UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES DIGESTIVAS EM LARVAS DE *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).

Wellington Oliveira da Cruz

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES DIGESTIVAS EM LARVAS DE *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).

WELLINGTON OLIVEIRA DA CRUZ

Sob a Orientação do Professor
Emerson Guedes Pontes

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ
Agosto de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C957c

Cruz, Wellington Oliveira, 18011975-
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES DIGESTIVAS EM LARVAS DE Alphitobius diaperinus (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). / Wellington Oliveira Cruz. - Nova Iguaçu, 2019.
168 f.: il.

Orientador: Emerson Guedes Pontes Pontes.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, 2019.

1. Inseto. 2. Dietas. 3. Proteases. 4. Alphitobius diaperinus. I. Pontes, Emerson Guedes Pontes, 1974-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WELLINGTON OLIVEIRA DA CRUZ

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM -----/-----/------

_____
Dr.Emerson Guedes Pontes (IQ-UFRRJ)

_____
Dr. Cristiane Martins de Souza (IQ-UFRRJ)

_____
Dr. Danielle M. P. de Oliveira Santos (IQ-UFRJ)

_____
Dr. Rafael Dias Mesquita (IQ-UFRJ)

_____
Dr. Carlos Mauricio Sant`Anna (IQ-UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar em todos os momentos, me mostrando o caminho certo a ser percorrido. Sua presença é fundamental em minha vida.

À minha família querida, que sempre esteve ao meu lado, me dando atenção e incentivo, meus irmãos Sheila e Willians e minhas sobrinhas.

À o Professor Emerson Guedes Pontes, paciência, amizade e confiança dedicadas, durante todos esses anos de pesquisa.

À Professora Marcia Vidal da EMBRAPA pela amizade, pela atenção e dedicação.

Aos professores da UFRRJ, Cristina Amorim, Cristiano, Cristiane, Marco André, Arthur, pela atenção e amizade.

Aos professores da UFRJ, Danielle Oliveira, Katia Goldin pela disponibilização dos Laboratórios, e pelo auxílio durante os ensaios experimentais.

A minha amiga, companheira e esposa Gisele Motta, pelo carinho, dedicação, amizade e paciência. Também por estar ao meu lado neste momento todo especial da minha vida.

Aos meus tios, Vadinho e Tia Aurea e todos meus primos pelo apoio e incentivo

Aos meus sogros, Valdyr e Neta, e meus compadres Gabriel e Aline.

Aos meus amigos da UFRRJ, Luan, Daniele, Luana, Eliane, Leonardo Terra, pela amizade, carinho, paciência.

À UFRRJ, pela oportunidade e qualidade de ensino.

À CAPES, pelo auxílio nesta Tese.

À banca examinadora, por aceitar o convite. À todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) código de financiamento 001.

RESUMO

CRUZ, Wellington Oliveira. **Caracterização bioquímica de proteases digestivas em larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2019. 168p Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O *Alphitobius diaperinus* é considerado uma praga importante em ambiente aviário. O estudo do seu comportamento, hábitos alimentares e enzimas digestivas, podem indicar alvos importantes no seu controle. O controle do *A. diaperinus* é considerado difícil, seus inimigos naturais são pouco conhecidos e sendo o uso de inseticidas químico o principal método de controle. Proteases digestivas de insetos catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos a partir de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio dos insetos. As atividades proteolíticas no trato digestivo das larvas e adultos de *A. diperinus* foram determinadas utilizando azocaseína e substratos especificos após alimentarem-se de diferentes dietas. O extrato bruto do homogeneizado do trato digestivo das larvas *A. diaperinus* mostrou atividade sobre azocaseína e Abz-Phe-Arg-MCA e foi inibida em mais de 50% pelo inibidor da cisteíno protease E-64 e foi ativado por DTT 2,0 mM em pH ácido. Nove bandas foram detectadas com atividade proteolítica e massa molecular na faixa 10 kDa – 100 kDa através de zimograma, utilizando gelatina 0,1% como substrato. Diferentes classes de proteases foram identificadas na presença de inibidores de proteases clássicos como E-64, iodoacetamida e ácido iodoacético, PMSF, SBTI, aprotinina e TLCK. Foi observado maior nível de atividade proteolítica em pHs entre 5 e 6. Embora tenham sido observadas combinações de proteases de serina e cisteína, as proteases ácidas apresentaram níveis mais altos de atividade proteolítica. O cálcio aumentou a atividade proteasica em concentrações maiores que 2,0 mM. Análises de nano-HPLC bidimensional e ESI-MS/MS resultaram na identificação de proteases como tripsina, catepsinas, metaloproteases, aminopeptidases, peptidases e dipeptidases. Foi observado alto potencial inibitório de diferentes séries de imidazolonas sobre atividade cisteíno proteases, a qual pode ser utilizada como ferramentas de controle do *A. diaperinus*.

PALAVRAS CHAVES: (Inseto, Dietas, Proteases, *Alphitobius diaperinus*).

ABSTRACT

CRUZ, Wellington Oliveira. **Biochemical caracterization of digestive proteases in *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae**. 2018. 168p Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Alphitobius diaperinus is considered an important issue in the avian environment. Studying your behavior, eating habits and digestive enzymes may indicate important targets in your control. Control of *A. diaperinus* is considered difficult, its natural enemies are little known, and the use of chemical insecticides is the main method of control. Insect digestive proteases catalyze the production of peptides and amino acids from a protein diet and they are found in the midgut region of insects. Proteolytic activities in the digestive tract of A. *diperínus* larvae and adults were determined using azocasein and specific substrates after feeding on different diets. The crude extract of the digestive tract of *A. diaperinus* larvae showed activity on azocasein and Abz-Phe-Arg-MCA. It was inhibited by more than 50% by E-64 and activated by 2.0 mM DTT at acid pH. Nine bands were detected with proteolytic activity and molecular mass in the range 10 kDa - 100 kDa through zymogram, using 0.1% gelatin as substrate. Different classes of proteases were identified in the presence of classical protease inhibitors such as E-64, iodoacetamide and iodoacetic acid, PMSF, SBTI, aprotinin and TLCK. A higher level of proteolytic activity was observed at pHs between 5 and 6. Although combinations of serine and cysteine proteases have been observed, acid proteases showed higher levels of proteolytic activity. Calcium ion increased the protease activity at concentrations greater than 2.0 mM. Two-dimensional nano-HPLC and ESI-MS / MS analyzes resulted in the identification of proteases such as tripine, cathepsins, metalloproteases, aminopeptidases, peptidases and dipeptidases. High inhibitory potential of different series of imidazolone on cysteine protease was observed, what can be used as control tools of *A. diaperinus*.

KEY WORDS: (Insect, Diets, Proteases, *Alphitobius diaperinus*).

.**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Composição percentual e calculada das dietas referência..... **45**

Tabela2: Determinação da atividade proteolítica em diferentes pHs do homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **57**

Tabela 3: Determinação da atividade proteolítica em diferentes concentrações de proteínas do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **61**

Tabela 4: Atividade proteolítica presente em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em relação ao tempo na presença de agentes redutores..... **64**

Tabela 5: Efeito da temperatura na atividade proteolítica, presente na fração luminal e na fração epitelial do intestino médio de larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs..... **70**

Tabela 6: Determinação da atividade proteolítica em diferentes pHs do homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*…..... **74**

Tabela 7: Efeito de inibidores específicos sobre atividade proteolítica de proteases presentes no trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **80**

Tabela 8: Efeito do cálcio sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **90**

Tabela 9: Efeito das diferentes dietas sobre a atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*..... **95**

Tabela 10: Hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC por cisteíno proteases do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* quando submetido em diferentes dietas..... **112**

..

Tabela 11: Identificação pelo Mascot de proteases no intestino médio em larvas de *Alphitobius diaperinus* separadas por SDS-PAGE, digestão por tripsinização e análise por LC-MS (Q-TOF)..... **119**

Tabela 12: Efeito de inibidores sintéticos sobre atividade proteolítica de cisteíno proteases presentes no intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **125**

LISTA DE FÍGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do *Alphitobius diaperinus*..... **20**

Figura 2: Cascudinhos sobre muretas e pilares..... **24**

Figura 3: Diagrama esquemático da estrutura do sistema digestivo de um tipo de inseto..... **26**

Figura 4: Esquema demonstrativo para inativação de serino proteases e cisteíno proteases pelo inibidor N-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK)..... **40**

Figura 5: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)..... **41**

Figura 6: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor L-trans-epoxy succinil-L-leucylamido (4-guanidino)-butano (E-64)..... **41**

Figura 7: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor iodoacetamida..... **42**

Figura 8: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor ácido iodo acético..... **42**

Figura 9: Atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em zimograma..... **54**

Figura 10: Curva de pH da atividade de proteases presente em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pH..... **56**

Figura 11: Determinação da atividade proteolítica total em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes concentrações de proteínas..... **60**

Figura 12: Curva temporal da atividade proteolítica presente em homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* na presença de agentes redutores..... **63**

Figura 13: Curso temporal da atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes valores de pH..... **66**

Figura 14: Efeito da temperatura na atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs..... **69**

Figura 15: Efeito dos inibidores E-64 e PMSF sobre a atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs..... **73**

Figura 16: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 5,6**.**..... **76**

Figura 17: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 7,4..... **77**

Figura 18: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 9,0..... **78**

Figura 19: Efeito do inibidor de E-64 na atividade proteolitca no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius daperinus*..... **86**

Figura 20: Efeito do inibidor de PMSF na atividade proteolitca no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius daperinus*..... **87**

Figura 21: Efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **89**

Figura 22: Efeito da dieta na atividade proteásica do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* mantidas com diferentes dietas durante sete dias..... **94**

Figura 23: Efeito de diferentes dietas no perfil proteico e na atividade proteolítica das proteases digestiva das larvas e adultos de *A. diaperinus*..... **98**

Figura 24: Comparação do perfil das proteínas e da atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* alimentadas em diferentes dietas..... **101**

Figura 25: Efeito do pH na hidrólise de gelatina à 0,1% por proteases do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaprinus*..... **104**

Figura 26: Efeito do agente redutor DTT na atividade de proteases digestivas larvais de *Alphitobius diaprinus***.**..... **106**

Figura 27: Quantificação da atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A.diaperinus* (Linha C)..... **107**

Figura 28: Quantificação da atividade proteolítica do intestino médio das larvas de *A.diaperinus* (Linha D)..... **108**

Figura 29: Quantificação da atividade proteolítica do intestino médio das larvas de *A.diaperinus* (Linha E)..... **109**

Figura 30: Efeito na atividade de proteases digestivas no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* quando tratadas com diferentes dietas e na presença do inibidor E-64, utilizando substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC..... **111**

Figura 31: Efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica de cisteíno proteases, do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **113**

Figura 32: Separação de proteínas de *Alphitobius diaperinus*, trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em SDS-PAGE..... **115**

Figura 33: Análise de ontologia genética (GO) nível 3..... **121**

Figura 34: Estruturas das imidazolonas selecionadas para avaliação de atividade inibitória em cisteino proteases do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*..... **123**

Figura 35: Efeito de inibidores sintéticos sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **124**

LISTA DE ABREVIATURAS

BAEE	**Éster etílico de N-α-benzoil-L-arginina**
C	**Celsius;**
$CaCl_2$	**Cloreto de cálcio;**
DMSO	**Dimetilsulfóxido;**
DTT	**1,4-Ditiotrietol;**
EDTA	**Ácido etilenodiamino tetra-acético;**
ELISA	**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay;**
HCl	**Ácido clorídrico;**
HCl	**Àcido clorídrico;**
mM	**milimolar;**
NaCl	**Cloreto de sódio;**
nm	**Nanômetro;**
PMSF	**Fluoreto de fenilmetilsulfonila;**
SBTI	**Inibidor de tripsina de soja;**
SDS	**Dodecil sulfato de sódio;**
SDS-PAGE	**Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio;**
TCA	**Ácido tricloroacético;**
TLCK	**N-α-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona;**
Tris	**Tris (hidroximetil) aminometano;**
V	**Volts;**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **16**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**

2.1. Pragas primárias e secundárias **18**

2.2. Sistema de produção de aves..... **19**

2.3. *Alphitobius diaperinus* **19**

2.4. Impacto econômico e medidas de controle do *Alphitobius diaperinus* na produção de aves **22**

2.5. Organização do sistema digestivo nos insetos **25**

2.6. Organização do sistema digestivo nos coleopteras..... **27**

2.7. Digestão em insetos..... **27**

2.8. Enzimas proteoliticas e proteases em insetos..... **29**

2.8.1. Proteases Aspárticas..... **30**

2.8.2. Metaloproteases..... **31**

2.8.3. Serino proteases..... **32**

2.8.3.1. Tripsinas..... **33**

2.8.3.2. Quimotripsinas..... **34**

2.8.4. Carboxipeptidases **35**

2.8.5. Cisteíno proteases..... **36**

2.9. Inibidores de proteases..... **37**

3. OBJETIVO..... **43**

3.1. Objetivo geral..... **43**

3.2. Objetivo específico..... **43**

4. MATERIAL E MÉTODOS..... **44**

4.1. Animais..... **44**

4.2. Dietas oferecidas ao inseto *Alphitobius diaperinus*..... **44**

4.3. Preparação de extrato bruto de intestino médio de *Alphitobius diaperinus*..... **44**

4.4. Dosagem de Proteínas..... **46**

4.5. Determinação de atividade proteolítica em intestino médio de *Alphitobius. diaperinus* utilizando substrato azocaseína..... **46**

4.6. Avaliação do efeito de inibidores de proteases em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* **47**

4.7. Avaliação do efeito de imidazolonas, sobre cisteíno proteases do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*..... **47**

4.8. Determinação de atividade proteolítica em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* utilizando substratos fluorogênicos **48**

4.9. Avaliação do efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica em trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* utilizando substratos fluorogênicos..... **48**

4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes (SDS-PAGE)..... **49**

4.11. Zimografia reversa..... **49**

4.12. Efeito do pH..... **50**

4.13. Efeito da temperatura..... **50**

4.14. Avaliação da atividade de proteases do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em animais mantidos com as respectivas rações para frango de corte, postura, comercial e farinha de carne e ossos..... **50**

4.15. Separação as bandas do gel, digestão e extração dos peptídeos **51**

4.16. LC MS/MS análises **51**

4.17. Análises Estatísticas..... **52**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **53**

6. CONCLUSÕES..... **126**

7. PERSPECTIVA..... **126**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **127**

1. INTRODUÇÃO.

Estima-se que os insetos representam em torno de 62% de todas as espécies vivas na terra (WIENS *et al*., 2015). Insetos pragas em sistemas agrícolas são uma das principais causas de danos à produção agrícola e armazenamento em todo o mundo (DANGLES *et al*., 2009). Com o aumento da globalização e conexão através do comércio mundial, espera-se que a ameaça de espécies invasoras cheguem aos países em que estavam ausentes anteriormente aumente (PAINE, 2016). Uma das hipóteses que deve ser considerada a este aumento populacional destes insetos pragas é o desenvolvimento de mecanismos fisiológicos ligados a processos adaptativos e comportamentais, que desenvolveram durante sua evolução (SCHOWALTER *et al*., 2016). Insetos pragas em sistemas agrícolas são uma das principais causas de danos à produção e armazenamento de culturas (THOMAS, 1999). Nos países tropicais, acredita-se que essas pragas causem perdas próximas de 60 a 70%, principalmente em produtos armazenados (NWILENE *et al*., 2008). Para o Brasil as perdas de grãos atingiram um índice de 10%, ou seja, cerca de 9,8 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (MAPA, 2018). A agricultura há muito enfrenta um desafio considerável ao gerenciar várias espécies de pragas em uma única colheita. Resultando no desenvolvimento de pesquisas com várias pragas, programas e estratégias específicas de manejo integrado de pragas (WILLOCQUET *et al*., 2008).

O desenvolvimento de agro-ecossistemas voltados ao setor produtivo, do qual a presença de água, alimento e temperaturas favoráveis podem ser avaliadas como fatores primordiais e responsáveis pelo aumento dessas populações (VERHOEF, 1977). Programas de monitoramento vêm sendo desenvolvidos para coletar informações sobre o comportamento na dinâmica populacional desses insetos pragas, na detecção precoce de infestações e consequentemente iniciar medidas preventivas de controle. Em geral os insetos de importância estruturais, urbana e agrícola são responsáveis por danos econômicos, contaminações, desagregando valor final do produto (LEE *et al*., 2012). Várias práticas agricolas utilizadas no controle desses insetos pragas passam por transformações, pois existem necessidades de desenvolver novas tecnologias, ambientalmente mais aceitáveis. Como parte disso há uma diminuição no uso de produtos químicos ou petroquímicos para tais medidas, em contra partida, um crescente aumento no desenvolvimento de bioprodutos, bioprocessos, e assim estabelecer uma agricultura renovável e sustentável (MONICA *et. al* 2016).

A classe Insecta possue a capacidade de adaptarem-se nos mais diversos tipos de ambientes e estabelecer hábitos alimentares bem diversificados (WIELKOPOLAN *et al*.,

2016). Essa diversificação se reflete na habilidade de expressar diferentes enzimas digestivas como: lipases, carboidrases, amilases, celulases, pectinases, xilanases e proteases (TERRA e FERREIRA, 1994). Consequentemente estudos relacionados na identificação e caracterização das diferentes classes de proteases digestivas em um mesmo inseto, foram atribuídos a compartimentalização do intestino médio, que proporciona aos insetos utilizarem mais eficientemente as proteases para a digestão das proteínas, em que a variação do nível de pH, caracteriza a presença de diferentes regiões, em que diferentes proteases atuam em pH ótimo de atividade enzimática, em um único tubo digestivo (THIE e HOUSEMAN, 1990). Mudanças morfológicas e adaptações fisiológicas do sistema digestivo possibilitaram a presença de diferentes mecanismos de catálise por proteases (HERNÁNDEZ *et al*., 2003). A digestão das proteínas por proteases intestinais de insetos foi demostrada em estudos anteriores e claramente descrita em diversas espécies de insetos, tais como: *Helicoverpa armigera* (KUWAR *et al.,* 2015); *Trogoderma granarium* (BORZOUI *et al*., 2015); *Dysdercus peruvianus* (PIMENTEL *et al*., 2017), *Rhynchophorus ferrugineus,* (HERNÁNDEZ *et al*., 2003). Em diferentes espécies de coleópteras foram encontrados uma grande diversidade de proteases digestivas, que estão subdivididas em endopeptidases e exopeptidases e são responsáveis pela quebra de proteínas derivadas das dietas, que são utilizadas pelos insetos como importante fonte de aminoácidos (THIE E HOUSEMAN, 1990).

Os inibidores de proteases vegetais inibem as proteases do intestino médio em insetos (BRIOSCHI *et al*., 2007) influenciando no aumento da secreção de proteases digestivas das células do intestino médio, para suprir à disponibilidade dietética insuficiente de aminoácidos necessário para síntese enzimática (WEIDLICH *et al*., 2012). Em *Oulema melanopus*, (Coleóptera: Chrysomelidae), foram detectados até quatro mecanismos distintos de diferentes tipos de proteases. Tais respostas são devidas a famílias de genes que codificam proteases que diferem em sua sensibilidade aos inibidores de proteases (WIELKOPOLAN *et al*., 2015). Considerando o crescente estudo para caracterização do sistema digestivo de insetos, os inibidores de proteases são utilizados como uma importante ferramenta no processo de identificação das proteases digestivas presente no intestino médio dos insetos. A especificidade e a seletividade da inibição é uma característica importante nos estudos das interações entre enzima-inibidor, ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima, sendo determinada pela dinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima (LAWRENCE *et al*., 2002). Os inibidores de proteases são classificados em diferentes famílias, baseado na similaridade de suas sequências

de aminoácidos, sendo específicos quanto os tipos de proteases que inibem, podendo ser inibidores de serino, cisteíno, aspartato ou metalo-proteases (HABIB *et al*., 2007). Neste trabalho será dada ênfase nas proteases digestivas do homogeneizado do trato digestivo das larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Pragas primárias e secundárias.

