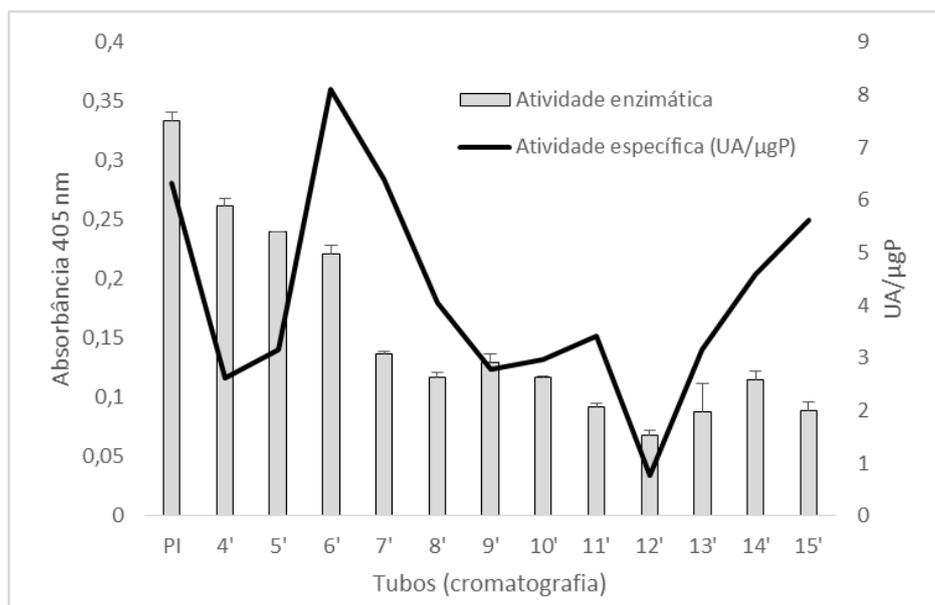
Como a resolução da cromatografia em DEAE sepharose fast flow, usando um gradiente para eluição das proteínas retidas foi ruim, novas cromatografias foram realizadas usando diferentes concentrações fixas de sal ("StepWise") dos picos retidos. A figura 18 mostra que houve uma melhora na separação das proteínas retidas na coluna. O pico eluído com 0,25 M de NaCl apresentou maior atividade proteolítica específica, possuindo assim uma maior concentração de peptidases do tipo serínicas. O perfil proteico de cada fração pode ser observado na figura 18 C.

Figura 18 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-sepharose fast flow. (A) Cromatograma. (B) Atividade enzimática e (C) perfil proteico dos picos.

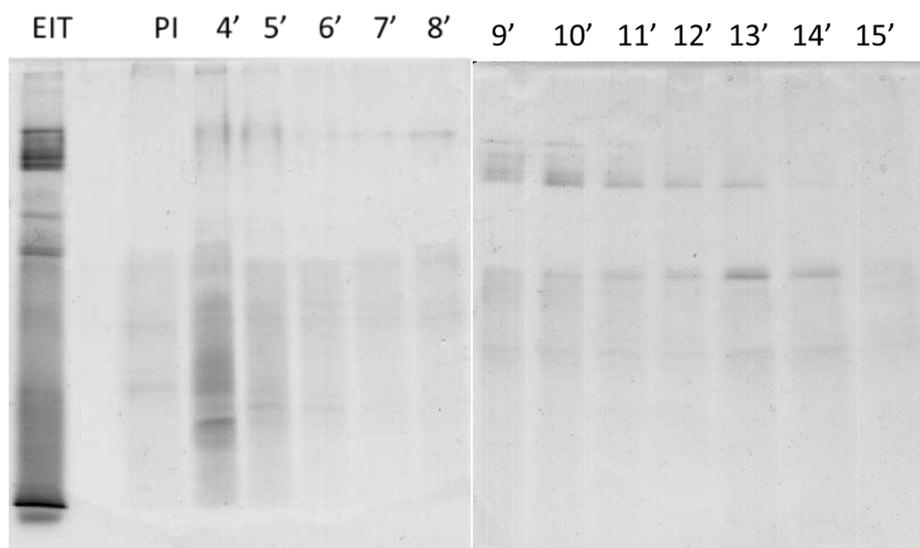
(A)



(B)



(C)