O conhecimento dos hábitos alimentares das diferentes pragas constitui como uma importante ferramenta para definir o manejo mais adequado a ser praticado durante o período de armazenamento de produtos alimentícios como grãos e sementes (LAMONICA e IDE, 2002). Essas observações nos permitem levarmos em consideração a subdivisão dessas pragas em duas classes distintas (LORINI *et al.,* 2010).

Pragas primárias: Possuem hábito de alimentar-se de sementes e grãos sadios e são classificadas de acordo com a parte que atacam nas sementes e nos grãos, sendo nomeados como pragas primárias internas ou externas. As pragas primárias internas perfuram as sementes ou os grãos, onde passam maior parte do seu desenvolvimento, alimentando-se de todo o tecido de reserva, como exemplo deste grupo pode destacar *Lasioderma. serricone* (Coleóptera: Bostrychidae). Essas infestações possibilitam o aparecimento de outros agentes de deterioração (LORINI, 2008). As pragas primárias externas destroem a parte exterior do grão ou semente posteriormente, alimentam se da parte interna. Entretanto esses insetos não passam todo seu ciclo de desenvolvimento no interior dos mesmos (LORINI, 2008). Podemos destacar como exemplo de praga primárias *Plodia interpunctella* (Lepidóptera: Pyralidae) (LORINE, 2008).

Pragas secundárias: São aquelas que não conseguem alimentar-se de sementes e grãos sadios. Essas pragas são oportunistas, ocorrem quando as sementes ou os grãos estão trincados, quebrados ou mesmo danificados por pragas primárias. O próprio processo de beneficiamento, transporte e recebimento desses grãos e sementes, são alguns dos fatores determinantes para o aparecimento desses grãos e sementes defeituosos, como exemplo de pragas secundárias, podemos destacar o *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) (LORINI, 2008).

2.2. Sistema de produção de aves.

Devido a uma grande demanda no volume de produção, exigidas pelo setor agroindustrial, a prática de produção de frango de corte, submetem estes animais a condições extremas de criação, aumentando os riscos de problemas sanitários, que inclusive podem comprometer essa atividade (AMARAL *et al*., 2014). Esse confinamento favorece o desenvolvimento de pragas oportunistas, algumas espécies de roedores, moscas e outros artrópodes que se adaptaram a este ambiente com oferta continuam de abrigo, água e alimentos. Neste ambiente modificado, destacam-se os dípteros muscóides, conhecido como moscas. Estes insetos quando adultos são vetores de inúmeros patógenos (MCKAY *et al*., 2007). O inseto *Alphitobius diaperinus*, conhecido como cascudinho é considerado uma das principais pragas que afetam a avicultura moderna, (OURO FINO, 2013). Este inseto é responsável por grandes prejuízos na avicultura, participando na transmissão de diversas doenças, contribuindo para a desuniformidade do lote e piora da conversão alimentar, assim como, contribui para o desperdício de ração e danos às instalações (BAYER, 2010).

2.3. *Alphitobius diaperinus*.

A família *Tenebrionidae* compreende cerca de 1.700 gêneros e 18.000 espécies (BOOTH *et al*., 1990), destas, aproximadamente 100 têm sido registradas em associação com produtos armazenados e diversas espécies são reconhecidas como importantes pragas secundárias (PREISS *et al*., 1970). O gênero *Alphitobius*, é composto pelas espécies *Alphitobius diaperinus*; *Alphitobius piceus*; *Alphitobius punctatus* e *Alphitobius ulomoides*. (DOYEN *et al*., 1989).

O *A. diaperinus* é um inseto da ordem Coleóptera (família Tenébrionidae), denominado vulgarmente de cascudinho da cama das aves, são causadores de problemas sanitários, comumente infestando sistemas de produção de aves, quando associados a esses agroecoessistemas, alimentam–se de aves moribundas, das carcaças, fezes e ração das aves (LESCHEN *et al.,* 1988). Em função disso torna-se um transmissor de diversos patógenos, destacando-se bactérias, protozoários e vírus que causam imunossupressão das aves, (CHERNAKI E ALMEIDA, 2001). No campo, o adulto de *A. diaperinus* vive aproximadamente um ano, podendo viver mais de dois anos em condições experimentais (FALOMO, 1986). O ciclo de vida do *A. diaperinus*, dura entre 40 a 100 dias. Em temperatura em torno de 27ºC e 80% UR de umidade relativa (figura 1).

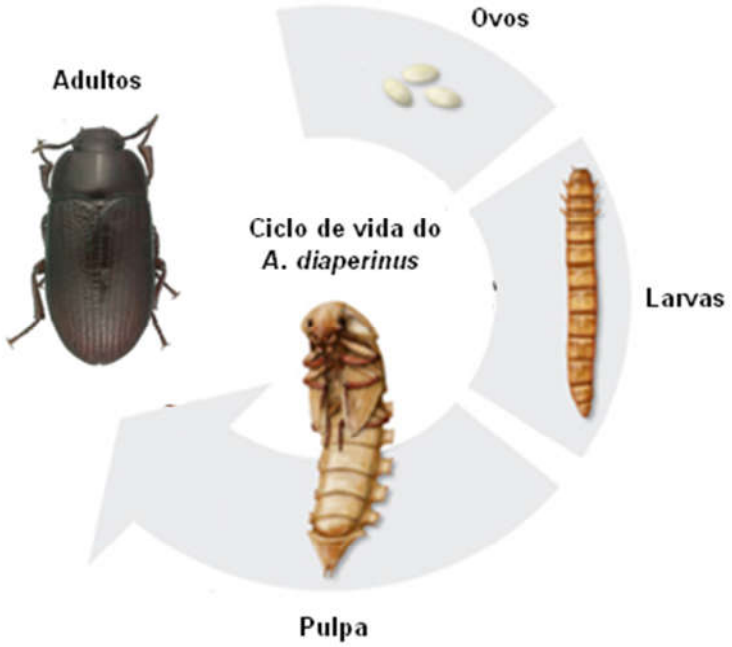


Figura 1. Ciclo de vida do *Alphitobius diaperinus*. (DUNFORD e KAUFMAN, 2011). O ciclo de vida do *A. diaperinus*. Fase de ovos: Eclodem entre 4 a 7 dias, com aproximadamente 1,5 mm de comprimento; Fase de larvas: 35 a 65 dias (seis a onze instar) com 7 mm - 11 mm de comprimento no último instar; Fase de pulpa: 5 a 8 dias, com 6 mm - 8 mm de comprimento; Fase Adulta: 40 a 100 dias, 5,8 mm - 6,3 mm de comprimento.

As fêmeas produzem ovos durante a maior parte da vida, com aproximadamente cinco dias de intervalo e chegam a pôr 2000 ovos. Os ovos eclodem entre quatro a sete dias e o desenvolvimento completo de larva ao estágio adulto é dividido em aproximadamente seis a onze "instar," que pode durar entre 35 e 65 dias, (DUNFORD e KAUFMAN, 2011). A fase de pupa é de aproximadamente cinco dias, emergindo adultos, iniciando o processo reprodutivo após 20 dias a emergência (SCHAFER, 2005).

Devido à grande capacidade reprodutiva, o *A. diaperinus*, é considerado um dos principais obstáculos associados a criações comerciais de aves, causando prejuízos e grandes problemas sanitários. Larvas e adultos de *A. diaperinus* lesionam a pele e tecidos da ave ocasionando stress, hemorragia, anemia, infecções secundárias e morte. As aves acabam por ingerir os insetos em lugar da ração balanceada, prejudicando o seu desenvolvimento (GAZONI *et al*.,2012). Estudos sobre enzimas de insetos, em particular aquelas que participam na digestão dos alimentos, são de importância óbvia para a compreensão das suas necessidades nutricionais e dos processos metabólicos.

Diante da necessidade de se minimizar os problemas causados pelo inseto, medidas de controle são necessárias, sendo o uso de inseticidas químicos a mais utilizada. No entanto, piretróides e organofosforados, que são os inseticidas mais utilizados para este fim, possuem alta toxidade para carne das aves invibializando a sua comercialização, não sendo recomendado para consumo humano. Além de não ser eficiente, o uso de inseticidas tem levado ao surgimento de populações resistentes, e ocasionando contaminação do ambiente (CHERNAKI *et al*., 2011).

As enzimas digestivas em insetos geralmente estão relacionadas à dieta e a partir da natureza da alimentação predita pelo intestino médio, constituindo fatores essenciais para ocorrências de diferentes enzimas digestivas, tanto em aspectos qualitativo como no quantitativo, formando um único grupo de inseto no reino animal, dentro dessas características, o *A. diaperinus* possui hábitos alimentares bem diversificados, demostrando uma combinação de insetos fitófagos e onívoros, onde presença ou ausência de uma enzima determina o consumo de certos alimentos (MATHUR, 1969).

Neste sentido, pesquisas em biotecnologia têm procurado cada vez mais um controle bioquímico com a finalidade de diminuir ou evitar a exposição da população a esses agentes prejudiciais à saúde. Um exemplo alternativo no controle de pragas como agente pesticida é o uso de inibidores protéicos, pois as proteases intestinais de insetos representam um interessante alvo, já que a presença dessas enzimas digestivas é indispensável aos processos de digestão e absorção de nutrientes (FRANCO *et al.,* 1999).

Em se tratando de uma importante praga da indústria alimentícia, estudos relacionados ao controle do *A. diaperinus* têm aumentado nos últimos anos, os adultos em condições gerais são comedores, enquanto as larvas são adaptadas para alimentar-se em ração a base de linhaça, algodão, produtos oleaginosas, tabaco (DUNFORD e KAUFMAN, 2011). Por causa da sua importância econômica estudos sobre comportamento, sobrevivência e metabolismo têm sido realizados na tentativa de se descobrir formas de controle desta espécie (CHERNAKI e ALMEIDA, 2001). Em estudo de avaliação do efeito da temperatura foi constatado que houve desenvolvimento do *A. diaperinus* em todas as temperaturas estudadas (22ºC, 25ºC, 28ºC e 31ºC), sendo que a 22ºC houve desenvolvimento lento e menor sobrevivência. A temperatura de 31°C mostrou-se a mais favorável para o desenvolvimento com alta sobrevivência (SILVA *et al*., 2001), observou-se que as larvas necessitam de elevados teores de umidade (maiores que 80%) para seu desenvolvimento, porém umidades relativa maior que 80% favorecendo o aparecimento de fungos nas camas aviárias o que aparentemente, não alterara o ciclo do coleóptero. Além disso, existe registro de correlação positiva entre a presença do fungo *Aspergillus* e bom desenvolvimento do *A. diaperinus* (WILSON *et al*., 1968).

Outras características do *A. diaperinus* é apresentar-se como disseminador das bactérias *Salmonella Thyphimurium, Salmonella sp*, *Escherichia coli, Bacillus sp, Streptococcus sp*, dos protozoários *Eimeria sp, Gregarina alphitobii, Histomonas meliagridis*, dos vírus *Gumboro, Leucose e Reovírus*, dos Helmintos *Choetaenia infundibulum, Raillietina cesticillus, Hymenolepis carioca, H. cantiana, Heterakis gallinae* e dos fungos *Fusarium sp, Aspergillus sp, Candida sp* (SNEDEKER *et al*., 1967). Além disso, o *A. diaperinus* prejudica a conversão alimentar, no ganho de peso, pois as aves desenvolvem o hábito de se alimentar das larvas do inseto no lugar da ração balanceada (GOODWIN *et al*., 1996).

2.4. Impacto econômico e medidas de controle do *Alphitobius diaperinus* na produção de aves.

No setor avícola, as pragas aumentam o custo de produção e é um dos principais fatores na propagação de doenças aviárias. A biologia, comportamento, controle de ectoparasitas e pragas são descritos em relação à habitação e diferentes práticas de produção para os criadores de frangos (AXTELL *et al.,* 1999). Como descrito no item anterior, o inseto *A. diaperinus* é o responsável pela transmissão de inúmeros agentes patológicos, causadores de enfermidades, podendo comprometer a produção de todo um rebanho avícola (CHERNAKY e

LEFFER *et al.,* 2002). Isso traz enormes impactos econômicos para a avicultura, para a manutenção do negócio, em função das perdas por mortalidade, redução dos resultados de desempenho, aviários vazios durante quarentena, comprometimento da evolução da atividade, imposição de barreiras sanitárias e redução de vendas de produtos (BONATTI *et al*., 2008).

Além de responsável pela proliferação de doenças, o *A. diaperinus*, pode provocar danos nas instalações avícolas ao destruírem a proteção de poliuretano usada para isolamento térmico dos galpões, o que implica na redução da eficiência da estrutura, necessitando de troca a cada dois ou três anos (DESPINS *et al*., 1987). Os danos supracitados são ocasionados pela ação das larvas que escavam túneis no material isolante para empuparem (DESPINS *et al*., 1987) (figura 2). O contato direto das aves com o *A. diaperinus* propicia a mudanças comportamentais em sua alimentação, substituindo a ração balanceada, pelas larvas e os adultos em movimento presentes no ambiente, levando a uma perda significativa no peso médio corporal das aves (DESPINS e AXTELL, 1995).

Diante deste ambiente favorável na proliferação do *A. diaperinus,* medidas de controle se tornam necessárias para amenizar as perdas e os prejuízos ocasionados pelo inseto praga. Devido sua distribuição populacional apresentar alta heterogeneidade, em uma granja agrícola, o controle do *A. diaperinus* se torna um verdadeiro desafio (JAPP *et al*., 2010). O ambiente de produção avícola habitado pelo *A. diaperinus* dificulta a utilização de inseticidas químicos em seu controle, pois esses insetos possuem o hábito de se inserir no interior da cama aviária, entre as cortinas de proteção e nas frestas dos galpões, obtendo resultados poucos expressivos na aplicação do produto (ARENDS, 1987).

A utilização de diferentes práticas de manejo, associado à aplicação de produtos químicos sintéticos como Piretróides e organofosforados, são os métodos de controles comumente utilizados (CHERNAKI *et al*., 2002). Piretróide como cipermetrina são lipossolúveis, penetram facilmente nos insetos (BOOTH *et al*., 1988); Organofosforados diclorvós, atuam como inibidor de acetilcolinesterase resultando no acúmulo de acetilcolina, promovendo hiperexcitabilidade e hiperatividade do inseto, seguidas de incoordenção muscular, convulsões e morte (STEELMAN, 2008). Porém um dos principais entraves são os altos níveis de contaminação gerados por esses inseticidas químicos, tratando-se de um produto de origem animal utilizado na alimentação humana, problemas como o acúmulo de resíduos no ambiente de produção, no desenvolvimento de populações resistentes, riscos de contaminação tanto do produtor como das aves (KAUFMAN *et al*., 2008).

Figura 2: **Cascudinhos sobre muretas e pilares.** (Fotos: Renato Teixeira e Andrea Panzardi) (http://www.ourofinosaudeanimal.com/blog/cascudinho-x-salmonelose/).

2.5. Organização do sistema digestivo nos insetos.

Muitos insetos herbívoros possuem um intestino posterior tubular, e a presença de vários compartimentos dilatados ou câmara de fermentação, que abrigam uma densa microbiota, que auxiliam na digestão, prolongando o tempo de permanência dos alimentos e sua degradação por simbiontes microbianos (BRUNE *et al*., 2015).

Morfologicamente, o tubo digestório dos insetos é subdivido em três partes distintas anterior, médio e posterior (figura 3). O intestino anterior inicia se na cavidade bucal, faringe, esôfago e no papo (CHAPMAN, 1985). O intestino anterior é revestido por uma cutícula e em alguns insetos ele é reduzido a um tubo reto. As glândulas salivares podem ser localizadas na cabeça e no tórax, são responsáveis por auxiliar na digestão, pela produção de enzimas adicionadas aos alimentos através da saliva, além disso, a saliva é responsável pelo umedecimento do substrato, limpar as peças bucais, ou no caso de insetos hematófagos produzirem substâncias anticoagulantes (PEREIRA *et al*., 1996). O papo em muitos insetos é um compartimento que tem a função de armazenamento e serve também como local para outros tipos de digestão (CROWSON, 1981). O proventrículo em alguns insetos é um órgão triturador e em algumas espécies possuem uma válvula controladora que permite a passagem de alimento para o intestino médio, principal região de digestão e absorção de nutrientes (CHAPMAN, 1985).

O intestino médio consiste em uma forma de tubo simples, a partir do qual à presença de cecos gástricos, geralmente ramificados a partir da extremidade anterior do intestino médio, sendo revestido por uma membrana peritrófica. A membrana peritrófica é composta por quitina e proteínas, tem origem nas células do anel imaginal situado logo após a válvula cardíaca, seguindo pelo mesentério na região do piloro, com seus tubos de malpighi e logo depois do íleo e o reto, abrindo este para o exterior através do ânus (BARTH *et al*., 1954), evitando que as células epiteliais entre em contato direto com o alimento, envolvendo todo alimento ingerido, pelo qual separa o bolo alimentar em dois compartimentos distintos, o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico (figura 3).

O epitélio do intestino médio é composto por células colunares e são encontradas em grandes quantidades, e uma das principais virtudes destas células colunares é assumir várias formas, estão envolvidas na absorção e na excreção de água, secreção de enzimas digestivas (RIBEIRO *et al*., 1990). O intestino posterior inclui o íleo e o reto, que estão envolvidos na absorção de íons e água. O intestino posterior e revestido por uma cutícula, sendo reduzido a um tubo reto, entretanto em alguns insetos o intestino posterior possui seu interior modificado

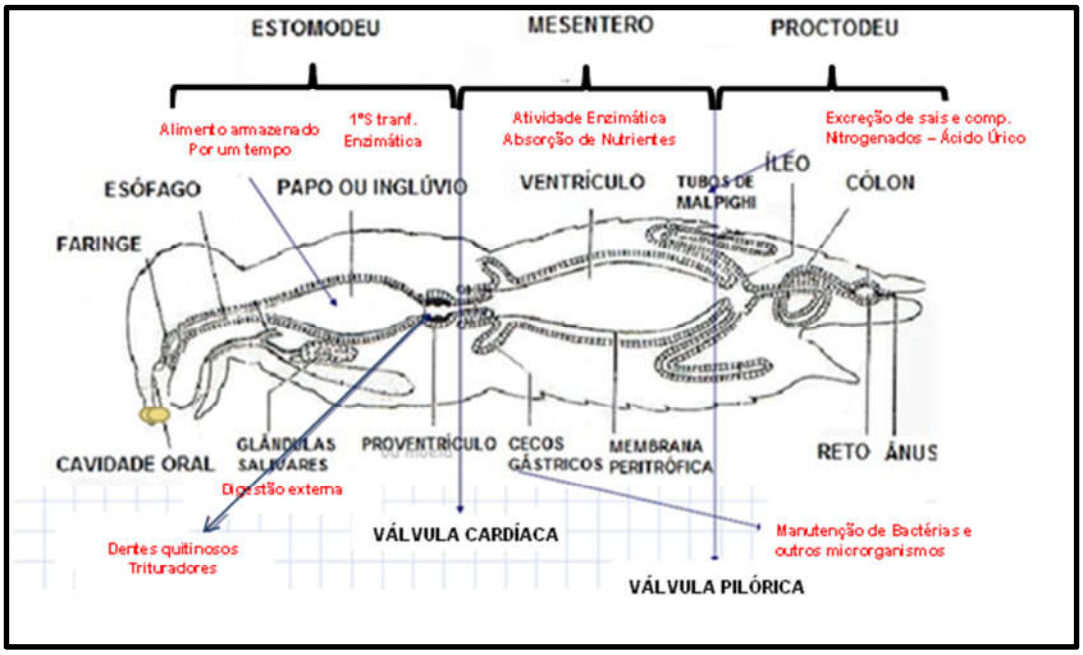


Figura 3. **Diagrama esquemático da estrutura do sistema digestivo de um tipo de inseto** (LINAN, 1998).

como uma câmara de fermentação, essas estruturas são responsáveis por abrigar microrganismos que podem auxiliar na digestão, como por exemplo, a digestão da celulose (TERRA e FERREIRA, 1994).

2.6. Organização do sistema digestivo em Coleóptera.

O intestino médio da ordem Coleóptera apresenta certas variações que dependem do grupo taxonômico e dos seus hábitos alimentares. Em termos gerais, mantém o mesmo padrão morfológico característicos de outros insetos, com três regiões distintas estomodeu, mesêntero e proctodeu (CROWSON, 1981). Em coleópteros o processo digestivo parece ocorrer no espaço endoperitrófico das larvas de *Attagenus megatoma* (Coleóptera; Dermestidae), (BAKER, 1981) e de *Tenébrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae), (TERRA *et al.,* 1985), e a fase final da digestão de proteínas ocorre na superfície de células do intestino médio, sob a ação de aminopeptidases microvilar (FERREIRA *et al*., 1990). Em algumas espécies de coleopteras o papo geralmente é ausente ou se apresenta pouco desenvolvido (CROWSON, 1981). Segundo BAKER, (1984) as larvas de *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae), não possuem papo e a digestão dos oligossacarídeos e oligopeptídeos ocorrem principalmente em células da superfície do intestino médio. Estudos realizados em larvas de *Pyrearinus termitilluminans* (Coleóptera: Elateridae), o processo inicial da digestão ocorre fora das larvas, por enzimas presentes em fluídos que são regurgitados sobre o alimento. Na parte anterior do intestino médio das larvas de *T. molitor* o pH varia entre 5.2 - 5.6 na parte posterior do intestino médio variam entre 7.8 - 8.2. Estudos identificaram a atividade de cisteíno proteases na parte anterior do intestino médio, com o meio levemente ácido, devido a o baixo potencial redox à atividade das tripsinas foram determinadas na parte posterior do intestino médio, predominantemente alcalino, similarmente ao que ocorre com a quimotripsina, também foram identificadas na parte posterior do intestino médio, pois essas serino proteases apresentam maior eficiência em pH mais alcalinos (VINOKUROV *et al.,* 2006a) sugerindo um padrão universal no processo da digestão em Coleópteras. Em adultos de *T. molitor* as enzimas estão distribuídas nas regiões do intestino médio e são semelhante ao de suas larvas (TERRA *et al.,* 1985)

2.7. Digestão em insetos.

Uma das principais características da Classe Insecta é a capacidade de adaptarem-se aos mais diversos tipos de ambientes e possuir hábito alimentar bem diversificado. Para o

desenvolvimento de meios de controle biológico deve-se ter conhecimento a cerca dos sistemas e processos digestivos de insetos (SILVA *et al*., 2012). Por causa disso os estudos relacionados à digestão de insetos desenvolveram-se muito nas últimas décadas. Os mecanismos digestivos de insetos têm mostrado uma ampla variedade informações, uma vez que esta classe apresenta uma multiplicidade de habitats alimentares altamente adaptadas desde espécies fitófagas até as espécies hematófagas (SILVA *et al*., 2012).

Polímeros como amido, celulose, hemicelulose e proteínas, fazem parte dos principais constituintes dos alimentos utilizados pelos insetos que requer digestão. Em consequência dessa diversidade de alimentos, esses animais desenvolveram a habilidade de expressar diferentes enzimas digestivas (WIGGLESWORTH, 1972). Grande parte das dietas desses insetos, também é utilizada como importante fonte de alimento para humanos, exemplo disso são as sementes de leguminosas ricas em proteínas, carboidratos e lipídeos, que deste modo sofrem predação. Por possuírem essas habilidades alguns podem ser classificados como pragas em culturas agrícolas, em estocagem de alimentos e grãos (TERRA *et al.,* 1996). A degradação desses alimentos ingeridos pelos insetos ocorre em três etapas distintas, pelo qual todo processo digestivo ocorrem em diferentes compartimentos do intestino médio, responsáveis por executa uma única função fisiológica e age como integrante metabólico, digestivo e unidade imunológica, tais características são responsáveis pela expressão de algumas enzimas digestivas em região especifica no intestino (BUCHON *et al*., 2015).

A primeira fase ocorre no compartimento anterior do intestino médio, em que as enzimas estão envolvidas na digestão de macromoléculas, tais como amido, lipídios, e grandes proteínas; a porção intermediária do intestino médio é responsável pela segunda fase da digestão, exibe um ambiente mais ácido, necessário no processamento de algumas moléculas mais simples, como açucares, aminoácido e ácidos graxos, o pH baixo também auxilia na redução dos íons metálicos, que são posteriormente absorvidos na região proximal do intestino médio posterior e finalmente o intestino médio posterior que é responsável pela absorção máxima de nutrientes, que são utilizados imediatamente ou destinados ao armazenamento, (BUCHON *et al*., 2015).

O pH do conteúdo intestinal é uma das principais propriedades que comprometem diretamente o desempenho dessas enzimas e na digestão, inúmeros estudos têm relatado que dentre as diferentes regiões do intestino médio dos insetos, apresentam diferentes valores de pH (TERRA *et al*., 1994).

2.8. Enzimas proteolíticas e proteases em insetos.

As hidrolases peptídicas são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas de proteínas, sendo conhecidas como proteases. Em comum com outras hidrolases em reações proteolíticas, também há o envolvimento de moléculas de água na formação de produtos (WHITAKER, 1994). Proteases regulam o destino, localização e atividade de várias proteínas, modulam as interações proteína-proteína, produzem novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento da informação celular, geram, traduzem e amplificam os sinais moleculares. Por causa dessa diversidade de funções, as proteases estão implicadas, além dos processos digestivos, nos mecanismos de replicação e transcrição, proliferação celular, morfogênese e remodelação tecidual, eventos de "heat shock", angiogenese, neurogenese, ovulação, fertilização, hemostasia, reparo celular, coagulação sanguínea, inflamação e apoptose (OTÍN e BOND, 2008).

As proteases são inicialmente divididas em endopeptidases e exopeptidases, que se diferenciam em função da região onde atuam entre as ligações peptídicas (HOOPER, 1990). As endopeptidases são enzimas que iniciam o processo de digestão das proteínas, quebrando as ligações internas ao longo da cadeia peptídica; as exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas, nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e, assim podem ser denominadas aminopeptidases ou carboxipeptidases (SIMONE *et al.,* 2001). A variabilidade de informação estrutural e mecanistico das proteases levam as diferentes possibilidades de classificação. Com base nos mecanismos de catálise, proteases podem ser classificadas em seis classes distintas, proteases aspárticas, glutâmicas, metaloproteases, cisteino proteases, serino proteases e treonina proteases (NEURATH, 1984). As três primeiras classes utilizam a água ativada como nucleófilo para atacar a ligação peptídica do substrato, enquanto nas outras classes o nucleófilo é o resíduo de aminoácido cisteína (Cys), serina (Ser) ou treonina (Thr) localizada no sítio ativo das enzimas pertencentes às classes cujos nomes são derivados desses aminoácidos (OTÍN e BOND, 2008).

Atualmente as enzimas proteolíticas estão distribuídas em diferentes famílias (www.merops.sanger.ac.uk). Estas famílias estão subdivididas em clãs, representados por letras, AA, AC, AD, SC, SB (RAWLINGS *et al*., 2010) de acordo a sua origem evolutiva, estrutura terciaria, ou ainda pela presença de sequências conservadas próximas ao sitío catalítico.

Insetos herbívoros apresentam uma grande diversidade de proteases digestivas, em que insetos pertencentes às ordens Lepidoptera e Diptera, geralmente utilizam serino proteases na digestão das proteínas, enquanto os da ordem coleóptera utilizam cisteíno proteases

(MURDOCK *et al*., 1987). No entanto é importante ressaltar que cada espécie tem seu próprio conjunto de enzimas, que estas enzimas são dependentes do pH do intestino médio de cada espécie e oferecem condições ideais para atividade proteolítica (WIELKOPOLAN *et al.*, 2016). Algumas espécies pertencentes à família Curculionidae, como por exemplo, *Sitophilus oryzae* e *Hypera postiça* (OPPERT *et al*., 2000), e membros da família Tenebrionidea como: *Tenebrio molitor, Tenebrio. castaneum* e *Tenebrio confusum* (CRISTOFOLETTI *et al*., 2005), utilizam proteases do tipo serino e cisteíno no processo de digestão das proteínas, o mesmo ocorre em Chrysomelidae, *Leptinotarsa decemlineata*, em que também utilizam cisteíno proteases e proteases aspárticas para digestão das proteínas (GRUDEN *et al*., 1998). Larvas de lepidóptera necessitam de um complexo de enzimas proteolíticas, inculindo tripsina, quimotripsina, elastase, protease tipo catepsina B, aminopeptidases e carboxipeptidases para digestão das proteínas, entretanto as serino proteases encontram-se predominante no intestino de lepidóptera (TABATABAEI *et al*., 2011).

2.8.1. Proteases Aspárticas.

As proteases aspárticas estão amplamente distribuídas entre vertebrados, plantas, leveduras, nematóides, parasítas, fungos e vírus (DAVIES, 1990). A protease aspártica encontra-se agrupadas em 16 diferentes famílias, com base na homologia das sequências de aminoácidos, que por sua vez estão distribuídas em cinco diferentes clãs (RAWLINGS *et al.*, 2010). As principais diferenças entre os membros destas famílias de proteases estão relatadas com propriedades catalíticas especificas e com sua localização celular, o que resulta diferentes funções biológicas (TIMOTIJEVIC *et al*., 2010). As proteases aspárticas partilham de várias características em comum incluindo uma estrutura tridimensional conservada, constituída por dois lóbulos separados por uma fenda catalítica, além da presença de pontes de dissulfetos em sua estrutura (SZECSI, 1992). Amplamente distribuída na natureza, às proteases aspárticas são responsáveis por processos biológicos de grande importância e estão envolvidas em uma variedade de funções, incluindo processos digestivos, como a pepsina e quimosina, processamento de pró-proteína como a catepsina e carboxipeptidase A e a renina responsável pelo controle da pressão sanguínea (COOPER, 2002). Elas são caracterizadas por dois resíduos de ácido aspárticos no sitio ativo e desempenham atividade máxima em pH ácidos, nas faixas de pH 3,5 e 5,0 (DAVIES, 1990).

Segundo GREENBERG e PARETSKY (1955), em homogeneizado do corpo inteiro de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), foi possível identificar pela primeira vez a atividade proteolítica de proteases aspárticas, com atividade máxima em pH ácido entre 2,5 e 3,0. Esses

resultados foram confirmados por LABREMONT e colaboradores (1959), que comprovaram a presença de uma protease ácida restrita ao intestino médio da mosca e que exibe baixo pH. Essas proteases são inibidas pela pepstatina, inibidor característico na identificação desta classe de enzima (DAVIES, 1990). Proteases aspárticas foram encontradas nas seguintes famílias de Coleóptera: Melóidae, Chysomelidae, Coccinelidae (WOLFSON e MURDOCK, 1990), mas não em Tenebrionidae (TERRA e CRISTOFOLETTI, 1994). A maioria das proteases aspárticas mostra atividade máxima em pH entre 3 e 4, e tem ponto isoelétrico na faixa de pH 3,0 e 4,5. Suas massas moleculares estão na faixa de 30 kDa e 45 kDa (BLUNDELL *et al*., 2019). Assim, é possível que as proteases aspárticas ocorram em conjunto com as cisteíno proteases em Coleóptera, como ocorre em *Hypera postiça* (Coleóptera: Curculionidae) (WILHITE *et al*., 2000). Em Bruchidae a cisteíno proteases são utilizadas exclusivamente no processo digestivo das proteínas, no entanto em algumas espécies são caracterizadas a presença de proteases aspárticas (SILVA *et al*., 2001).

2.8.2. Metaloproteases.

As metaloproteases estão presentes em todos os reinos, compostas por 15 clãs, divididas em 72 familias. Estas proteases necessitam de íons de metais no processo catalítico e são inibidas por agentes quelantes como EDTA (MOCHIZUKI, 1998). Essas proteases são responsáveis por diferentes funções incluindo processamento de pequenos peptídeos, regulação do ciclo celular, tráfico de proteínas e transdução de sinais (PEER, 2011). As aminopeptidase N, são exopeptidases e isoformas de metaloproteases amplamente presentes no intestino médio de insetos, que clivam aminoácidos neutros de peptídeos da porção N-terminal (TERRA e FERREIRA, 2012). Estas metaloproteases pertencem a família M1, que incluem enzimas do tipo aminopeptidase A (NANUS *et al*., 1993), aminopeptidase B (CADEL *et al*., 1997). Independentemente do pH do lúmen do intestino médio nas diferentes espécies de insetos, o pH ótimo das aminopeptidases nos insetos são alcalinos, estão em uma faixa de 7,2 a 9,0 e massa molecular entre 90 à 130 kDa (COSTA *et al.*, 2011; TERRA *et al.,* 2005). As aminopeptidases são classificadas com base na sua dependência de íons metálicos normalmente zinco (Zn^{2+}) ou magnésio (Mg^{2+}), e sua especificidade para o substrato (COSTA *et al* 2011). Íons de cálcio também se ligam as aminopeptidases N, elevando a atividade proteolítica (HUA *et al*., 1998). As aminopeptidases A, também conhecida como angiotensinase e glutamil aminopeptidase, é ligada à membrana e cliva resíduos de ácidos na região N-terminal, possui mais afinidade com ácido aspártico e ácido glutâmico como substrato (NORÉN *et al*., 1986). As aminopeptidases estão ancoradas às membranas através

de uma ligação covalente com glicosil-fosfatidilinositol e solubilizam-se bem em solução detergente (HOOPER e TURNER, 1998). Em conjunto com as endopeptidases e carboxipeptidases, as aminopeptidases desempenham um importante papel na fase terminal da digestão das proteínas (WANG *et al*., 2005).

Análise na sequência da Aminopeptidases N de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), foram altamentes homólogos com a de *Manduca sexta*, e a presença de íons de zinco ligados à enzima, são supostamente de metaloproteases (KNIGHT *et al*., 1995). As aminopeptidases N foram isoladas a partir do intestino médio de lepidópteras (LOMATE e HIVRALE, 2010), Diptera (POOTANAKIT *et al*., 2003), Hemiptera (CRISTOFOLETTI *et al*., 2006), Hymenoptera (DEL LAMA *et al*., 2001) e Coleóptera (KAISER-ALEXNAT, 2009). Em hemípteras as aminopeptidases encontra se na porção solúvel e aprisionada no espaço perimicrovilar como demostrado em *Rhodinius prolixus* (Hemiptera: Rhodnius) (FERREIRA *et al*., 1988). Com base nestes critérios, aminopeptidases de *Rhynchosciara americana*, *Trichosia pubescens*, *Musca domestica*, *Anopheles stephensi*, estão inseridas nas membranas perimicrovilares do intestino médio através de um peptídeo hidrofóbico (NASCIMENTO *et al.,* 2003).

2.8.3. Serino proteases.

Com base na sequência de aminoácidos, a estrutura terciária e a ordem dos resíduos da tríade catalítica serina, histidina e ácido aspártico, as serino proteases são compostas por 12 clãs e dividida em 85 famílias, entretanto a maiorias das serinos proteases identificadas são de animais (BARRETT *et al.,* 1994). Contudo, existem diferenças significativas, que determina a distribuição dessas proteases em diferentes clãs. Um exemplo são as proteases pertencentes ao clã das proteases aspárticas, estão significativamente representadas nos eucariotos, porém são raros em genoma de procariotos e de plantas (BARRETT *et al.,* 1994). O nome origina-se da presença de um resíduo de serina nucleofílica no sitio catalítico da enzima, que ataca o grupo carbonila da ligação peptídica do substrato, formando intermediário acil-enzima. A nucleofilicidade da serina catalítica é caracteristicamente dependente da tríade catalítica, da presença de resíduos de ácido aspártico, histidina, e serina (BLOW *et al*. 1969). Entretanto muitas serino proteases empregam um mecanismo de díade, mais simples em que a lisina e histidina encontram-se emparelhado com o catalizador (DI CERA, 2009). As serino proteases são enzimas que podem ser encontradas e distribuídas por quase todos os organismos vivo, desde mamíferos, insetos, vírus entre outros (PAGE e DI CERA, 2008).

Cerca de um terço de todas as enzimas proteolíticas são serino proteases e estão subdivididas em duas superfamílias, que desenvolveram mecanismo catalítico semelhante. A tripsina e a quimotripsina fazem parte da primeira superfamília de serino proteases, que estão presentes em animais, enquanto as subtilisinas estão presentes na maioria das bactérias e de fungos (HU e LEGER, 2004). As serino proteases são enzimas alostéricas, onde a atividade pode ser modulada, afetando o equilíbrio entre a forma inativa e a forma ativa dessas enzimas. A alosteria está frequentemente associada a transições conformacionais em larga escala em proteínas multiméricas (PERUTZ, 1970). A ativação de muitas serino proteases tipo tripsina necessita de um precursor de zimogênio, a posição de clivagem desse precursor da pró-proteína, é semelhante em todos os membros dessa família. (NEURATH *et al*., 1957).

As quimotripsinas são enzimas que apresentam dois domínios justapostos β-barril, em que resíduos catalíticos formam ligações entre esses domínios (BAZAN *et al*., 1990). Sessenta e três sequências gênicas de quimotripsina já foram descrita. Correspondendo a 22 espécies, todas as sequências contém um peptídeo sinal, um peptídeo de ativação, a tríade catalítica das serino proteases, três pares de cisteínas, a porção N-terminal conservada e serina, glicina ou tirosina na posição 189 conferindo a especificidade (BOTOS *et al.,* 2000).

A primeira tripsina de invertebrado reportada foi publicada em 1960, quando secreções de enzima digestiva foram responsáveis pela hidrólise de nutrientes poliméricos de alimentos utilizados por insetos (KEIL *et al*., 1968). O intestino médio das larvas de lepidóptera possui um ambiente proteolítico com várias especificidades, entre outras serino proteases tipo tripsina, quimotripsina, elastase, responsáveis pela degradação de proteínas (SRINIVASAN *et al*., 2006). Sob a complexidade de múltiplas proteases, existem insetos que possuem diversas isoformas de proteases; por exemplo, o intestino de *Helicoverpa armigera*, em que foram identificados vinte isoformas de serino proteases ativas (PATANKAR *et al*., 2001). Serino proteases do tipo tripsina e quimotripsina são comumente encontrados no intestino médio de lepidópteras e coleópteras (WIEMAN e NIELSEN, 1988). Em *Attagenus megatoma*, (Coleóptera: Dermestidae), conhecido como besouro do carpete, foram descritas duas proteases do tipo tripsina e quatro do tipo quimotripsina (BAKER, 1981).