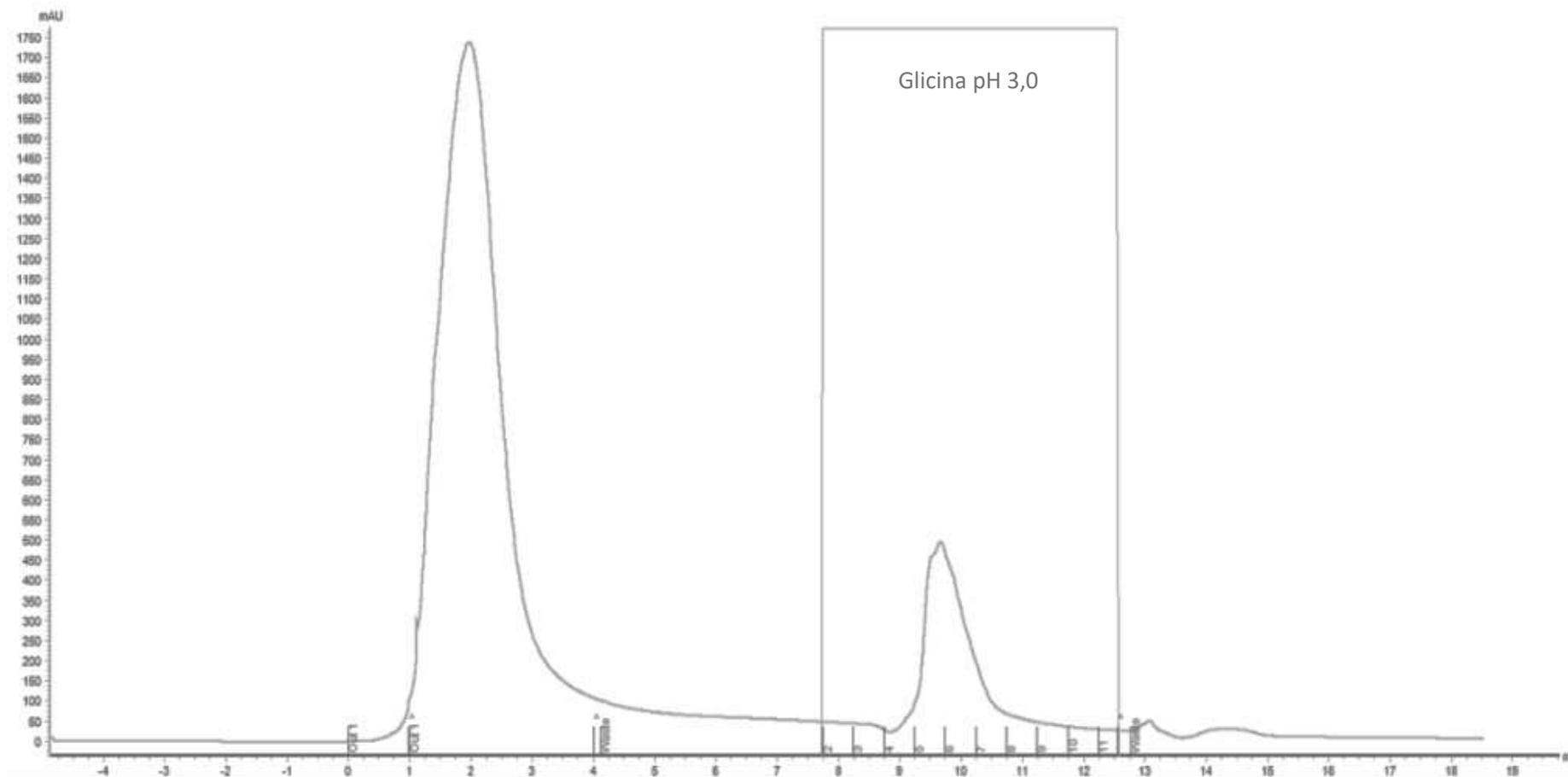
(A) Coluna de 1 ml. Fluxo 1 ml/min. Abs a 280 nm. Proteínas eluídas em gradiente stepwise de sal, em tampão Tris pH 7,2. É indicado na figura a concentração de NaCl em que foi eluído cada pico; (B) Atividade enzimática para peptidases serínicas x atividade específica das peptidases ao longo dos picos obtidos; (C) Perfil proteico das frações da cromatografia em gel de poliacrilamida 12,5% na ausência de agente redutor. PI: pico não retido; EIT: extrato intestinal total

Trabalhos anteriores mostraram que as peptidases serínicas são predominantes no extrato intestinal de *D. plexippus*, assim foi utilizada uma coluna HiTrap-Benzamidina como outra estratégia para a purificação destas peptidases. A cromatografia de afinidade em coluna de HiTrap-Benzamidina