2.8.3.1. Tripsinas.

Proteases tipo tripsina são enzimas que pertencem à família de proteases S1, desempenham eficiência catalítica, seletividade de substrato e múltiplos níveis de regulação, potencialmente como um importante suporte prontamente associado a outros módulos auxiliares de proteína (PAGE *et al*., 2008). A maiorias das tripsinas têm massa molecular

entre 20 à 35 kDa, um valor de ponto isoelétrico variando na faixa de 4,0 à 5,0 entretanto seu pH ótimo são sempre alcalinos, entre 8,0 à 9,0. Umas das principais características das tripsinas é a presença da tríade catalítica em seu sitio ativo, composta por resíduos de aspartato, histidina e serina, sendo uma das principais características da família de proteases S1 (BLOW *et al*., 1969). Elas apresentam especificidade para formar a ligação com o peptídeo do lado carboxílico, preferencialmente nos resíduos de arginina ou lisina e possuem a capacidade de ativar outras enzimas (FINGERMAN *et al*., 2002). Estudos ainda não comprovaram se as tripsinas em insetos são dependentes de uma concentração moderada de Ca^{2+} para sua atividade ou estabilidade, que é comumente observado em tripsina de mamíferos (LOPES *et al.*, 2006). Além de serem importantes nas etapas digestivas, estas enzimas envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos importantes, incluindo coagulação sanguínea, fibrinólise, imunidade humoral e celular, transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (PAGE *et al.,* 2008).

As proteases tipo tripsina foram reportadas em várias espécies de insetos, entre eles encontram-se *Tenébrio molitor*, três espécies dos gêneros *Caribus* e as larvas de *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) e tem um sistema proteolítico baseado em serino proteases tipo tripsina (CHRISTELLER *et al*., 1989). Exceções importantes são as espécies de hemíptera, e espécies pertencentes à família Cucujiformia de coleópteras, em que não foi observado atividade de proteases tipo tripsina (TERRA e FERREIRA, 1994). Tripsinas foram isoladas em diferentes espécies de insetos, independentemente do valor do pH existente no tubo digestivo, por exemplo em lepidópteras foram encontradas tripsina em pH alcalino (TERRA *et al.,* 1994). Um exemplo em particular é seu envolvimento no processamento de toxinas inseticidas *de Bacillus thurigienses* e acentuando a dependência dos insetos a essas proteases para estas espécies de toxinas (OPPERT, 1999).

2.8.3.2. Quimotripsinas.

Quimotripsinas são serino proteases, encontradas em tecidos pancreáticos de vertebrados e são secretadas pelo duodeno. Em invertebrados, participam da hidrólise de amidas, ésteres e ligações peptídicas em proteínas, nos resíduos de aminoácidos do lado carboxílico como lisina ou arginina (BARRETT *et al.,* 2012). As quimotripsinas comumente presentam 245 resíduos de aminoácidos e cinco pares de ligações de dissulfetos, geralmente um único polipeptídio apresenta um massa molecular entre 25 kDa a 28 kDa (HAARD *et al*., 2000). A quimotripsina reconhece uma gama de compostos aromáticos, aminoácidos hidrofóbicos, incluindo fenilalanina, tirosina, triptofano e leucina (HEDSTROM *et al.,* 1992).

Existem três formas inativas de quimotripsinas, A e B sendo que ambas foram isoladas em pâncreas bovino e a forma C isolada de pâncreas de porco (LETH *et al.,* 1996). A forma estável da quimotripsina é composta por três cadeias polipeptídicas, ligadas por pontes de dissulfetos, uma ligada à cadeia B e duas ligadas à cadeia C (KRAUT, 1971). O mecanismo de catálise das quimotripsinas pode ser dividido em duas etapas: Na primeira etapa, o substrato se liga a estrutura da quimotripsina, através dos resíduos de serina e histidina para formar um intermediário e na segunda etapa a água no papel de solvente cliva o intermediário éster, para formar ácido carboxílico e restabelecer a forma ativa da enzima (KALLIES *et al.,* 1996).

Embora quimotripsina apresentem menos relatos em insetos, quando comparado à tripsina, as quimotripsinas apresentam grande importância fisiológica e vários trabalhos reportam sua atividade proteolítica como relatado em lepidóptera *Heliothis virescens* (JOHNSTON *et al*., 1995), *Spodoptera littoralis* (LEE *et al*., 1995a) e *Lacanobia oleracea* (GATEHOUSE *et al*., 1999), bem como nos orthoptera *Locusta migratória* (LAM *et al*., 1999). Entretanto em *Tenebrio molitor,* a quimotripsina se difere em várias características das quimotripsina de mamíferos (ELPIDINA *et al*., 2005). Em *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae), uma importante praga de cereais, embora apresente um intestino médio levemente ácido, contudo proteases ativas importantes para digestão são alcalinas, serino proteases tipo quimotripsinas e tripsinas foram relatadas nas glândulas salivares de suas larvas, sendo as quimotripsina consideradas como majoritária no processo digestivo (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2009). O besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) é um coleóptero da família Crisomelídeos, a atividade da quimotripsina foi caracterizada nos espaços endoperitróficos, ectoperitróficos e com menor intensidade no tecido epitelial do intestino médio, a presença da quimotripsina no sistema digestivo desses insetos, podem ter implicações importante, utilizando inibidores de proteases ou δ-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, no seu controle (NOVILLO *et al*., 1997).

2.8.4. Carboxipeptidases.

Carboxipeptidases hidrolisam aminoácidos na posição C-terminal da cadeia peptídica e classificada em três subcategorias, de acordo com seu mecanismo catalítico. As carboxipeptidases metálicas incluindo as carboxipeptidases A e B requerem cátions bivalentes, na região catalítica, normalmente zinco (FERREIRA *et al*., 2015). As serino-carboxipeptidases, incluindo as carboxipeptidases C e D contam com uma tríade catalítica composta por resíduos de serina, aspartato e histidina e um terceiro grupo são as cisteíno-

carboxipeptidase, que incluem somente catepsina X (RAWLINGS *et al*., 2010). Em geral as carboxipeptidases desempenham importantes funções fisiológicas, tais como digestão de alimentos, coagulação de sangue, regulação de processos biológicos em tecidos e órgãos (ISOE *et al*., 2009). As carboxipeptidases mostram diferentes especificidades pelos substratos, especialmente nos resíduos presentes na extremidade C do substrato, a caboxipeptidase A prefere resíduos hidrofóbicos como fenilalanina ou tirosina na posição um e as carboxipeptidase C e D preferem substratos com resíduos básicos como arginina ou lisina nesta mesma posição (SCHECHTER *et al*., 1967). As serino-carboxipeptidases são geralmente glicoproteínas compostas de duas cadeias polipeptídicas, ligadas por pontes de dissulfetos, com um massa molecular entre 40 kDa a 75 kDa (BREDDAM, 1986). A carboxipeptidases foi identificada em vários insetos, como por exemplo, em *Anopheles gambiae* (EDWARDS *et al*., 1997), *Aedes aegypti* (LAVAZEC *et al*., 2005), *Trichoplusia ni* (BROADWAY *et al*., 1997). A maioria das carboxipeptidases de insetos possuem massa molecular entre 20 kDa à 50 kDa (TERRA *et al*., 1994).

2.8.5. Cisteíno proteases.

As cisteíno proteases foram identificadas e estudadas em detalhes em diferentes organismos o que inclui, vírus, bactérias, protozoários, plantas, mamíferos (SEMASHKO *et al*., 2014). As cisteíno proteases digestivas também foram descritas em alguns insetos pragas, incluindo algumas famílias de besouros, pulgões e tripes (VINOKUROV *et al*., 2009). Elas são enzimas intracelulares, que ocorre nos lisossomos, ativadas por compostos sulfidrilas e hidrolisa ligações peptídicas internas de proteínas. Estruturalmente as cisteíno proteases são bilobadas, com um sítio catalítico localizado entre os lobos, denominado de domínios L e R, orientados pelos lados C-terminal e N-terminal respectivamente. No sítio catalítico das cisteíno protease é encontrado um resíduo de císteina presente no domínio L e resíduos de histidinas presentes no domínio R (MCGRATH, 1999).

As cisteíno proteases são compostas por 10 clãs, divididos em 89 famílias, expõem um resíduo de cisteína no sitio catalítico essencial para hidrólise do substrato. A família C1 das cisteíno proteases, apresenta atividade ótima em ambiente redutor mais ácido, em pH que varia entre 3,0 e 6,5. As proteases pertencem ao clã CA, que apresentam semelhança com a papaína, contêm uma díade catalítica, com os resíduos de aminoácidos cisteína e histidina. Outros dois resíduos de aminoácidos estão presentes no sítio ativo das cisteíno proteases: um resíduo de glicina precedendo a cisteína catalítica e um resíduo de asparagina acompanhando a histidina catalítica. Acredita-se que a glicina auxilia na formação do "buraco" de oxiânion e

uma asparagina para orientar o anel imidazol da histidina catalítica (TURK *et al*., 2012). Caracterizado na família C1 encontra-se as catepsinas B, S, K, e L, em que a especificidade pelo substrato esta atribuída pelo resíduo de aminoácido presentes na região S2, preferencialmente quando essas enzimas estão ocupadas com aminoácidos hidrofóbicos nesta região (MÉNARD *et al*., 1993).

As cisteíno proteases apresentam similaridade mecanísticas com a serino proteases, porém são melhores nucleófilos devido ao nível extra de elétrons presentes no enxofre do grupo tiol (SAJID *et al*., 2002). O massa molecular das cisteíno proteases vária entre de 24 kDa à 40 kDa e o pH ótimo na faixa de 5,5 a 6,0 (ZINKLER *et al.* 1992). Presente em quase todas as espécies de artrópodes, essas enzimas possuem um importante papel no processo digestivo (TERRA *et al.,* 2012). As cisteíno proteases são comuns no intestino médio de Hemípteras e Heteropteras, uma vez que estas enzimas também foram encontradas nos Pentatomidaes (HOUSEMAN *et al*., 1984) e Phymatidaes (HOUSEMAN *et al.,* 1985). Eventos evolutivos como adaptações ancestrais e a utilização de enzimas dos lisossomos para digerir proteínas, foram responsáveis pela ocorrência disseminada das cisteíno proteases no intestino médio dos insetos, favorecendo adaptações a os diferentes hábitos alimentares (TERRA e FERREIRA, 2005).

As cisteíno proteases são enzimas digestivas predominante de Coleopteras, encontradas presente no homogeneizado do intestino médio das *Acanthoscelides obtectus* onde foi isolado (WIEMAN e NIELSEN, 1988). Cisteino proteases apresentaram altos níveis de atividade no intestino médio de *Tenebrio molitor* (VINOKUROV *et al.,* 2006a) entre outras famílias de coleópteras tais como os Meloidae, Coccinellidae (*Epilachna varivestis*) (MURDOCK *et al*., 1987), Tenebrionidae (*Tenebrio castaneum*) (MURDOCK *et al*., 1987), Bruchidae (*Zabrotes subfasciatus*) (LEMOS *et al*., 1987), Chrysomelidae (*Calusobruchus maculatus e Acanthoscelides obtectus*) (CAMPOS *et al*., 1989), Curculionidae, e Silphidae (TERRA e CRISTOFOLETTI, 1996).

2.9. Inibidores de proteases.

Os Inibidores irreversíveis de proteases são responsáveis por modificações enzimáticas, sendo utilizado como um método útil na caracterização dos locais de ligações, bem como na identificação dos mecanismos catalíticos (PLAPP, 1982). Tendo uma importante aplicação em fisiologia e farmacologia, os inibidores de proteases são encontrados em plantas, animais e microrganismos (LASKOWISK *et al*., 1980). As plantas sintentizam

diferentes classes de inibidores de proteases pelo qual fazem parte do mecanismo de defesa natural das plantas contra insetos herbívoros e são vistos como compostos promissores para o desenvolvimento de culturas transgênicas capazes de expressar esses inibidores de proteases oferecendo uma maior resistência a insetos (GATEHOUSE, 2011). A maioria desses inibidores é registrada em órgãos como sementes e tubérculos, os quais contêm de 1-10% das suas proteínas totais como inibidores de proteases, com diferentes propriedades estruturais e bioquímicas, com a capacidade de inibir diferentes tipos de proteases (VOLPICELLA *et al.,* 2011).

Esses inibidores de proteases desempenham um importante papel nas diferentes funções fisiológicas das plantas, incluindo a função reguladora de atividade proteolítica endógena (RYAN, 1990), moduladores dos processos apoptóticos ou morte celular programada (SOLOMON *et al*., 1999). Estudos pioneiros revelaram o papel dos inibidores de proteases na interação planta-inseto, como eficiente mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas, quando induzidas em resposta ao ataque de insetos e patógenos (VOLPICELLA *et al*., 2003). Os inibidores de proteases são capazes de interferir na digestão de proteínas nos insetos, ligando se as proteases digestivas de insetos fitófagos, resultando em uma deficiência de aminoácidos, afetando o crescimento, desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência deste inseto (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002).

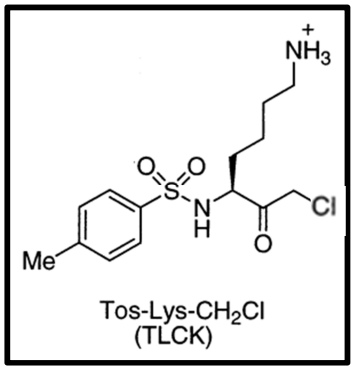
O inibidor de tripsina de soja (SBTI) foi o primeiro inibidor de tripsina extraído de planta a ser bem caracterizado, pertencente da família kunitz (DE MEESTER *et al*., 1998). Propõe-se que os inibidores dessa família tenham uma função defensiva contra proteases presentes em microorganismo e no aparelho digestivo de vertebrados e invertebrados (LASKOWISK *et al*., 1980). Esses inibidores são encontrados em leguminosas, possuem uma massa molecular em torno de 20 kDa e geralmente apresenta ligações de dissulfetos estabilizando sua estrutura (SOCORRO *et al*., 2002). Existem outras classes de inibidores de proteases procedentes de diferentes fontes e podem ser classificados baseados no tipo de enzima que inibem, como por exemplo, inibidor de serino proteases, inibidores de cisteíno proteases, inibidores de proteases aspárticas ou inibidores de metalocarboxipeptidases (MEHRABADI *et al*., 2012).

A aprotinina é um inibidor de serino proteases tais como tripsina, quimotripsina, plasmina e calicreína, também referidas como inibidor de tripsina pancreática bovina é um dos membros mais estudados da família de inibidores Kunitz (FRITZ *et al*., 1983). A aprotinina foi purificada pela primeira vez nos pulmões de suínos, este inibidor tinha um massa molecular de aproximadamente 7 kDa, onde também seu gene foi isolado e a sequência

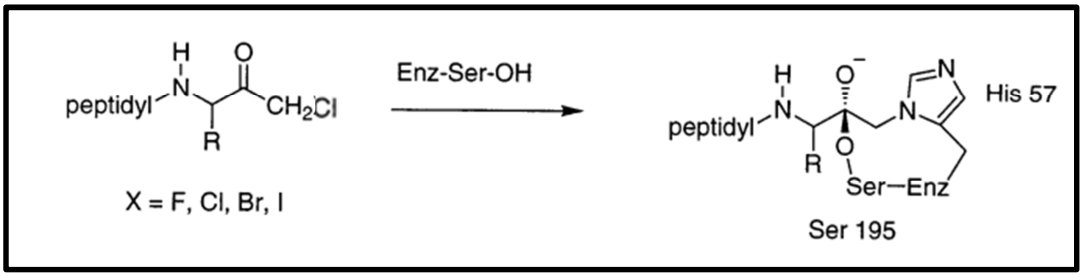
dos aminoácidos mostrou homologia em torno de 74% com a aprotinina bovina (CASSIA *et al*., 2008). Serino proteases são inibidas por fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF), como tripsina, antipaína, quimostatina entre outras (SUMANTHA *et al*., 2006). A cinética da reação do PMSF e análogos com tripsina e quimotripsina demostraram que o PMSF reage com o resíduo de serina presente no sítio ativo dessas proteases (FAHRNEY *et al*., 1963) (figura 5).
O inibidor de protease N-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) é uma cetona que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina, exercendo assim um efeito de inibição irreversível sobre a enzima (SHAW *et al*., 1965) (figura 4), entretanto não inibe quimotripsina (HARPER *et al*., 1985). O TLCK também é capaz de inativar cisteíno proteases como bromelina, clostripaína e papaína, alquilando irreversivelmente o resíduo de cisteína no sitio catalítico (JIA *et al*., 1995).

O inibidor de cisteíno proteases L-trans-epoxy succinil-L-leucylamido (4-guanidino)-butano (E-64), é altamente potente, irreversível e seletivo. A porção ativa do inibidor E-64, o grupo trans-epoxissuccinila se liga irreversivelmente a um grupo tiol ativo presente em muitas cisteíno proteases, tais como papaína e catepsinas B, H, L para formar uma ligação tioéster (BOLTER *et al*., 1997) (figura 6). A iodoacetamida é um reagente de alquilação reativo com grupo sulfidrila, bloqueando resíduos de cisteína reduzidos, sendo utilizado para caracterização da enzima e mapeamento peptídico (GURD, 2019) (figura 7). Além disso, é utilizado frequentemente como reagentes de alquilação, modificando os grupos tiol em proteínas por S-carboxiamidometilação e S-carboximetilação, respectivamente (GALI *et al*., 1997). O inibidor ácido iodoacético é utilizado como agente de alquilação e se liga irreversivelmente aos resíduos de aminoácidos de cisteína, esta reação é denominada carboxi-metilação, desta forma impedindo a religação das ligações de dissulfeto (figura 7). O ácido iodoacético é conhecido por inibir especificamente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD), sendo a inibição caracterizada pela formação de uma ligação covalente entre o inibidor e o resíduo de cisteína do sítio catalítico (figura 8) (NAGRADOVA, 1992).

A – Estrutura Quimica do TLCK.



B - Inativação de Serino Proteases.



C - Inativação de Cisteíno Proteases.

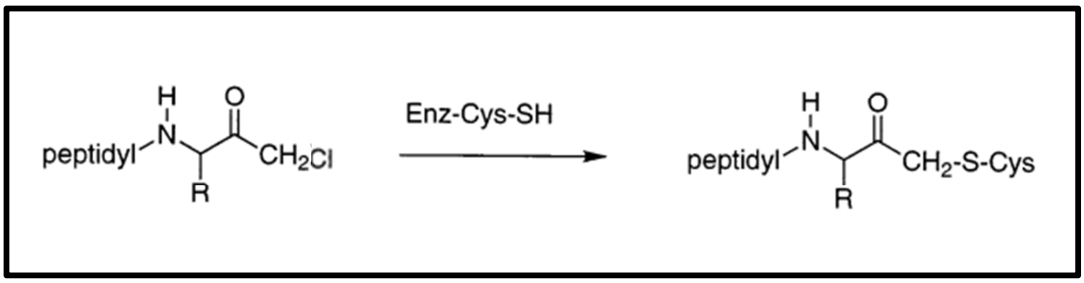
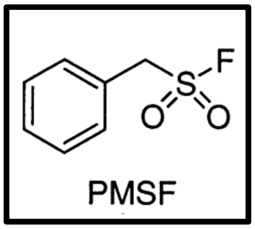


Figura 4: Esquema demonstrativo para inativação de serino proteases e cisteíno proteases pelo inibidor N-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) (JAMES *et al*., 2002).

A – Estrutura Quimica do PMSF.



B - Inativação de Serino Proteases.

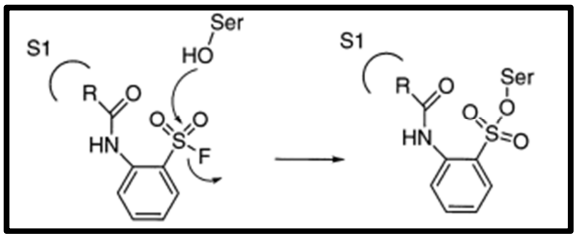
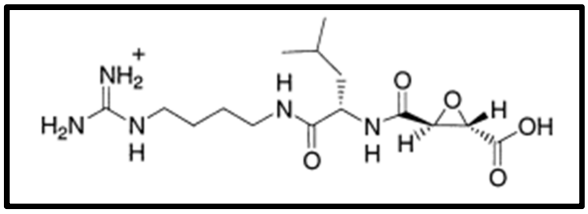


Figura 5: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (JAMES *et al*., 2002).

A – Estrutura Quimica do E-64.



B - Inativação de Cisteíno Proteases.

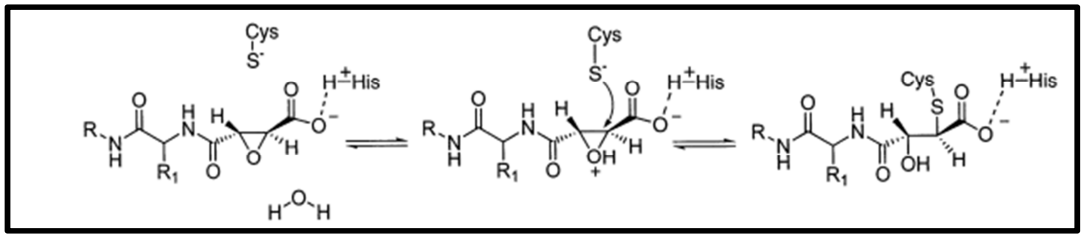
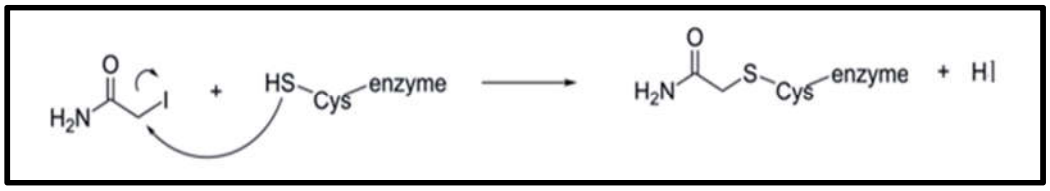


Figura 6: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor L-trans-epoxy succinil-L-leucylamido (4-guanidino)-butano (E-64) (JAMES *et al*., 2002).

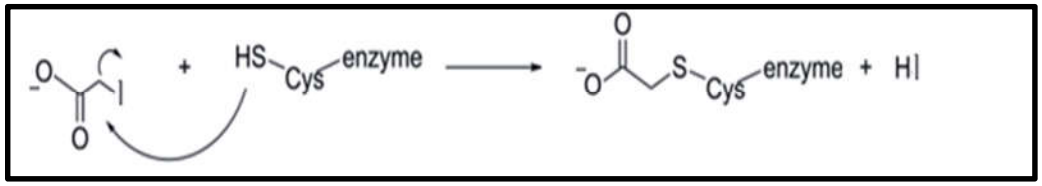
Inativação de Cisteíno Proteases Iodoacetamida.



Iodoacetamida L- Cisteína Modificação do Resíduo de Cisteína

Figura 7: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor iodoacetamida (SHIU *et al*., 2009).

Inativação de Cisteíno Proteases Ácido Iodo Acético.



Ácido Iodo Acético L- Cisteína Modificação do Resíduo de Cisteína

Figura 8: Esquema demonstrativo para inativação de cisteíno proteases pelo inibidor ácido iodo acético. (SHIU *et al*., 2009).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral.

Detectar e caracterizar a atividade de proteásica total em intestino médio de larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus*, bem como avaliar o efeito de diferentes dietas sobre a atividade enzimática detectada.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a atividade proteásica total presente no intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus* utilizando azocaseína como substrato;
- Avaliar o efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática;
- Avaliar a presença de diferentes classes de proteases utilizando inibidores específicos;
- Avaliar o perfil proteico do trato digestivo de larvas de *A. diaperinus*, quando submetidas a diferentes dietas, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida e zimografia;
- Detectar a atividade de cisteíno protease especifica utilizando substrato Z-phe-arg-AMC;
- Determinar as massas moleculares das proteínas presentes nos extratos enzimáticos através de eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Utilizar espectrometria de massas na identificação das proteases digestivas das larvas de *A. diaperinus.*

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Animais

Os insetos *Alphitobius diaperinus,* utilizados nos experimentos foram mantidos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-Rj, sob a coordenação do Dr. Emerson Guedes Pontes. Os animais foram mantidos em recipientes de plásticos 100 cm^2, com ração comercial balanceada para criação de frango de corte e serragem como cobertura para manter a umidade. Todo material foi previamente autoclavado para evitar qualquer tipo de contaminação de campo que influenciasse os resultados. Os recipientes plásticos foram cobertos com tecido (filó) e fechados com elástico para evitar a infestação de outros insetos ou outros tipos de contaminantes. Esses recipientes eram mantidos em estufa com temperatura controlada e umidade controlada com temperatura de 30°C ± 2°C e 60 % ± 10 % de umidade respectivamente.

4.2. Dietas oferecidas ao inseto *Alphitobius diaperinus*.

Para manutenção da colônia de *Alphitobius diaperinus*, os animais foram mantidos em uma ração comercial (Prefran-Guabi) utilizada na fase inicial do sistema de produção de aves de corte. Para as análises bioquímicas, além da ração comercial, foram empregadas diferentes tipos de rações, produzidas pelo Instituto de Zootecnia da UFRRJ utilizadas no setor de avicultura e oferecida como dietas para as larvas e adultos do *A. diaperinus*. As composições nutricionais das rações foram de acordo com o sistema de produção e a fase de desenvolvimento das aves. Para sistema de produção de frango de corte, as dietas eram subdivididas em Fase inicial, Fase de crescimento e Fase final; Para sistema de produção de ovos, dieta para Postura. Além disso, foi oferecida ao inseto, uma dieta a base de farinha de carne e ossos, rica em cálcio e proteína animais, geralmente empregados na composição de diferentes tipos de rações (Tabela 1) (OLIVEIRA *et al*., 2011).

4.3. Preparação de extrato bruto do trato digestivo de *Alphitobius diaperinus.*

Na determinação da atividade proteolítica foi utilizado larvas no último instar, com aproximadamente 10 mm de comprimento ou insetos adultos de *Alphitobius diaperinus*.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas referência.

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento	Final	Postura
Milho (7,59%)	56,733	54,381	68,165	64,978
Farelo de soja (47,1%)	37,551	37,956	26,439	22,478
Oleo de soja	2,315	4,253	2,455	0,445
Fosfato bicálcico	1,442	1,448	1,016	1,248
Calcário calcítico	0,884	0,879	0,760	9,795
Cloreto de sódio	0,481	0,482	0,444	0,384
DL – metionina	0,215	0,218	0,226	0,122
Suplemento mineral [1]	0,100	0,100	0,207	0,400
Suplemento vitamínico [2]	0,100	0,100	0,100	0,100
L – lisina HCl	0,078	0,070	0,100	0,010
Cloreto de colina	0,050	0,050	0,049	0,040
Salinomicina Salig 120	0,040	0,042	0,000	0,000
Colistidina – 80	0,010	0,020	0,000	0,000
Total %	100,00	100,00	100,00	100,00
Nutrientes	**Composição calculada**			
Ácido linoléico	2,531	3,535	2,743	-
Arginina Dig, aves (%)	1,447	1,452	1,120	-
Arginina total (%)	1,536	1,540	1,191	-
Cálcio (%)	0,819	0,819	0,638	4,150
Cloro (%)	0,334	0,333	0,311	0,272
Energia Met, Ap, Aves (Kcal/Kg)	3,000	3,100	3,150	2,760
Fósforo disponível (%)	0,391	0,391	0,298	0,330
Fósforo total (%)	0,647	0,645	0,523	0,532
Lisina digestível aves(%)	1,193	1,193	1,031	0,750
Lisina total (%)	1,294	1,294	1,114	0,820
Metionina + cistina total(%)	0,932	0,932	0,813	0,663
Metionina + cistina total digestível (%)	0,453	0,852	0,748	0,606
Metioninadigestível aves (%)	0,527	0,528	0,471	0,358
Metionina total (%)	0,558	0,529	0,495	0,380
Proteína bruta (%)	22,193	22,199	18,000	15,600
Sódio	0,210	0,210	0,195	0,170
Treonina Dig. Aves	0,777	0,776	0,667	-
Treonina total	0,880	0,880	0,758	0,626
Triptofano Dig. Aves	0,252	0,255	0,194	-
Triptofano total	0,280	0,281	0,216	0,189

[1]Ferro (min) 60 g/kg; cobre (min) 13 g/kg; manganês (min) 120 g/kg; zinco (min) 100 g/kg; iodo (min) 2.500 mg/kg; selênio (min) 500 mg/kg.[2] Vitamina A (min) 7.500.000 UI/kg; vitamina D3 (min) 2.500.000 UI/kg; vitamina E (min) 1.200 mg/kg; vitamina K3 (min) 1.200 mg/kg; tiamina (min) 1.500 mg/kg; riboflavina (min) 5.500 mg/kg; piridoxina (min) 2000 mg/kg; vitamina B12 (min) 12.000 mcg/kg; niacina 35g/kg; panteonato de cálcio (min) 10 g/kg; biotina (min) 67 mg/kg.

A dissecção foi realizada em solução de NaCl 0,15 M no gelo com o auxílio de pinças e um estereoscópio, de modo que todo intestino médio das larvas fosse removidos íntegro. Demais tecidos estranhos às paredes intestinais, tais como corpo gorduroso e tubos de malpighi foram descartados durante a remoção do intestino médio. Todo intestino foi acondicionado em criotubos e estocados em nitrogênio líquido até o preparo do homogeneizado. Os trato digestivos foram homogeneizados em tampão PBS (fosfato de sódio 10 mM NaCl 0,15 mM pH 7,4), utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Durante todo o procedimento os tecidos foram mantidos em banho de gelo. A proporção utilizada foi de um intestino em 20 µL tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 9.000 x *g* por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação das atividades proteolíticas, determinação de proteínas e nas análises de SDS-PAGE.

4.4. Dosagem de Proteínas.

As quantificações de proteínas foram realizadas segundo o método de LOWRY (1951), utilizando como padrão uma curva com diferentes concentrações de albumina bovina.

4.5. Determinação de atividade proteolítica no trato digestivo de *Alphitobius diaperinus* utilizando substrato azocaseína.

A atividade de proteases no trato digestivo de *A. diaperinus* foi determinada utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato, diluídos em tampão citrato – fosfato 0,1 M pH 5,6, tampão PBS 0,1 M pH 7,4 tampão Tris-HCl 0,1 M pH 9,0, todos contendo NaCl 0,15 M. O meio reacional consistiu 50 µL de substrato e 30 µL de extrato enzimático em uma concentração final de 0,4 µg/µL de proteínas, com ou sem o agente redutor DTT ou β-mercaptoetanol na concentração de 2 mM. Para os brancos, foram utilizadas somente as soluções tampões, em todas as análises. As reações foram incubadas durante 30 minutos a 37ºC. Em seguida as reações foram interrompidas com 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a paralisação das reações, as amostras foram deixadas em repouso em gelo durante quinze minutos e em seguida, foram centrifugadas 9.000 x g por 5 min a 4 ºC, para remoção da proteína desnaturada. Alíquotas de 70 µL dos sobrenadantes das centrifugações dos meios reacionais foram transferidos para placa de 96 poços, com 130 µL NaOH 1 M por poço. A atividade proteolítica foi determinada nos sobrenadantes em um leitor de placa Bio Rad Elisa Reader, com leituras de absorbância a 440 nm. (SARATH *et al.,* 1996). A

concentração do produto da reação sulfanilamida foi determinada e quantificada utilizando coeficiente de extinção molar da sulfanilamida 32 M^{-1}. cm^{-1}, e equação de Lambert-Beer (COELHO *et al*., 2006). A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (U), em que corresponde a concentração em µMol de sulfanilamida produzida por minuto. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata.

4.6. Avaliação do efeito de inibidores de proteases em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

O efeito dos inibidores na atividade proteolítica foi avaliado utilizando azocaseína como substratos, foram avaliados os efeitos dos seguintes inibidores: a) PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila (100 µM); b) TLCK - N-α-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (100 µM), inibidor irreversível de serino protease tipo tripsina (SHAW *et al*., 1965), também inibe irreversivelmente cisteíno proteases (JIA *et al*., 1995); c) aprotinina (20 µM), um inibidor de serino protease, (CASSIA *et al*., 2008); d) E-64 (10 µM), inibidor irreversível de cisteíno protease (BOLTER *et al*., 1997); e) SBTI (0,125 $\mu g.\mu L^{-1}$), inibidor de serino proteases, isolado da semente de leguminosas; f) iodoacetamida (100 µM), bloqueador de resíduos de cisteína reduzidos, (GURD, 2019); g) ácido iodoacético (100 µM), inibidor irreversível de cisteíno proteases. As análises foram realizadas em tampão citrato – fosfato 0,1 M pH 5,6, tampão PBS 0,1 M pH 7,4 e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 9,0, todos contendo NaCl 0,15 M Nos controles foram adicionados somentes os solventes sem a presença do inibidor. Todos inibidores testados foram adquiridos por Sigma Aldrich. As amostras foram previamente incubadas com cada inibidor nas respectivas concentrações mencionadas acima. A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.5.

4.7. Avaliação do efeito de imidazolonas, sobre cisteíno proteases do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus.*

Todos inibidores testados foram sintetizados e cedidos pelo professor Dr. Arthur Eugen Kümmerle, (Instituto de Química - UFRRJ). As imidazolonas sintetizadas foram selecionadas e estocadas em solução de DMSO a uma concentração de 10 mM. As imidazolonas, Ldqm 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 e 89 na concentração de 100 µM, foram pré-incubadas com 30 µl de amostra, em uma concentração final de 0,4 µg/µl de proteína, durante 30 minutos a 37ºC. Em seguida foi disparada a reação adocionando 50 µl de

azocaseína 1% como substrato, diluída em tampão citrato/fosfato 0,1 M contendo NaCl 0,15 M, pH 5,6. A hidrólise do substrato foi monitorada durante 30 minutos a 37^0C, conforme descrito no item 4.5. A atividade específica foi expressa em U (μMol de sulfanilamida formado por minuto)/ mg de proteína. No controle foi adicionado DMSO no lugar do inibidor e como controle positivo foi utilizado E-64 10 μM.

4.8. Determinação de atividade proteolítica em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* utilizando substratos fluorogênicos.

Determinação da atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, foram testados com o peptídeo fluorogênico sintético Z-Phe-Arg-MCA, (benziloxicarbonila-fenilalanila-arginina-7-amido-4-metilcumarina). As fluorescências são medidas devido à hidrólise do substrato, onde são liberadas moléculas de metilculmarina (MCA), que ao serem excitadas no comprimento de onda λ_{Ex} = 350 nm e emite uma fluorescência no comprimento de onda de λ_{Em} = 440 nm, que é detectado pelo fluorímetro Hidex Chameleon. Todos os ensaios foram realizados utilizando tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,6, contendo ditiotreitol (DTT) 2,5 mM, a 37ºC. Após a incubação do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC 30 μM, com o extrato enzimático, foram realizadas quatro leituras por minuto, e os valores determinados no fluorímetro Hidex Chameleon. A especificidade enzimática foi definida pelo inibidor especifico para cisteíno proteases E-64. Como controle a atividade proteolítca foi medida sem a adição de nenhum inibidor, conforme descrito anteriormente para cisteíno protease. O controle foi considerado como 100% de atividade. Sob as mesmas condições, foi adicionado o E-64 na concentração final de 10 μM, onde foram realizadas quatro leituras por minutos. A atividade proteolítica absoluta foi definida em U (μMol de metilculmarina formado por minuto)/ mL (LIMA *et al*., 2001).

4.9. Avaliação do efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica em trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* utilizando substratos fluorogênicos.

Os efeitos dos íons de cálcio na atividade proteolítica foi avaliado através da adição de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) no tampão citrato/fosfato 0,1 M pH 5,6 nas seguintes concentrações (0,0; 0,1; 0,5; 2,0; 10; 50; 100; 250 $mmol.L^{-1}$), contendo NaCl 0,15 M, na presença de EGTA 1 mM. Foi utilizado o programa Ca-EGTA Calculator v1.3 para determinar a concentração de íons livre na presença de quelantes. A atividade enzimática foi determinada pela fluorescência

do produto da reação, metilculmarina, foi medida utilizando comprimento de onda para excitação λ_{Ex} = 350 nm e λ_{Em} = 440 nm para emissão, detectado pelo fluorímetro Hidex Chameleon.

4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições parcialmente desnaturantes (SDS-PAGE).

O perfil proteico do trato digestivo das larvas e adultos de *A. diaperinus*, foi determinado após as amostras serem submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (12%), parcialmente desnaturante sem β-mercaptoetanol de acordo com LAEMMLI (1970), Sistema BioRad Mini Proteína I (BIO-RAD, Berkeley, Califórnia), a uma tensão de 120 V. No final da corrida, o gel foi transferido para uma solução de Triton X-100 a 2,5% (p / v) durante 20 min à temperatura ambiente para reduzir a concentração de Tris no meio. Os géis foram fixados em 100 mL de solução, contendo metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume, por no mínimo uma hora, seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada, com água milli-Q. A revelação dos géis foi feita com Comassie Brilliant Blue de acordo com o protocolo descrito na literatura (OAKLEY *et al*., 1980). Como marcadores de massa molecular foram utilizados proteínas recombinantes com as seguintes massas: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 200 kDa (Biorad ^{TM}). A massa molecular da fração proteica foi determina pelo software Image Lab Biorad^{TM}.

4.11. Zimografia reversa.

A separação das proteínas foi realizada seguinte ao item 4.10. Em seguida a atividade proteolítica foi detectada pelo método de coloração negativa. Neste método as atividades das enzimas foram detectadas pela não coloração do gel nas regiões onde tenha ocorrido a hidrólise do substrato gelatina 0,1%. Após a fixação os géis foram incubados por 2 horas a 37 ºC em diferentes tampões: citrato / fosfato pH 3,0; pH 4,5; pH 5,0; pH 5,6 e pH 6,5; Tris pH 7,4; fosfato pH 7,5; pH 8,5 e pH 10, (todos os tampões encontram-se na concentração 0,1 M). Foi adicionado NaCl 0,15 M, em todos os tampões. Na presença ou não do agente redutor DTT 2 mM . Após o fim do período de incubação o gel foi lavado com água MilliQ e corado com Coomassie Brilliant Blue (SCHLERETH *et al*., 2000). A atividade proteolítica foi determinada pela intensidade de pixels por área, utilizado software Quantity One 4.6.

4.12. Efeito do pH.

O efeito do pH foi realizado utilizando-se azocaseína como substrato, nos seguintes sistemas-tampão, na concentração de 0,1 M: Citrato-fosfato 3,0 a 7,0, fosfato 6,0 a 8,0 e Tris-HCl 8,0 a 9,0, 0,1 M. Todos os tampões continham NaCl 0,15 M. A atividade proteolítica nos respectivos valores de pH foi determinada como descrito no item 4.5, com a devida substituição do tampão correspondente a cada faixa de pH desejada. Foram utilizados inibidores específicos E-64 na concentração de 10 μM e PMSF na concentração 100 μM em meio reacional. Na ausência ou na presença do agente redutor DTT 2 mM (PEREIRA *et al*., 2005).