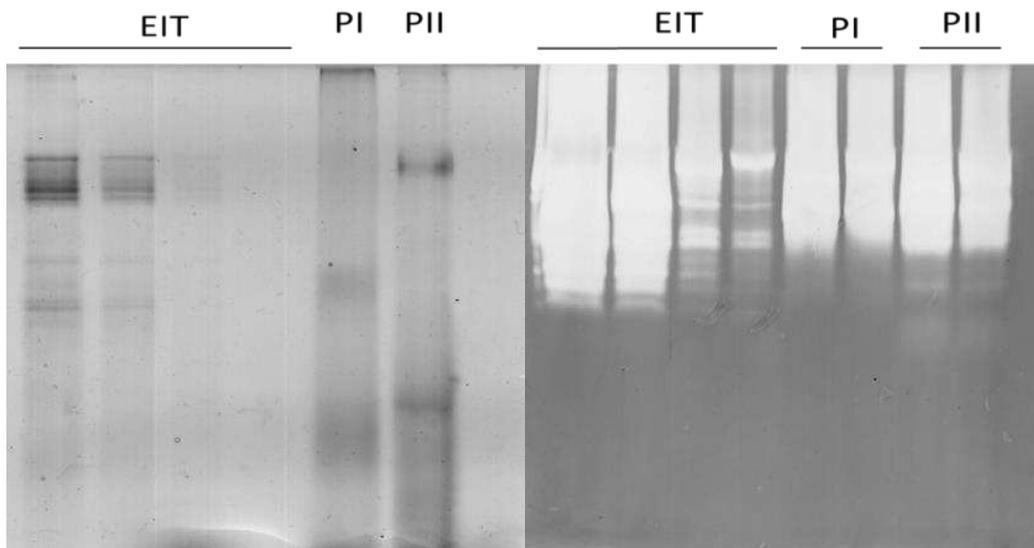
separou as proteínas do extrato intestinal de duas frações, uma não retida e outra retida, que foi eluída com tampão glicina pH 3.0 (Figura 19). A atividade proteolítica específica para peptidases serínicas como esperado foi maior para no pico retido, comparado ao não pico retido e o extrato total. Além disso, foi observado atividade proteolítica em gel zimograma no pico não retido, indicando a presença de outros tipos de peptidases no extrato intestinal ou a saturação da coluna (Figura 19).

Figura 19 – Cromatografia de afinidade para peptidases serínicas do extrato intestinal de *D. plexippus* em coluna HiTrap-Benzamidina (A). (B) Zimograma para detecção de peptidases e (C) Atividade proteolítica específica para peptidases serínicas dos picos cromatográficos

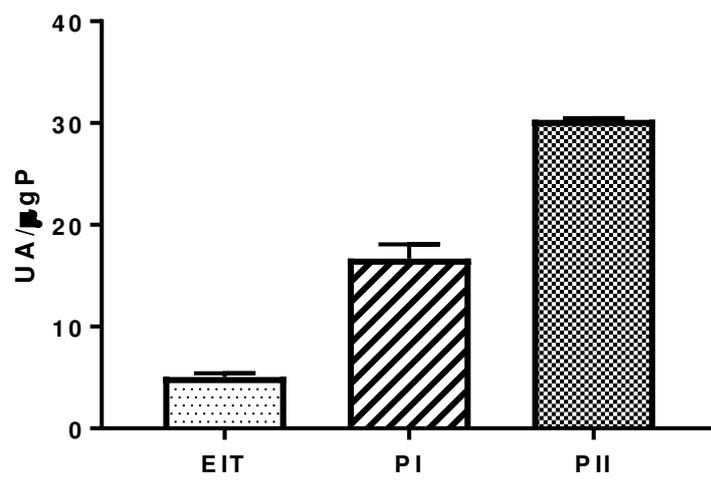
(A)



(B)



(C)



4. DISCUSSÃO

O extrato intestinal de *D. plexippus* é uma rica fonte de peptidases. Trabalhos anteriores mostraram a ação proteolítica desse extrato sobre outras peptidases presentes no látex de *C. procera* (PEREIRA et al., 2010); destacando assim o potencial das enzimas digestivas desse organismo e a necessidade de uma busca por novas aplicações. Nesse contexto, as peptidases intestinais foram testadas quanto a sua capacidade de hidrolisar as proteínas do leite bovino e conseqüentemente produzir um hidrolisado hipoalergênico.

A partir de ensaios colorimétricos foi observado que a atividade proteolítica das peptidases intestinais de *D. plexippus* foi maior em pH 9,0, comparado ao pH 6,5, demonstrando, de acordo com o observado por Pereira e colaboradores (2010) que a atividade proteolítica aumenta, acompanhando o aumento do pH. Peptidases do tipo serínicas são geralmente encontradas no trato intestinal de larvas da ordem lepidóptera (CHRISTELLE et al., 1992; CHOUGULE et al., 2008) e sabendo que esse tipo de peptidase geralmente está presente no lúmen do intestino sob condições alcalinas (CHRISTELLER et al., 1989), isso sugere uma predominância desse tipo de peptidase no extrato intestinal de *D. plexippus* (PEREIRA et al., 2010).

O pH 6,5 foi utilizado nos ensaios por ser o valor referente ao pH do leite bovino, tendo como objetivo investigar a ação das peptidases intestinais sobre as proteínas, caseínas, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, em condições relativamente neutras. Foi observado que neste valor de pH a atividade proteolítica específica é menor, resultado de uma perda da atividade das enzimas utilizadas. Isso ocorre pois em valores de pH diferentes do considerado ótimo para uma enzima alguns resíduos de aminoácidos têm sua carga alterada ocasionando modificações na estrutura tridimensional da proteína ou mudanças no seu sítio ativo, dificultando a interação enzima-substrato.