4.13. Efeito da temperatura.

O efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica foi determinada a 28ºC e 37°C, durante 30 minutos, azocaseína 1% como substrato, diluída em diferentes tampões; tampão citrato/fosfato 0,1 M em pH 4,5 e 5,6 contendo NaCl 0,15 M; Tris/HCl 0,1 M em pH 7,4 e 9,0 contendo NaCl 0,15 M e DTT 2mM. Todos os ensaios foram feitos utilizando uma concentração final de 0,4 μg de proteína/μL. A reação foi iniciada pela adição do substrato e a atividade determinada como descrito no ítem 4.5.

4.14. Avaliação da atividade de proteases do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em animais mantidos com as respectivas rações para frango de corte, postura, comercial e farinha de carne e ossos.

As análises bioquímicas foram realizadas após as larvas de *A. diaperinus*, serem submetidas a um jejum de 48 horas e em seguida foram alimentadas durante sete dias consecutivos em um ambiente controlado com diferentes dietas, descrito no item 4.2. Para as análises foram separadas 30 larvas (último instar) e submetidas em placa de petri com 200 g de dieta. Para todas as dietas os esaios foram realizados em triplicata. Todos os ensaios foram feitos utilizando uma concentração final de 0.4μg de proteína/μL. A reação foi iniciada pela adição do substrato e a atividade determinada como descrito no item 4.5.

4.15. Separação as bandas do gel, digestão e extração dos peptídeos.

Aproximadamente 15 µg de homogeneizado derivado de larvas de intestino médio *A. diaperinus* mantido em ração comercial, foram separados em eletroforese num gel SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com comassie blue coloidal em seguida foram recortadas e digeridas oito bandas com massa molecular na faixa de 10 a 100 kDa, pelo qual correspondem as regiões com atividade proteolítica observadas nas análises zimográficas. Para a digestão, as fatias de gel foram enxaguadas duas vezes em água e solução de água: metanol (1:1), desidratada com acetonitrila, logo após as amostra contendo as fatias do gel foram adicionadas em uma solução com agente redutor DTT 10 mM durante 30 min a 56ºC e em seguida a uma solução de iodoacetamida 55 mM durante 20 minutos a 37ºC para reduzir e alquilar as proteínas, respectivamente. As fatias foram incubadas na presença de tripsina durante a noite em 37ºC, e as misturas dos peptídeos resultantes foram analisadas por espectrometria de massa.

4.16. LC MS/MS análises.

As análises foram realizadas no aparelho Q-TOF Micro (Waters Corporation) com uma sonda de electrospray de nanofluxo, tensão capilar a 3500V e uma voltagem de cone de 30V, calibrada na região 50-2000 (m/z), usando ácido fosfórico. Utilizou-se uma interface de bloqueio com ácido fosfórico, sendo os dados de massa de bloqueio em média superiores a cinco varreduras para correção. As separações cromatográficas para LC-MS foram realizadas em uma LC Nano Acquity Ultra Performance (Waters Corporation), equipada com as colunas Symmetry C18 e BEH 130-C18 (Waters Corporation) em um gradiente linear de 0-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1%. Os dados de espectrometria de massa foram coletados em um modo de varredura completo de 50 a 1400 (m/z) em modo positivo.

O software Mascot 2.2 foi usado para a pesquisa do banco de dados com o arquivo bruto. Os espectros foram testados pela primeira vez contra o banco de dados Swissprot para a presença de contaminantes e, em seguida, pesquisou a base de dados NCBInr para insetos. Registros baixados do banco de dados Uniprot como fasta: Coleoptera: *Triboliun castaneum* e *Oryctes borbonicus*. Lepidoptera: *Bombyx mori*, Diptera*: Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* e *Rhipicephalus (Boophilus micropulus*.). EggNOG é um banco de dados de grupos ortólogos (OGs) que possuem códigos gerais de anotação funcional que são amplamente derivado da base de dados COG (POWELL *et al*., 2014). Unigenes de *D. peruvianus, T.*

molitor, M. domestica e *S. frugiperda* foram anotados e analisados usando o banco de dados eggNOG (GAZARA *et al*., 2014), o que nos permitiu conferir algum nível de informação funcional e evolutiva do banco de dados de artrópodes e atribuir códigos de função eggNOG para unigenes e testados contra os espectros formados em nossas análises espectrométricas. Para amplificar nossa pesquisa, os espectros de massa foram novamente interpretados e as sequências peptídicas obtidas foram usadas para pesquisar o mesmo banco de dados usando o programa MS BLASTp (NCBI). Para caracterizar as proteínas de acordo com os resultados da proteômica, utilizou-se ferramentas de bioinformática Blast2GO (https://www.blast2go.com/) (CONESA *et al*., 2005).

4.17. Análises Estatísticas.

Os dados obtidos foram avaliados inicialmente quanto à sua normalidade e homogeneidade das variâncias. As comparações entre os tratamentos foram realizadas através de ANOVA seguida do teste de Tukey. Caso as proposições na ANOVA não sejam alcançadas, os resultados serão comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1. Caracterização parcial das proteases no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

No sentido de dar continuidade ao estudo da atividade proteolítica no trato digestivo das larvas e adultos de *A. diaperinus*. Foi avaliado o efeito do pH sobre a atividade proteolítica através de zimografia. Para isso as proteínas do extrato intestinal de larvas de *A. diaperinus*, foram separadas através de SDS-PAGE 12% parcialmente desnaturante. No entanto a maior parte dessas proteínas apresentaram massa molecular aparente entre 10 e 100 kDa (figura 9A). Os resultados demonstraram que algumas proteínas do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, apresentaram atividades proteolítica, observados nas bandas enumeradas de 1 a 10 nos diferentes valores de pH testado, entretanto a atividade proteolítica em meio ácido foi majoritária, como visto em pH 4,5 e pH 6,5 (figura 9B). De tal modo que foi observado no gel substrato-SDS-PAGE, em que as manchas claras indicam que houve hidrólise do substrato, onde as proteínas que exibiram tais características são então proteases, e ao longo da incubação, as enzimas ativas hidrolisaram o substrato proteico, permitindo a visualização de bandas translucidas no gel, posterior a coloração com Coomassie Blue. Entretanto foi observado uma redução na intensidade e o número de áreas claras, nos pH 8,5 e 10. Confirmando características ácidas das proteases presentes no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*.

As diferenças de intensidade nas bandas podem ter ocorrido devido à presença de diferentes proteases com a mesma massa molecular. Segundo YI e colaboradores (2016), os padrões das bandas de proteínas em SDS-PAGE na fração solúvel do homogeneizado de todo intestino médio das larvas de *Tenébrio molitor*, apresenteram massa molecular abaixo de 97 kDa e bandas distribuídas em cerca de 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 19 kDa, 13 kDa e 8 kDa e foram identificadas por LC-MS/MS, dentre essas proteínas, foi identificado algumas serino proteases com aproximadamente 28 kDa e uma alfa-amilase com 50 kDa. Além disso, bandas com aproximadamente 24 kDa possívelmente poderiam ser protease tipo quimotripsina (ELPIDINA *et al*., 2005). Do mesmo modo ao que ocorre no lúmem do intestino médio das largarta do algodão, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), em que 95% das proteínas descobertas variam entre 20 kDa a 65 kDa, de tal modo que proteínas aparentes foram identificadas, como diferentes α-amilases com massa molecular de aproximadamente 55 kDa, carboxipeptidase A com 47 kDa e diferentes serino proteases com massa molecular variando entre 25 kDa a 30 kDa. Esta observação pode estar correlacionada

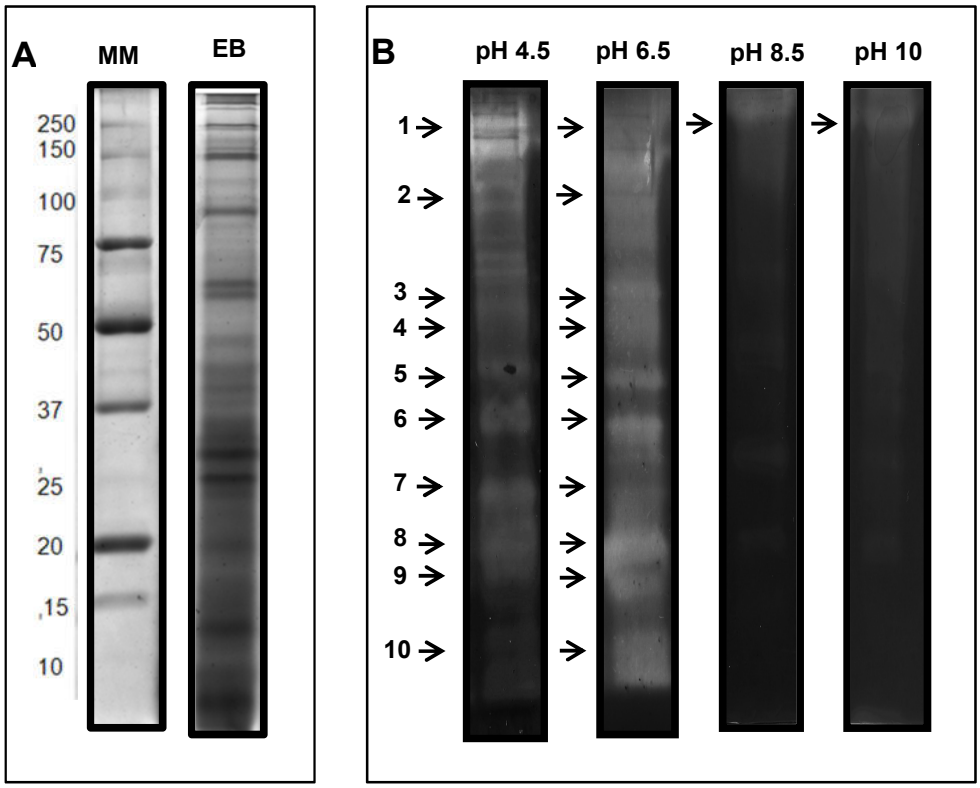


Figura 9: Atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em zimograma. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% copolimerizados com gelatina 0,1%. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 4 horas a 37ºC em tampões de citrato / fosfato pH 4,5 ou pH 6,5, fosfato pH 8,5 ou pH 10 todos 0,1M. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína / linha do trato digestivo de larvas. As larvas foram alimentadas com a dieta comercial (utilizada na manutenção da colônia). Os números à esquerda indicam massa molecular aparente das bandas ativas expressas em kDa (MM). Setas de 1 – 10 indicam a presença de atividade proteásica.

com o corte de massa molecular imposto pela matriz peritrófica, responsável pela compartimentalização dos eventos digestivos, que é obtido principalmente através da triagem das enzimas digestivas solúveis de acordo com o seu massa molecular (PAUCHET *et al*., 2007). Em *Lissorhoptrus brevirostris* (Coleoptera: Curculionidae), também foram utilizados zimogramas para detectar a atividade proteolítica no intestino médio em diferentes pHs, sugerindo que as proteases catepsina D e catepsina B, são responsáveis pela fase inicial da digestão das proteínas. Em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidea), zimogramas identificaram a presença de cisteino e serino proteases no trato do intestino médio de suas larvas, estas proteases possuem seu pH de atividade máxima distintos (TERRA *et al*., 1985). Os estudos eletroforéticos monstraram através da variação de valores de pH, que o *T. Molitor* possui proteases cuja a atividade é máxima em valores mais ácidos, incluindo as cisteíno proteases como exemplo e as serino proteases necessitam pHs mais alcalinos para aumentar sua eficiência enzimática (THIE *et al.,* 1990).

A atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato foram determinadas em uma faixa mais ampla de pH, sendo eles os seguintes: pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Nas figuras 9 e 10 foi observado que em pH ácido se concentra a maior parte da atividade enzimática. Considerando que o pH do conteúdo intestinal é um fator interno importante que influência na atividade proteolítica digestivas, tendo sido estudados em várias espécies de insetos (TERRA *et al*., 1994). Embora o pH de atividade ótima observados tenha sido na faixa ácida a atividade proteolítica máxima foi observada na faixa de pH 5,0 a 6,0, tanto na ausência como na presença do agente redutor DTT (tabela 2). Entretanto quando comparado ao controle, sem o agente redutor o perfil da atividade proteolítica diferiu na presença do agente redutor em todos os valores de pH testados (figura 10). Os dados observados estão em concordância com o descrito para as larvas dos tenebrionídea, pois exibem um intestino altamente compartimentados, em que a digestão protéicas dependa fortemente das cisteíno proteases, constituindo como a principal enzima no intestino médio anterior, devido a seu pH ácido, contribuindo para os estágios iniciais da digestão das proteínas (MARTYNOV *et al*., 2015). De acordo com REECK e colaboradores (1999), a maioria dos coleopteros apresenta intestino médio em condições ácidas uniforme, utilizando predominantemente cisteíno proteases para a digestão de proteínas. Contudo em *Cucujiformia*, o intestino médio é subdividido em intestino médio anterior, que exibe condições ácidas, onde cisteíno proteases são predominantemente ativa, e em intestino médio posterior pH mais alcalinos onde a serino proteases estão mais ativas (MICHAUD *et al*., 1995a). Em *Tenébrio molitor* a atividade proteolítica máxima das cisteíno proteases presentes no intestino médio, foram encontradas

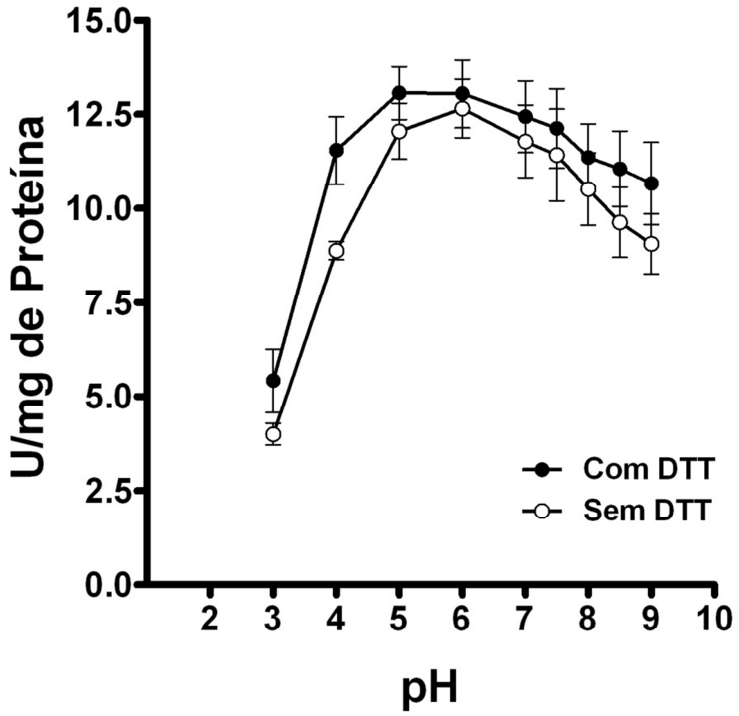


Figura 10: Curva de pH da atividade de proteases presente em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*. Foram utilizados extratos brutos do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Em 80µL de meio reacional em uma concentração de proteína de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Análise realizada em diferentes pHs, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Nos tampões citrato-fosfato 3,0 – 7,0 0,1 M, fosfato 6,0 – 8,0 0,1 M e Tris-HCl 8,0 – 9,0 0,1 M, na presença de DTT 2 mM. A sulfanilamida liberada, derivado da hidrólise da azocaseína foi quantificada colorimetricamente a 440nm. A quantificação da atividade proteolítica foi em unidade de atividade (U), em que corresponde a concentração em µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p < 0,05$), entre os valores de pH. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

Tabela 2. Determinação da atividade proteolítica em diferentes pHs do homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

Tratamentos	U/mg de Proteína								
pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Sem DTT	3,99 (±0,28)	*8,87 (±0,23)	*12,05 (±0,74)	*12,65 (±0,77)	11,78 (±0,95)	11,42 (±1,2)	10,51 (±0,95)	10,32 (±1,04)	9,05 (±0,79)
Com DTT	5,42 (±0,83)	*11,54 (±0,89)	*13,07 (±0,71)	*13,05 (±0,90)	12,43 (±0,94)	12,12 (±1,0)	11,36 (±0,87)	11,06 (±1,0)	10,66 (±1,0)

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em U/mg de proteína. Dados apresentaram normalidade entre as médias. . *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

em uma faixa de pH entre 5,0 para 7,0 (VINOKUROV *et al*., 2006a). Em muitos adultos e larvas de coleópteras exibem pH do intestino médio ligeiramente ácido e as cisteínos protease proporcionam maior parte da atividade proteolítica do intestino médio (WOLFSON *et al*., 1990).

Semelhantes aos nossos resultados, em homogeneizado de intestino médio das larvas de *Cynaeus angustus* (Coleoptera: Tenebrionidae) a atividade proteolítica foi determinada utilizando caseína como substrato, a atividade ótima foi alcançada em pH 6.0, na presença de agente redutor (OPPERT *et al*., 2006). Entretanto estudos desvendaram que coleópteras não dependem apenas de cisteíno proteases para digestão protéicas, com base nas variedades de ensaios, na presença e ausência de ativadores e inibidores específicos, utilizados em homogenatos de intestino médio (MURDOCK *et al*., 1987). Alguns coleópteras possuem atividade máxima proteolítica em pH mais alcalinos, exibindo serino proteases responsáveis pela digestão protéica (GIRARD *et al*., 1998).

5.2. Atividade proteásica no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* utilizando azocaseina como substrato: efeito do tempo e da concentração de enzima.

A atividade enzimática foi determinada utilizando azocaseína como substrato, para avaliar o comportamento da atividade proteolítica em relação ao tempo e o efeito de diferentes concentrações de proteína (extrato bruto do trato digestivo de *A. diaperinus*). Inicialmente, avaliamos a atividade proteolítica ao longo do tempo, bem como a quantidade de proteína que deve ser utilizada em nossos ensaios. As proteases apresentaram atividade enzimática linear até 60 minutos.

Quando a quantidade de proteína foi variada, foi observado que a atividade se manteve até 0,8 µg de proteína/µL do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Os resultados observados foram avaliados em duas condições distintas de tratamentos, na presença do agente redutor ditiotreitol (DTT) 2 mM e como controle sem o agente redutor (figura 11). Foi observado que nas concentrações utilizadas nesse estudo (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 µg ptn/µL) a atividade proteolítica aumentou linearmente nas duas condições estabelecidas. Observa-se que com o uso de DTT a atividade proteolítica foi maior, quando comparado ao controle. Na concentração de 0,4 µg ptn/µL, por exemplo, houve um aumento de cerca de 1,5 vezes da atividade proteolítica na presença do DTT, quando comparado ao controle. Na presença do agente redutor DTT foi observado um aumento considerável de 71,5%, 95,6%, 74,7% e 95,8% na atividade proteolítica nas respectivas concentrações de proteínas utilizadas 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 µg de proteína/µl, quando comparado aos ensaios na ausência de DTT (Tabela 2).

Em muitos insetos, a presença de proteínas solúveis no aparelho digestório, consiste em potentes estimulantes para síntese e secreção de proteases digestivas (BLAKEMORE *et al*., 1995). A síntese e secreção dessas enzimas são realizadas por dois tipos de células: As células secretoras constitutivas, presentes no intestino médio, em que não acumulam produtos secretores, sendo as enzimas sintetizadas e liberadas imediatamente após sua síntese e as células secretoras reguladas, onde acumulam secreção de material que é rapidamente liberado em resposta a um sinal apropriado. Sendo a secreção constitutiva como regra na maioria dos insetos, com a secreção regulada sendo relatada em poucos dias (BLAKEMORE *et al*., 1995).

A digestão é geralmente organizada em uma linha de produção, com armazenamento, digestão e absorção de alimentos ocorrendo em diferentes posições ao longo do intestino. O epitélio intestinal em digestores contínuos é morfologicamente, assim como funcionalmente, diferenciado ao longo de seu comprimento. Durante o ciclo digestivo, há mudanças consideráveis nos níveis de enzimas digestivas do intestino médio, particularmente nos digestores descontínuos. Isto sugere fortemente que a síntese e secreção de enzimas digestivas são reguladas durante o ciclo digestivo (BRIEGEL e LEA, 1975).

O ditiotreitol (DTT) e o β-mercaptoetanol são os agentes redutores utilizados como ativadores enzimáticos, no caso do DTT, a reação são intramolecular e envolve a formação de dois produtos de um único reagente, assim sendo convertida em um dissulfeto cíclico extremamente estável (BURMEISTER *et al.*, 1990). Estudos mostram que a redução do dissulfeto pelo DTT apresenta uma constante de equilíbrio mais elevada, quando comparada a uma constante de equilíbrio próxima a do monotiol, tais como o β-mercaptoetanol (BURMEISTER *et al.*, 1990). Nas análises, além do ganho observado na presença do DTT, também foi observado uma ganho de atividade na presença do β-mercaptoetanol em uma concentração de 2 mM. O DTT é utilizado como agente redutor, reduzindo grupos de sulfetos, pelo qual suas propriedades químicas são relevantes no estudo de atividades enzimáticas. Esses agentes redutores são obrigatoriamente utilizados para determinar a atividade enzimática de cisteíno proteases, para garantir que a cisteína da tríade catalítica esteja na forma reduzida, impedindo formar pontes de dissulfetos. Muitas espécies de coleopteras, cisteíno proteases do tipo catepsinas são utilizadas para digerir sua dieta no lúmen do intestino médio (TERRA, 1990). Essas catepsinas são sintetizadas como pré-pró-enzimas e secretadas no lúmen pelas células epiteliais do intestino, pertencendo à família da papaína de proteínas que incluem proteínas lisossômicas (CRISTOFOLETTI *et al*., 2005) que estão envolvidas no catabolismo proteico celular (STACHOWIAK *et al*., 2004).

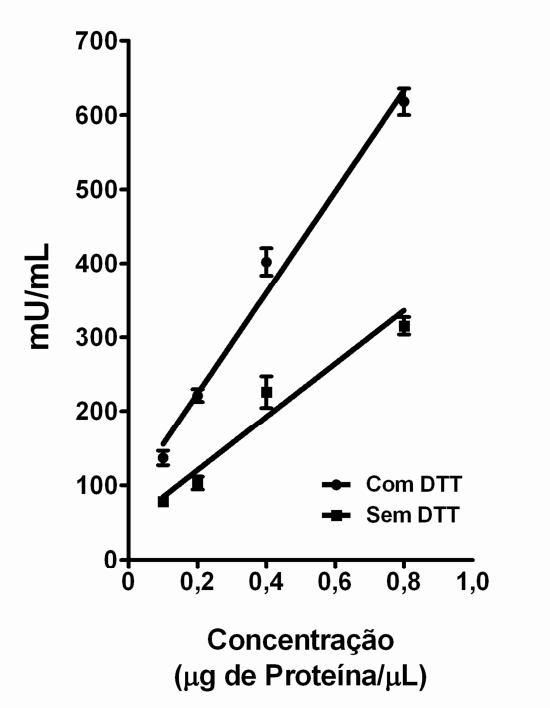


Figura 11: Determinação da atividade proteolítica total em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes concentrações de proteínas. Diferentes níveis de atividade proteolítica no trato digestivo das larvas *A. diaperinus*. Nas concentrações 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 μg de proteína/μL em meio reacional. Diluídos em tampão citraro/fosfato 0,1 M pH 5,6, na ausência e na presença de DTT 2 mM, utilizando azocaseína 1% como substrato. As sulfanilamidas liberada derivado da azocaseína foram quantificadas colorimetricamente a 440nm. A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (mU), em que corresponde a concentração em μMol de sulfanilamida produzida por minuto/mL. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p < 0,05$), entre as concentrações com e sem DTT. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

Tabela 3. Determinação da atividade proteolítica em diferentes concentrações de proteínas do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

.

Tratamentos	Atividade Relativa mU/mL		Atividade proteolítica em %
Concentração Proteína	Azocaseína	Azocaseína+DTT	Ganho de atividade Enzimática
0,1µg/µl	78,2 (±2,44)	*136,7 (±9,79)	*71,5
0,2µg/µ	110,7 (±9,97)	*216,5 (±8,54)	*95,6
0,4µg/µl	225,8 (±21,5)	*394,5(±17,6)	*74,7
0,8µg/µl	315,2 (±11,8)	*617,9 (±17,9)	*95,8

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em mU/ mL e aumento da atividade relativa em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

Em coleopteras como *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Chrysomelidae), conhecido popularmente como praga do feijão-caupi e a lagarta da raiz do milho *Diabrotica virgifera* (Coleóptera: Chrysomelidae), as cisteíno proteases são as principais enzimas responsáveis pelo processo digestivo (KOIWA *et al*., 2000). Deste modo a ativação proteolítica causada pelo DTT nas condições experimentais estabelecidas sugere que a atividade de cisteíno proteases é prevalente (VINOKUROV *et al*., 2006a). Entretanto, em alguns insetos da ordem coleóptera foram identificadas a presença de serino proteases do tipo tripsina, sendo extensivamente caracterizada (YAN *et al*., 1999). Em análises do extrato de intestino médio de larvas de *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae), também mostraram serino proteases do tipo elastase, majoritárias e protease semelhantes à quimotripsina e tripsina (BOZIC *et al*., 2008).

A atividade proteolítica foi avaliada em diferentes intervalos de tempo de 5, 15, 30 e 60 minutos (figura 12). Os resultados assinalaram maior eficiência na atividade proteolitica, na presença dos agentes redutores DTT e β-mercaptoetanol, um ganho médio de 34,6% e 38,5% respectivamente, quando comparado ao controle. Entre a primeira e ultima leitura a atividade proteolítica aumentou em até 2 vezes em todos os tratamentos (Tabela 4). Esses resultados sugerem a presença de grupos tióis, no qual fazem parte de resíduos de aminoácidos específicos presentes em algumas proteases, em que entre outras propriedades estes agentes redutores contêm grupos sulfidrila dos quais sofrem oxidação no lugar dos grupos tióis. Assim esses reagentes protegem os grupos tióis da cisteína, que pertencem à tríade catalítica de proteases do tipo cisteíno, prevenindo sua oxidação (NELSON *et al*., 2011). Resultado semelhante foi observado na atividade proteolítica no intestino médio de larvas *Oulema melanopus* (Coleoptera: Chrysomelidae), em que ao adicionar o β-mercaptoetanol de concentração de 2 mM, houve um aumento na atividade proteolítica em 64% quando comparado ao controle, em pH ácido, indicando a presença de cisteíno proteases (WIELKOPOLAN *et, al*., 2015). Atividades proteolíticas em intestinos larvais de *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), foram caracterizadas e uma das propriedades observadas mais relevantes foi o aumento da atividade proteolítica das cisteíno proteases na presença de compostos tiol (STOREY e WAGNER, 1986), A adição de tiol ativadores ditiotreitol (DTT), β-mercaptoetanol nas concentrações 1 mM ou 5 mM, aumentou a atividade proteolítica de duas a três vezes em pH 5, utilizando azocaseína como substrato (WILHITE *et al*., 2000). Em larvas *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae), a adição de Ditiotreitol em uma concentração de 2,5 mM resultou em uma importante ativação na atividade proteolítica em pH 5,0 resultado semelhante foi observado utilizando β-mercaptoetanol em 5 mM

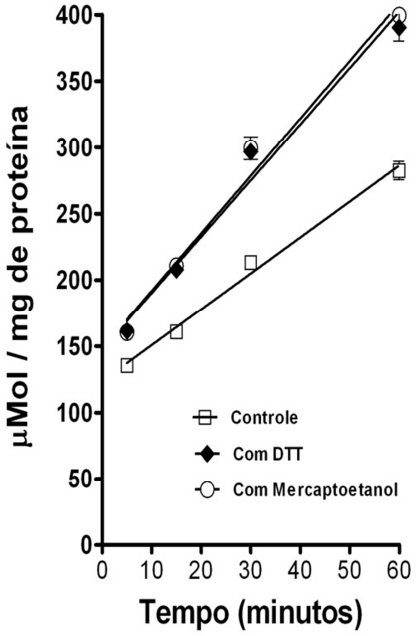


Figura 12: Curva temporal da atividade proteolítica presente em homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* na presença de agentes redutores. Foi utilizado extrato bruto do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Em 80µL de meio reacional em uma concentração de proteína de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Diluídos em tampão citraro/fosfato pH 5,6 0,1 M, na ausência e na presença de DTT ou β-mercaptoetanol 2 mM . O meio reacional foi incubado a 37ºC por 5, 15, 30 e 60 minutos. A sulfanilamida liberada, derivado da azocaseína foi quantificada colorimetricamente a 440nm. A atividade proteolítica foi quantificada em µMol de sulfanilamida produzida por /mg de proteína. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p < 0,05$), entre as concentrações com e sem DTT ou β-Mercaptoetanol. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

Tabela 4. Atividade proteolítica presente em homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em relação ao tempo na presença de agentes redutores.

Tratamentos	Atividade Proteolítica µMol/mg de Proteína			Ganho em Atividade Enzimática em %	
Tempo (minutos)	Controle Sem redutor	DTT	β-mercaptoetanol	DTT	β-mercaptoetanol
5	135,5 (±1,52)	*161,6 (±5,57)	*160,5 (±8,30)	*19,2 (±1,32)	*18,4 (±1,21)
15	154,4 (±3,08)	*207,7 (±4,30)	*197,2 (±7,36)	*34,6 (±2,79)	*32,1 (±2,86)
30	217,9 (±2,44)	*296,0 (±2,10)	*299,4 (±5,55)	*35,8 (±2,10)	*37,4 (±5,55)
60	273,1 (±4,42)	*367,6 (±8,45)	*399,4 (±5,66)	*34,6 (±8,45)	*46,3 (±5,66)

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em µMol de sulfanilamida produzida por /mg de proteína e atividade enzimática em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

(CHARLES *et al*., 1995). Em larvas de *Tenébrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), a presença de um ambiente redutor acarretado pela presença de DTT 2,5 mM ou β-mercaptoetanol 5 mM, foram responsáveis pelo aumento da atividade proteolítica de cisteíno proteases. A utilização dos agentes redutores DTT e β- mercaptoetanol foram responsáveis pelo aumento da atividade proteolítica de tripsinas presentes no intestino médio de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), contra o substrato BAPNA, mesmo na presença do inibidor de tripsina. Isso pode ser explicado pelo fato de que a estrutura tridimensional do inibidor é estabilizada por ligações de dissulfeto que se reduzem na presença de agentes redutores, diminuindo significativamente a atividade do inibidor de tripsina após incubação (SHARMA *et al*., 2012). Segundo THIE e colaboradores (1990) o DTT e β- mercaptoetanol foram capazes de inibir a atividade proteolítica de tripsina.

5.3. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica na fração luminal e epitélio intestinal de larvas de *A. diaperinus*.

Foram realizadas análises para avaliar o efeito do pH na atividade proteolítica do homogeneizado do intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes intervalos de tempo, a 37ºC, utilizando azocaseina 1% como substrato na presença DTT 2 mM. A atividade proteolitica foi determinada conforme descrito no item 4.5. O perfil da atividade proteolítica diferiu entre os valores de pH em todos os tempos avaliados, apresentando um pH ótimo de 5,6. A atividade proteolítica foi aumentada em até duas vezes quando comparado às análises em pH 9,0 e em 50 % quando comparado à atividade proteolítica em pH 7,4 (Figura 13). Os dados observados estão em concordância com o descrito para espécies que tem intestino médio ácido, e utiliza proteases tipo cisteíno e proteases aspárticas, como principais proteases digestivas, e que apresenta atividade proteolítica ótima na faixa entre pH 4,0 e 6,0 (WIEMAN e NIELSEN, 1988). Como o homogeneizado do intestino médio das larvas de *A. diaperinus*, nos pH 5,6, 7,4 e 9,0, apresentou atividade proteolítica, estes resultados sugerem a presença de diferentes proteases. TERRA e colaboradores (1985) observaram resultados semelhantes em diferentes pHs, onde foram detectadas serino proteases do tipo tripsina, quimotripsina e cisteíno proteases em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleóptera; Tenebrionidae).

Nesses animais, os autores observaram que o pH determinante para atividade máxima de suas proteases parece moldar-se pela presença majoritária da cisteíno proteases no intestino médio anterior levemente mais ácido, enquanto as serino proteases desenvolveram atividade

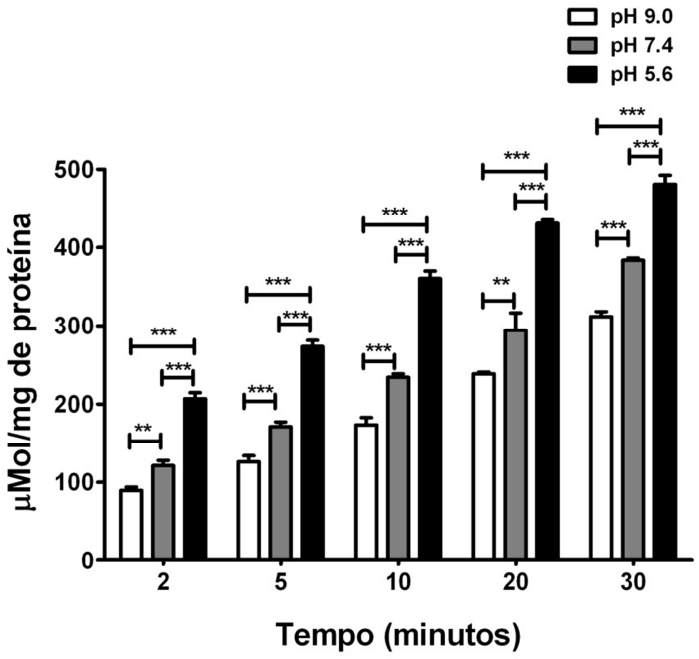


Figura 13: Curso temporal da atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes valores de pH. Foram utilizados extratos brutos do intestino médio das larvas *A. diaperinus*. Em 80µL de meio reacional a concentração de proteína foi de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Diluídos em tampões citrato/fosfato pH 5,6, PBS pH 7,4, Tris-HCl pH 9,0, todos 0,1 M. O meio reacional foi incubado a 37ºC e medidas nos diferentes intervalos de tempo: 2, 5, 10, 20 e 30 minutos. A sulfanilamida liberada, derivado da azocaseína foi quantificada colorimetricamente a 440nm. A atividade proteolítica foi quantificada em µMol de sulfanilamida produzida por /mg de proteína. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p< 0,01$**), ($p<0,001$***), entre os valores de pH e tempos. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

proteolítica na porção posterior do intestino médio, mais alcalino. Além disso, sabe-se na literatura, que as cisteíno proteases são sintetizadas como zimogênios inativos que podem ser ativados quando incubados em pHs ácidos (COLLINS *et al*., 2004). Cisteino proteases de coleopteras, no entanto, normalmente apresenta valores de pH de atividade ótima mais baixos, correspondendo ao baixo pH do lúmen intestinal destes insetos (CRISTOFOLETTI *et al*., 2005). Em *Aegorhinus superciliosus* (Coleóptera: Curculionidae), a atividade proteolítica demostrou a presença de serino proteases do tipo tripsina e quimotripsina, como principais proteases digestivas. Entretanto, foi observado três picos de atividade proteolíticas distintos em pH 5,0, 8,0 e 10,0 utilizando azocaseína como substrato, em que a atividade máxima foi em pH 8,0 (MEDEL *et al*., 2015). Este pH para hidrólise máxima indicam a presença de tripsina e quimotripsina, além disso, a faixa de pH ótimo de 7,0 para 10 foram reportadas para tripsinas de muitos insetos de diferentes ordens (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2009), desde então as cisteino proteases são mais frequentes em pH mais ácidos (REECK *et al*., 1999). As larvas de *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formiccidea), demostraram uma grande diversidade de enzimas, com diferentes níveis de atividade, visto que a porção anterior do intestino médio, o pH variou de neutro para ácido, em uma faixa de pH 6,8 para 3,0 e a porção posterior variou de ácido para alcalino de 5,2 para 7,6, estas características sugere que o pH das diferentes regiões no intestino médio otimiza a atividade proteolítica de diferentes proteases (ERTHAL *et al.,* 2007). Em larvas *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) o pH na porção anterior do intestino médio é de 5,9 e a porção posterior apresentou um pH mais alcalino de 7,9, as proteases foram localizadas nas regiões de pH ótimo para atividade proteolítica, sugerindo a presença de compartimentalização das atividades enzimáticas presentes em larvas de *T. castaneum* (OPPERT *et al*., 2005).

Determinar a atividade proteolítica em diferentes temperaturas tem como objetivo avaliar a temperatura ótima dos diferentes tipos de enzimas na qual a velocidade de reação é máxima. Para as análises os intestinos foram fracionados em fração luminal e epitélio intestinal, obtido após a remorção do intestino médio inteiro, seguido pela separação do conteúdo do luminal do tecido epitelial de larvas de *A. diaperinus*. Esse material foi homogeneizado separadamente em tampão PBS (fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 mM pH 7,4) com DTT 2 mM. A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.5. A atividade proteolítica foi determinada nas temperaturas de 37 ºC e 28 ºC nos pHs 4,5, 5,6, 7,4 e 9,0 (figuras 14A e 14B). No entanto, temperaturas mais elevadas não foram testadas, pois a maioria dos estudos que relacionam a temperatura e os estágios de desenvolvimento das larvas e adulto de *A. diaperinus* leva em consideração o intervalo entre 20 ºC e 38 ºC

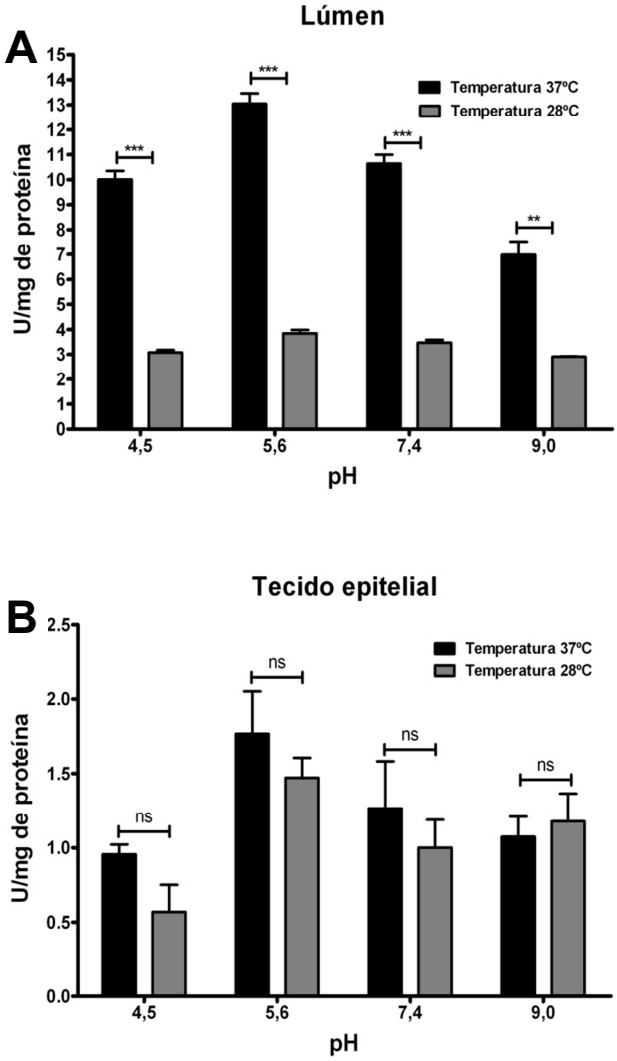


Figura 14: Efeito da temperatura na atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs. Atividade proteolítica medida ao incubar amostras contendo lúmen ou tecido epitelial das larvas *A. diaperinus* nas temperaturas 37 ºC e 28 ºC. Em 80 µL de meio reacional a concentração de proteína foi de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Diluídos em tampões citrato/fosfato pH 4,5 e 5,6, PBS pH 7,4, Tris-HCl pH 9,0 todos 0,1 M. A sulfanilamida liberada, derivado da azocaseína foi quantificada colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (U), em que corresponde a concentração em µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p< 0,01$**), ($p<0,001$***) e (ns) não significativo. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

(RUEDA *et al*., 1996), uma vez que temperaturas muito elevadas são impraticáveis nas condições em que vivem.