As peptidases intestinais de *D. plexippus* mostraram-se estáveis em solução tampão a pH 9,0 durante 1 hora de incubação, contudo essa estabilidade não se manteve em intervalos de tempos maiores, onde foi observado por eletroforese uma autólise da fração proteolítica e conseqüentemente a redução

na atividade enzimática. A capacidade de manter-se íntegra e com 100% de sua atividade varia entre as diferentes enzimas proteolíticas, sendo influenciado pelo tempo e a temperatura de incubação (CHEN et al., 2003).

O crescente aumento na incidência de alergia ao leite de vaca em crianças tem levado a uma constante busca de alternativas para eliminar a alergenicidade das proteínas presentes nesse alimento. São vários os métodos descritos na literatura, tais como altas temperaturas e pressões; reações de glicação e a hidrólise enzimática, sendo este último o mais utilizado no mercado (BU et al., 2013).

A capacidade das peptidases intestinais em hidrolisar as proteínas do leite bovino foi testada primeiramente em gel zimograma, sendo possível observar, de forma qualitativa, a hidrólise dos substratos. Novamente o pH foi determinante para um maior grau de hidrólise. Foi possível observar a hidrólise de todos os substratos nos dois valores de pH testados, contudo esta foi mais significativa em pH 9,0. Esses resultados evidenciaram uma nova possibilidade de utilização das peptidases de *D. plexippus* que foi mais profundamente investigado em ensaios posteriores.

Os ensaios *in vitro* de hidrólise ocorreram apenas em pH 9,0 uma vez que as peptidases intestinais mostraram-se mais eficientes na hidrólise das proteínas do leite em condições alcalinas. As caseínas são facilmente hidrolisadas tanto em sistemas *in vivo* quanto em ensaios *in vitro* (DO; WILLIAMS; TOOMER, 2016; DO et al., 2016). As peptidases intestinais de *D. plexippus* foram capazes de hidrolisar as três caseínas como pode ser observado por eletroforese; a hidrólise ocorreu mesmo no menor tempo analisado (1 hora) e prosseguiu até o maior intervalo da reação (24 horas). A partir de 2 horas de incubação com as enzimas, não foi mais observado a presença de bandas proteicas referente às caseínas no gel de eletroforese, mesmo na menor concentração de enzima utilizada (1:100).

O grau de hidrólise das caseínas foi acompanhado por ensaios espectrofotométricos. As peptidases intestinais foram capazes de realizar a hidrólise extensiva das caseínas, mesmo na menor concentração de enzima utilizada (1:100) a partir de 2 horas de reação. Essa hidrólise extensiva foi

observada pelo aumento da leitura de absorvância a 280 nm dos hidrolisados mesmo quando não foi mais visualizado bandas proteicas referentes às caseínas no gel de eletroforese. Os hidrolisados de caseína obtidos a partir dos ensaios com uma maior concentração de enzima (1:25) alcançaram um máximo grau de hidrólise (para as peptidases intestinais estudadas) a partir de 4 horas de reação, pois não foi observado diferenças significativas entre esses valores com os obtidos para 24 horas. Após 24 horas, o grau de hidrólise das reações 1:50 e 1:100 se aproximaram do platô observado pelas reações 1:25.

Resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho para a maior concentração de enzima utilizada (1:25) foram observados por Mahmoud e colaboradores (1992) onde a hidrólise das caseínas pela pancreatina ocorreu mais rapidamente nos tempos iniciais (grau de hidrólise de 48% durante os primeiros 10% do tempo total de reação), se aproximando de um platô a medida que a reação prosseguia.

As proteínas da fração lactosoro mostraram-se mais resistentes à hidrólise enzimática pelas peptidases intestinais. Somente após 24 horas de incubação foi possível observar por eletroforese a degradação das bandas proteicas referentes as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que também pode ser acompanhado pelo aumento da absorvância nos ensaios espectrofotométricos do mesmo período. Embora os ensaios proteolíticos tenham demonstrado uma redução significativa da atividade enzimática das peptidases intestinais após 24 horas de incubação, apresentando apenas 44% da atividade residual, a hidrólise do lactosoro após esse intervalo de tempo reforça o potencial das peptidases presentes no extrato intestinal de *D. plexippus*.

Em estudos conduzidos por Poulsen e colaboradores (2016) o grau de hidrólise do lactosoro pela tripsina foi registrado após 8 horas de reação. O grau de hidrólise teórico pela tripsina é aproximadamente 11% para as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina, sendo observado experimentalmente 15% de hidrólise em uma solução 1:200 (enzima/substrato) e 22% nas reações 1:100 das proteínas do lactosoro. As endopeptidases bromelaína e papaína também foram capazes de hidrolisar parcialmente as proteínas do lactosoro, entretanto a

pepsina não hidrolisou a proteína β -lactoglobulina a um grau significativo (OTTE et al., 1997).

A combinação de métodos físicos e enzimáticos pode ser utilizada como uma estratégia para aumentar o grau de hidrólise das proteínas do lactosoro (LAKSHMAN et al., 2011). Devido à presença de 2 pontes dissulfeto intramolecular a proteína β -lactoglobulina possui uma estrutura bastante estável, necessitando de temperaturas acima de 70 °C para que ocorra uma desnaturação irreversível da molécula, tornando-a mais suscetível à hidrólise enzimática (REDDY; KELLA; KINSELLA, 1988). O pré-aquecimento das proteínas do leite resultou em um maior grau de hidrólise pelas peptidases intestinais. Comparando os perfis proteico, por eletroforese, dos hidrolisados obtidos do lactosoro e da β -lactoglobulina pré-aquecida pode-se observar uma redução na intensidade da proteína β -lactoglobulina a partir de uma hora de incubação. A hidrólise desta proteína que só foi observada após 24 horas de reação em ensaios anteriores, após tratamento térmico aumentou consideravelmente. Isso foi possível pela exposição de mais sítios de clivagem após a desnaturação da proteína. O aumento do grau de hidrólise também pode ser observado pelo aumento da absorbância a 280 nm dos hidrolisados da β -lactoglobulina.

Embora as principais proteínas do leite não tenham sido identificadas por eletroforese nas formulas hipoalergênicas testadas neste trabalho, a ocorrência dessas proteínas pode ser comum mesmo em leites vendidos como extensivamente hidrolisados, como foi destacado por Rosendal e Barkholt (2000). Ao analisarem 12 fórmulas hipoalergênicas para a detecção de uma possível alergenicidade residual, foi observando por ELISA que a proteína β -lactoglobulina ou seus peptídeos alergênicos estavam presente em todas as fórmulas.

A produção de leites hipoalergênicos pode algumas vezes envolver mais de um passo de hidrólise enzimática a fim de alcançar as características desejadas para o hidrolisado. Recomenda-se um grau de hidrólise do lactosoro de até 30% para evitar um aumento no número de peptídeos hidrofóbicos nos hidrolisado que são responsáveis pelo sabor amargo do produto final (SPELLMAN; O'CUINN; FITZGERALD, 2009). A redução da alergenicidade não

pode ser controlada apenas por ação enzimática, sendo necessários etapas adicionais ao processo. Após a hidrólise, os leites são submetidos a separação física por centrifugação ou ultracentrifugação para eliminar possíveis proteínas residuais, além das enzimas utilizadas. Ao final do processo, pode ocorrer adição de outros ingredientes como vitaminas, minerais e alguns aminoácidos (CLEMENTE, 2000). Essas etapas podem ser observadas em várias patentes para a produção de leites parcialmente ou extensivamente hidrolisados (OESTERGAARD; ERNST; LYNGLÉV, 2010; MARTINEZ; LEARY; NICHOLS, 1995). A complexidade do processo para a produção dos leites hipoalergênicos explica o elevado valor desses produtos no mercado.

Os esforços para a purificação das peptidases presentes no extrato intestinal total de *D. plexippus* resultaram na realização de protocolos envolvendo diferentes etapas cromatográficas. Foi observado a ausência de proteínas positivamente carregadas em pH neutro, com isso é esperado que em pHs alcalino, faixa onde a atividade enzimática do extrato é maior, as peptidases com carga líquida negativa sejam predominantes. Essa hipótese foi confirmada ao submeter o extrato intestinal a uma matriz trocadora de ânions. As peptidases intestinais foram separadas em 4 picos a partir de eluição em diferentes concentrações de sal. O pico eluído com 0,25 M de NaCl apresentou uma maior concentração de proteínas, que pode ser observado pela elevada absorvância. A atividade proteolítica para peptidases do tipo serínicas revelou que esse pico também apresentou maior atividade específica (UA/ μ gP). Era esperado uma menor concentração de proteínas no pico não retido na matriz DEAE-Sepharose uma vez que não houve proteínas retidas na matriz CM-Sepharose. Esse resultado sugere uma predominância de proteínas sem carga líquida no pH 7,2 ou a saturação da coluna.

A coluna HiTrap-Benzamidina foi utilizada no processo de purificação das peptidases intestinais de *D. plexippus* por conter uma matriz de afinidade para peptidases do tipo serínica, uma vez que esse tipo de peptidase foi identificado como predominante no intestino médio da espécie. Nessa coluna, um inibidor de peptidases serínicas (p-Aminobenzamidina) está covalentemente ligado à Sepharose 4 Fast Flow por uma ligação amida. Essa estratégia de purificação já foi utilizada para peptidases de insetos da ordem Ixodida (PICHU et al., 2014),

Lepidóptera (NAGAOKA et al., 2012) e para peptidases intestinais de *Aedes aegypti* (RASCÓN et al., 2011).

As peptidases retidas na matriz HiTrap-Benzamidina apresentaram maior atividade específica para peptidases serínicas comparadas àquelas presentes no PI (pico não retido) e no extrato total, como já era esperado. Contudo, PI também apresentou atividade específica considerável indicando uma saturação da coluna. O PI também apresentou atividade enzimática em gel zimograma, como gelatina é um substrato inespecífico, esse resultado pode apontar para a presença de outros tipos de proteases no extrato total.

Uma análise proteômica do lúmen intestinal de larvas de *Helicoverpa armigera* revelou a presença de pelo menos 15 proteínas correspondendo a 9 diferentes peptidases serínicas (PAUCHET et al., 2008). Ao analisar as proteínas presentes na membrana peritrófica de larvas da mesma espécie, foi observado também uma grande quantidade de peptidases serínicas tanto na sua forma ativa como inativa (CAMPBELL et al., 2008). Em relação ao proteoma intestinal de *D. plexippus*, foram identificadas 14 proteínas na membrana peritrófica de larvas do quinto estágio, dentre essas proteínas estavam presentes alguns precursores de peptidases serínicas (PEREIRA, 2014), todavia nenhuma dessas peptidases foram purificadas.

Foi possível visualizar duas bandas proteicas referentes às peptidases serínicas no gel de eletroforese a partir do pico retido na matriz HiTrap-Benzamidina. A peptidase de maior massa molecular apresentou atividade enzimática em gel zimograma, contudo o mesmo não foi observado para a de menor massa molecular, indicando que este polipeptídeo possa ser um precursor de uma peptidase serínica, ou que esteja em sua forma inativa. A presença dessas peptidases inativas também foi observada em *Helicoverpa armigera* (CAMPBELL et al., 2008). A peptidase de maior massa molecular observada na eletroforese corresponde a uma das peptidases responsáveis pela hidrólise das caseínas, e das proteínas do lactosoro como foi observado nos géis zimogramas utilizando os diferentes substratos. Esses resultados mostram uma maior proximidade da purificação das peptidases presentes no extrato intestinal de *D. plexippus* com capacidade de gerar hidrolisados hipoalergênico, o que pode facilitar ensaios posteriores.

5. CONCLUSÃO

As peptidases intestinais de *D. plexippus* apresentam potencial para a produção de leites hipoalergênicos parcialmente hidrolisados a partir de 2 horas de reação enzimática, uma vez que foram capazes de hidrolisar extensivamente as caseínas e de forma parcial as proteínas do soro, quando pré-aquecidas em temperaturas desnaturantes. Contudo, mais ensaios precisam ser realizados para validar essas peptidases nesse processo. As etapas cromatográficas isoladas não foram suficientes para a purificação de uma peptidase a partir do extrato total, todavia a combinação desses métodos pode ser uma estratégia promissora para etapas posteriores do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN, F. J. et al. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 3, p. 265-274, 2002.
- BOLOGNESI, R. Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3-12, 2015.
- BROWER, J. V. Z. Experimental studies of mimicry in some North American butterflies. Part III. *Danaus gilippus berenice* and *Limenitis archippus floridensis*. **Evolution**, v. 12, n. 3, p. 273-285, 1958.
- BROWER, L. P.; MOFFITT, C. M. Palatability dynamics of cardenolides in the monarch butterfly. **Nature**, v. 249, p. 280-283, 1974.
- BU, G. et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. **Dairy science & technology**, v. 93, n. 3, p. 211-223, 2013.
- CAMPBELL, P. M. et al. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 10, p. 950-958, 2008.
- CHEN, X.-L. et al. Rapid monitoring of autolysis process of proteases by capillary electrophoresis. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 20, p. 1763-1767, 2003.
- CHOUGULE, N. P., et al. 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**, v. 54, n. 3, p. 563-572, 2008.
- CHRISTELLER, J. T. et al. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.
- CHRISTELLER, J. T. et al. Partial purification and characterization of the major midgut proteases of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*, Coleoptera: Scarabaeidae). **Insect biochemistry**, v. 19, n. 3, p. 221-231, 1989.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

DIAS, R. O. et al. Digestive peptidase evolution in holometabolous insects led to a divergent group of enzymes in Lepidoptera. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 58, p. 1-11, 2015.

DO, A. B.; WILLIAMS, K.; TOOMER, O. T. In vitro digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins. **Food chemistry**, v. 190, p. 581-587, 2016.

DO, D. H. T. et al. Using a dynamic stomach model to study efficacy of supplemental enzymes during simulated digestion. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 580-588, 2016.

DROGARAIA. Disponível em <<http://www.drogaraia.com.br/>>. Acesso em 25 Out. 2016.

EDMONDS, H. S. et al. The inhibitory effects of the cysteine protease inhibitor, oryzacystatin, on digestive proteases and on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 78, n. 1, p. 83-94, 1996.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.

ENAYATI, A. Ali; RANSON, Hilary; HEMINGWAY, Janet. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect molecular biology**, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.

FERREIRA, C.T.; SEIDMAN, E. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n.1, p. 7-20, 2007.

FIOCCHI, A. et al. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. **World Allergy Organization Journal**, v. 3, n. 4, p. 1, 2010.

FUKAMIZO, T.; KRAMER, K. J. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. **Insect biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 141-145, 1985.

GOMES, C. E. M. et al. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant physiology and biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.

GRUDEN, K. et al. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 28, n. 8, p. 549-560, 1998.

HALKEN, S.; HØST, A. How hypoallergenic are hypoallergenic cow's milk-based formulas?. **Allergy**, v. 52, n. 12, p. 1175-1183, 1997.

HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. Identification and partial characterization of digestive proteinases from two species of bedbug (Hemiptera: Cimicidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, n. 8, p. 1837-1840, 1982.

INDIRA, D. et al. Cellulase: Critical Enzyme of Biofuel Industry—A Sea Water Based Approach. 2016.

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

KAWAKITA, H. et al. Analysis of the ultrastructure and formation pattern of the peritrophic membrane in the cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 2016.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. G. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Science**, v. 7, n. 4, p. 815-836, 1998.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KOUADIO, E. J. P. et al. INSECT DIGESTIVE GLYCOSIDASES: STRATEGIES OF PURIFICATION, BIOCHEMICAL PROPERTIES AND POTENTIAL APPLICATIONS, A REVIEW. **International Journal of Entomological Research**, v. 4, n. 2, 2016.

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

LAKSHMAN, P. L. N. et al. Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 806-810, 2011.

LALONDE, J. Highly engineered biocatalysts for efficient small molecule pharmaceutical synthesis. **Current opinion in biotechnology**, v. 42, p. 152-158, 2016.

LEARY, D.; VIERROS, M.; HAMON, G.; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Mar Policy*, v. 33, p. 183–194, 2009.

LEHANE, M. J.; MÜLLER, H. M.; CRISANTI, A. Mechanisms controlling the synthesis and secretion of digestive enzymes in insects. In: **Biology of the insect midgut**. Springer Netherlands, 1996. p. 195-205.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

- LIU, H.-W. et al. A midgut-specific serine protease, BmSP36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Science**, 2016.
- MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 5, p. 1223-1229, 1992.
- MARANA, S. R. et al. Ultrastructure and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midguts. **Journal of insect physiology**, v. 43, n. 5, p. 465-473, 1997.
- MARTINEZ, S. B.; LEARY JR, H. Lee; NICHOLS, Debra J. **Milk protein partial hydrolysate and infant formula containing same**. U.S. Patent n. 5,405,637, 11 abr. 1995.
- MCDONALD, A. G.; TIPTON, K. F. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. **Febs Journal**, v. 281, n. 2, p. 583-592, 2014.
- MCLAUGHLIN, R. E.; MYERS, JUDITH. *Ophryocystis elektroscirrha* sp. n., a neogregarine pathogen of the monarch butterfly *Danaus plexippus* (L.) and the Florida queen butterfly *D. gilippus berenice* Cramer. **The Journal of Protozoology**, v. 17, n. 2, p. 300-305, 1970.
- MCKENZIE, H. A. alpha-Lactalbumins and lysozymes. **EXS**, v. 75, p. 365-409, 1995.
- MOHAMMADI, D. et al. Circadian variation in midgut digestive enzyme activity in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 117-121, 2015.
- MOJISOV, K. D. et al. The application of enzymes for the removal of dyes from textile effluents. **Advanced technologies**, v. 5, n. 1, p. 81-86, 2016.
- MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923-942, 2013.
- MURDOCK, L. L. et al. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 783-787, 1987.
- NAGAOKA, S. et al. Identification of the sperm-activating factor initiatorin, a prostatic endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 8, p. 571-582, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1298 p.
- OBERHAUSER K. S., SOLENSKY, M. J. Ecologia da Borboleta-Monarca. Disponível em: <http://ecologia.info/borboleta-monarca.htm>. Acesso em 19 Out. 2016.

OESTERGAARD, P. R.; ERNST, S.; LYNGLEV, G. B. **Process for making a milk-based protein hydrolysate**. U.S. Patent n. 9,259,023, 16 fev. 2016.

OTTE, J. et al. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 835-848, 1997.

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

PAUL, T. et al. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8-22, 2016.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Novel enzymatic processes applied to the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 64-72, 2016.

PEREIRA, D. A.. **Proteases e inibidores de proteases em látex vegetal e intestino de lagartas: aspectos sobre resistência e suscetibilidade das plantas alvo**. 2014. Tese de Doutorado.

PEREIRA, D. A. et al. Digestibility of defense proteins in latex of milkweeds by digestive proteases of Monarch butterflies, *Danaus plexippus* L.: a potential determinant of plant–herbivore interactions. **Plant science**, v. 179, n. 4, p. 348-355, 2010.

POULSEN, N. A. et al. Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 44-50, 2016.

PICHU, S. et al. Purification of a serine protease and evidence for a protein C activator from the saliva of the tick, *Ixodes scapularis*. **Toxicon**, v. 77, p. 32-39, 2014.

RAMOS, M. V. et al. Peptidases and peptidase inhibitors in gut of caterpillars and in the latex of their host plants. **Planta**, v. 241, n. 1, p. 167-178, 2015.

RASOR, J. P.; VOSS, E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1, p. 145-158, 2001.

RASCÓN, A. A. et al. In vitro activation and enzyme kinetic analysis of recombinant midgut serine proteases from the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **BMC biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

RAWLINGS, N. D., WALLER, M., BARRETT, A. J., & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2014.

REDDY, I. M.; KELLA, N. K. D; KINSELLA, J. E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 737-741, 1988.

- RESTANI, P. et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 47-56, 2009.
- ROSENDAL, A.; BARKHOLT, V. Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 10, p. 2200-2210, 2000.
- RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1515-1522, 2010.
- SAHAR, S. A. et al. Vital Enzymatic Responses in Haemolymph of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) to Entomopathogenic Fungi Infection. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 26, n. 2, p. 277, 2016.
- SARAUER, B. L.; GILLOTT, C.; HEGEDUS, D. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect molecular biology**, v. 12, n. 4, p. 333-343, 2003.
- SAVAGE, J.; SICHERER, S.; WOOD, R. The Natural History of Food Allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 2, p. 196-203, 2016.
- SAXENA, A.; SINGH CHAUHAN, P. Role of various enzymes for deinking paper: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-15, 2016.
- SEDDIGH, S.; DARABI, M. Proteomics comparison of aspartic protease enzyme in insects. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, n. 1, p. 69-83, 2016.
- SPELLMAN, D.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 440-446, 2009.
- SPERGEL, J. M. Natural history of cow's milk allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 813, 2013.
- SRIDEVI, A. et al. Biocatalytic activity of *Aspergillus niger* xylanase in paper pulp biobleaching. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 165, 2016.
- SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular & molecular biology letters**, v. 11, n. 1, p. 132-154, 2006.
- SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.
- TANG, J. W. et al. Optimization of Microencapsulation of β -Lactoglobulin–Vitamin A Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

- TERESHCHENKOVA, V. F. et al. Dipeptidyl peptidase 4—An important digestive peptidase in *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 76, p. 38-48, 2016.
- TERRA, W. R. et al. Digestive enzymes. In: **Biology of the insect midgut**. Springer Netherlands, 1996. p. 153-194.
- TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual review of entomology**, v. 35, n. 1, p. 181-200, 1990.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, n. 6, p. 487-494, 1979.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.
- URQUHART, F. A. The monarch butterfly. University of Toronto Press, 1960.
- VASANTHABHARATHI, V. et al. Protease from Marine *Citrobacter diversus* and its Application in Detergent Industry. **Advances in Biological Research**, v. 10, n. 2, p. 93-96, 2016.
- WAL, J. M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 5, p. S2-S11, 2004.
- WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 13, p. 6977-6982, 1997.
- WEIDLICH, S.; HOFFMANN, K. H.; WOODRING, J. SECRETION OF LIPASES IN THE DIGESTIVE TRACT OF THE CRICKET *Gryllus bimaculatus*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 90, n. 4, p. 209-217, 2015.
- WELLS, H.; WELLS, P. H. The monarch butterfly: A review. **Bulletin of the Southern California Academy of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 1-25, 1992.
- WILLIS, J.; MAZAREI, M.; STEWART, N. Transgenic plant-produced hydrolytic enzymes and the potential of insect gut-derived hydrolases for biofuels. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 675, 2016.
- WOODRING, J.; WEIDLICH, S. THE SECRETION OF DIGESTIVE ENZYMES AND CAECAL SIZE ARE DETERMINED BY DIETARY PROTEIN IN THE CRICKET *Gryllus bimaculatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 3, p. 121-128, 2016.
- WU, F. et al. The expression analysis of cysteine proteinase-like protein in wild-type and nm2 mutant silkworm (*Lepidoptera: Bombyx mori*). **Gene**, v. 586, n. 1, p. 170-175, 2016.

XAVIER-FILHO, J. et al. 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*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 1139-1143, 1989.

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**, v. 25, n. 8, p. 1827-1842, 1999.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; BOTELHO, V. A. R.; WEISSHEIMER, C. F.; MARTINS, M. S. Qualidade Composicional do Leite de um rebanho Jersey no Sul do Rio Grande do Sul. Embrapa Gado do Leite. Documentos, 184. **XIII Congresso Internacional do Leite (Anais)**. 2015.

ZHAN, S. et al. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1171-1185, 2011.