Os resultados confirmam que o pH ótimo para essa atividade está na faixa de pH 5,6. Em todos os valores de pH testados a temperatura de 28 ºC apresentou uma atividade bem menor a de 37 ºC. Além do pH, foi aferida a atividade proteolítica em diferentes porções do intestino médio para avaliar a distribuição das enzimas de digestão inicial e final. Após as análises foi observado a presença da atividade proteolítica nos extratos enzimáticos do conteúdo luminal e do epitélio instestinal em todos os pH testados e nas temperaturas de 37 ºC e 28 ºC. Visto que, os resultados demonstraram que a atividade proteásica, concentrou-se na fração do lúmen. As proteases de maneira geral estão subdivididas em subclasses, com base no seu mecanismo catalitico, como vem sendo demonstrado através da utilização de reagentes especificos ou efeito do pH (PARDE, 2019), de tal modo que os resultados demonstraram que ambas as amostras apresentaram diferentes picos de atividade proteolítica em todos os pHs analisados, sugerindo a presença de diferentes tipos de proteases (Tabela 5).

Na figura 14A foi observado o pico máximo de atividade proteolitica no conteúdo luminal em pH 5,6 em uma temperatura de 37ºC, exibindo uma atividade especifica de 13,5 U/mg de proteína, cerca de 80% mais elevada, quando comparada à atividade específica observada no homogeneizado do epitélio intestinal, que apresentou uma atividade de 1,7 U/mg de proteína nas mesmas condições experimentais. Visto que a maioria das proteases digestivas é secretada para o conteúdo luminal e a atividade proteolitica gerada no homogeneizado do tecido epitelial do intestino médio de *A. diaperinus* foi muito menor quando comparado ao conteúdo luminal. Não foi detectada atividade proteolítica residual nas análises realizadas nos extratos brutos das diferentes dietas utilizadas nos experimentos (Dados não mostrados). Proveniente aos componentes majoritários das dietas como carboidratos e proteínas seja de origem vegeta. Grandes números de proteases estão presentes em diferentes espécies de vegetais, e em diferentes partes, como em folhas, flores e frutos de várias espécies vegetais (SHEWRY *et al*., 1999). Os ensaios no tecido epitelial nas larvas de *A. diaperinus* foram importantes, pois algumas das enzimas presentes no lúmen do intestino médio são produzidas e secretadas por estes tecidos, por outro lado algumas das enzimas presentes no conteúdo luminal, contudo ausente na fração epitelial, indicando que essas enzimas podem ser oriundas de outras fontes (ERTHAL *et al*., 2007). O epitélio intestinal é constituído de diferentes tipos de células, entre elas se encontram as células colunares, que podem assumir diferentes formas e podem estar envolvidas na secreção das enzimas digestivas, de modo que essas enzimas são compartimentalizada pela membrana peritrófica

Tabela 5. Efeito da temperatura na atividade proteolítica, presente na fração luminal e na fração epitelial do intestino médio de larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs

Tratamentos	Atividade U/mg de Proteína				Atividade Proteolítica em %			
pH	4,5	5,6	7,4	9,0	4,5	5,6	7,4	9,0
Temperaturas	37ºC				37ºC			
Lúmen	10,0(±0,3)	13,5(±0,4)	10,7(±0,4)	6,98(±0,5)	76,7(±2,7)	100(±3,1)	81,6(±2,7)	53,5(±4,1)
Tecido epitelial	*0,87(±0,0)	*1,70(±0,1)	*1,32(±0,2)	*0,73(±0,2)	6,70(±0,5)	13,0(±1,4)	10,1(±1,6)	5,63(±1,7)
Temperaturas	28ºC				28ºC			
Lúmen	*3,08(±0,0)	*3,84(±0,1)	*3,47(±0,1)	*2,90(±0,0)	23,6(±0,6)	29,5(±1,0)	26,6(±0,8)	22,3(±0,1)
Tecido epitelial	*0,57(±0,1)	*1,47(±0,1)	*1,03(±0,1)	*1,17(±0,2)	4,36(±1,3)	11,3(±1,0)	7,66(±1,4)	9,02(±1,4)

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em µMol de sulfanilamida produzida por /mg de proteína e atividade proteolítica em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

e posteriormente permeiam diretamente para o conteúdo luminal (CHAPMAN *et al.,* 1985).

Na figura 14A e 14B demonstrou o efeito na redução da temperatura reacional para 28ºC, sobre a atividade proteolítica nos homogeneizado do conteúdo luminal e do tecido epitelial, nos mesmos pHs utilizados anteriormente para temperatura de 37 ºC, de tal modo que foi observada uma redução significativa na atividade proteolitica em todos os pHs testados, tanto para o homogeneizado do conteúdo luminal, quanto para homogeneizado do tecido epitelial. No entanto o pico de maior atividade proteolitica em 28 ºC, também ocorreu em pH 5,6, no homogeneizado do conteúdo luminal foi de 3,84 U/mg de proteína, seguindo o perfil da atividade proteolitica quando as análises foram realizadas a 37 ºC, entretanto houve uma redução em cerca de 70% na atividade proteolitca no homogeneizado do conteúdo luminal quando a temperatura de reação passou de 37ºC para 28ºC. Comportamento semelhante foi observado em enzimas digestivas das larvas de *Sphenophorus Levis* (Coleoptera: Curculionidae), bicudo da cana-de-açucar), em que foi caracterizada uma catepsina-L, responsável pela proteólise digestiva no intestino médio de suas larvas, em que a catepsina-L exibiu uma atividade proteolítica ótima em 37ºC, no entanto em testes realizados para avaliar a estabilidade térmica deste subtipo de cisteíno protease, a atividade proteolítica sofreu perda significativa, quando a temperatura de incubação foi reduzida para 20ºC (FONSECA *et al*., 2012). Como visto nas análises do homogeneizado do tecido epitelial das larvas de *A. Diaperinus*, a atividade proteolitica foi menos eficiente nas temperaturas e em todos os pHs testados, quando comparados aos resultados obtidos com o homogeneizado do conteúdo luminal (figuras 14A e 14B). Para melhor entender os mecanismo dos mais diversos tipos de proteases em diferentes espécies de insetos BOZIC e colaboradores, (2003), detectaram e caracterizou a presença de leucil-aminopeptidase no intestino médio das larvas *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae), em que foi avaliado o efeito da temperatura na atividade proteolítica desta protease. Foi medida em uma faixa entre 2ºC a 70ºC, monitorando a hidrólise do substrato L-leucina-p-nitroanilida (LpNA). A leucil-aminopeptidase teve atividade máxima em 40ºC e 25% da atividade máxima a 60 ºC. A enzima foi completamente desnaturada a 70°C. Por outro lado, a atividade a 10ºC concebeu apenas 20% da atividade máxima. Como a maioria das reações enzimáticas, a taxa de liberação de corante ¨azo¨ do substrato azocaseína por proteases de *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Crambidae), aumenta à medida que a temperatura é elevada. No caso destas enzimas, como em outras enzimas, as atividades são prejudicadas em temperaturas acima de 50°C.

5.4. Efeito de inibidores específicos e ativador enzimático na atividade proteolítica tota, no homogeneizado do trato digestivo de larvas de *A. diaperinus*.

Foi avaliado o comportamento enzimático das diferentes proteases presentes no homogeneizado do trato digestivo das larvas do *A. diaperinus*, na presença dos inibidores específicos de cisteíno proteases E-64 e serino proteases PMSF, em diferentes pHs (figura 15). A atividade proteolítica na presença dos inibidores específicos foram determinadas em uma faixa mais ampla de pH, sendo eles os seguintes: pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, utilizando azocaseína como substrato. Quando comparado ao controle o perfil da atividade proteolítica nos diferentes valores de pH, diferiu na presença dos inibidores PMSF e E-64 específicos de serino proteases e cisteíno proteases. Embora o pH de atividade ótima observados para os três experimentos tenha sido na faixa ácida a atividade proteolítica máxima foi observada na faixa de pH 5,0 a 6,0, para o controle e na presença do PMSF, entretanto na presença do E-64 a atividade a partir do pH 5,0 permaneceu linear, variando muito pouco (figura 15 e tabela 6).

Para determinarmos precisamente qual classe de enzima foi responsável por cada pico de atividade enzimática, foram utilizados inibidores específicos, E-64 e PMSF. Quando adicionado o inibidor E-64 a uma concentração 10 μM, foi observado uma redução na hidrólise do substrato azocaseína sobre condições ácidas em 55%, em toda faixa de pH analisada. Na presença de PMSF a 100 μM, a redução ocorreu na faixa de pH alcalino, entre 7,0 e 9,0. Entretanto não foi observada inibição pronunciada quando comparadas as análises realizadas com E-64. A ingestão crônica de inibidores de proteases pelos insetos leva a redução da digestão proteolítica, interferindo consequentemente a disponibilidade de aminoácidos essenciais, necessários para crescimento, desenvolvimento e reprodução (ZHU-SALZMAN *et al*., 2003). A determinação da atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* foi testada na presença de inibidores, conforme a metodologia descrita no item 4.5 e 4.6. Devido à alta tendência de oxidação do grupo tiol, comumente se fez necessário à presença de agente redutor DTT na concentração 2 mM, em meio reacional para catálise das cisteíno proteases, que foi inibida por ácido iodo acético, E-64, Iodoacetamida, entre outros inibidores (SUMANTHA *et al*., 2006).

A atividade proteolítica foi sensível a inibição por PMSF, um inibidor clássico de serino proteases, em pH mais alcalinos 7,4 e 9,0, (BARRETT, 2001), igualmente ocorrido com os inibidores da família kunitz, SBTI (SONG *et al*., 1998) e aprotinina (LASKOWISKI *et al*., 1980), que apresentaram inibição na atividade proteolítica em pH 5,6 e 9,0 para SBTI e pH 5,6, 7,4 e 9,0 para aprotinina (figuras 16 17 e 18).

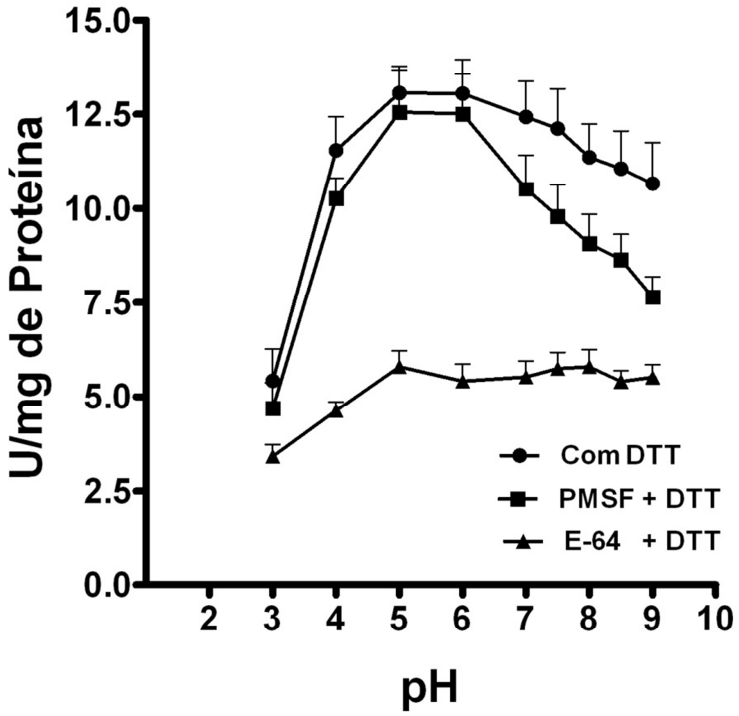


Figura 15: Efeito dos inibidores E-64 e PMSF sobre a atividade proteolítica do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pHs. Foram utilizados extratos brutos do trato digestivo das larvas *A. diaperinus*. As análises foram realizads em 80µL de meio reacional em uma concentração de proteína de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. A atividade proteolítica foi determinada nos pHs, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Diluídos nos tampões citrato-fosfato 3,0 – 7,0 0,1 M, fosfato 6,0 – 8,0 0,1 M e Tris-HCl 8,0 – 9,0 0,1 M, na presença de DTT 2 mM. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (U), em que corresponde a concentração em µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p < 0,05$. As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

Tabela 6. Determinação da atividade proteolítica em diferentes pHs do homogeneizado trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

Tratamentos	U/mg de Proteína								
pHs	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
C/DTT	5,42 (±0,83)	11,54 (±0,89)	13,07 (±0,71)	13,05 (±0,90)	12,43 (±0,94)	12,12 (±1,0)	11,36 (±0,87)	11,06 (±1,0)	10,66 (±1,0)
E-64	3,41 (±0,31)	*4,62 (±0,23)	*5,79 (±0,42)	*5,41 (±0,45)	*5,52 (±0,42)	*5,74 (±0,43)	*5,79 (±0,45)	*5,40 (±0,28)	*5,51 (±0,33)
PMSF	4,69 (±0,67)	*10,27 (±0,53)	12,56 (±1,12)	12,51 (±1,05)	*10,52 (±0,89)	*9,79 (±0,84)	*9,06 (±0,77)	*8,64 (±0,66)	*7,64 (±0.54)

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

Além disso, foi observado uma redução da atividade proteolítica contra inibidor TLCK, um inibidor sintético de serino proteases e cisteíno proteases (SHAW *et al*., 1965) em pH 5,6, 7,4 e 9,0 respectivamente (figuras 16, 17 e 18). O inibidor E-64 é amplamente utilizado como padrão para identificação de cisteíno proteases (SREEDHARAN *et al*., 1996). Nas análises realizadas no homogeneizado do intestino médio das larvas de *A. diaperinus*, foi observado uma forte inibição da atividade proteolítica nos diferentes valores de pH 5,6, 7,4 e 9,0. Acompanhando o mesmo potencial inibitório do E-64, inibidores específicos de cisteíno proteases, os derivados iodados da Iodoacetamida e ácido iodoacético, inibiram a atividade proteolítica em todos os valores de pH testados, quando foi avaliado contra o homogeneizado do trato digestivo das larvas *A.diaperinus* (figuras 16, 17 e 18), e esses derivados são frequentemente utilizados como reagentes alquilantes sulfídrilico, que reagem com grupos SH, nos processos catalíticos das enzimas, predominantemente cisteíno proteases (ALBRECHT *et al*., 1993).

Os fluoretos de sulfonila inibem a maioria das serino proteases, tais como quimotripsina (FAHRNEY *et al*., 1963), tripsina (BAKER *et al*., 1968), elastase (LIVELY *et al*., 1978), esses compostos reagem com a hidroxila dos resíduos de serina presente no sítio ativo dessas enzimas, como quimotripsina, e formam um derivado sulfonilíco estável (GOLD *et al*., 1964). Nossos resultados demostraram que o inibidor de serino proteases PMSF na concentração 100 μM, foi menos eficientes em pH 5,6 inibiu 5,98 % a atividade proteolítica, em azocaseína como substrato, quando comparado à inibição nos pH 7,4 e 9,0 que inibiram 16,9 % e 31,3 % respectivamente (figuras 16, 17 e 18). Resultados semelhantes foram observados em larvas de *Morimus funereus* (Coleoptera: Curculionidae), foi observada uma redução de 30 % na atividade proteolítica, na adição de PMSF na concentração de 10 mM, em pH 9,0, afirmando que as serino proteases do tipo tripsina são a principal protease do intestino médio anterior das larvas de *M. funereus* (LONCAR *et al*., 2010). Em estudos realizados em larvas de *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidóptera: Pyralidae), foram observados diferentes níveis de inibição da atividade proteolítica por PMSF, adicionado à amostra, nas concentrações 1,0, 3,0 e 5,0 mM, inibindo 37 %, 63 % e 88 % respectivamente, em pH 9,0 revelando uma diminuição significativa da atividade proteolítica no homogeneizado do intestino médio das larvas desses insetos, confirmando a participação de proteases tipo tripsina na digestão das proteínas (RANJBAR *et al*., 2014). Em larvas de *Tenebrio molito*r (Coleoptera: Tenebrionidae), a atividade proteolítica foi determinada pela contribuição das diferentes classes de proteases presentes no intestino médio anterior, levemente ácido e intestino médio posterior mais alcalino, essas características foram essenciais nos resultados obtidos,

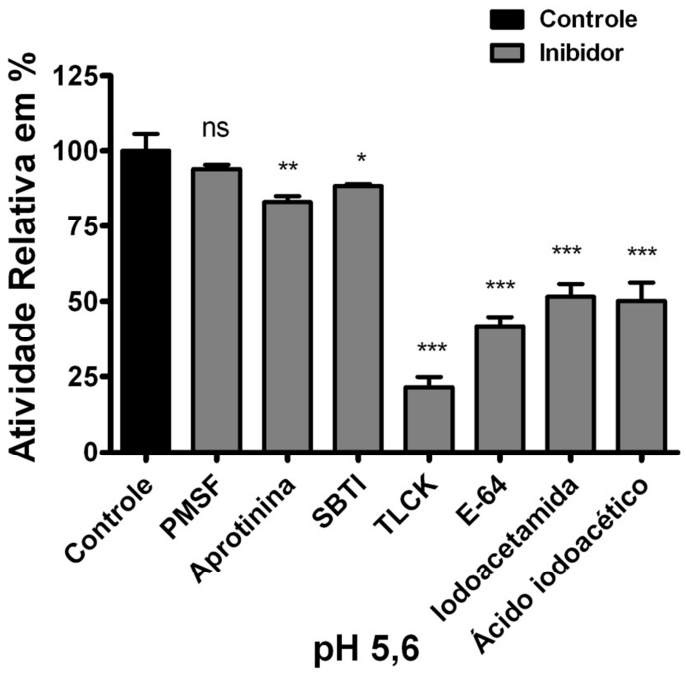


Figura 16: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 5,6. Foram utilizados homogeneizados do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Em 80µL de meio reacional a concentração de proteína foi de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Na presença ou ausência de inibidores. Diluídos em tampão citraro/fosfato pH 5,6 0,1 M. 0,15 M NaCl. O meio reacional foi incubado a 37ºC, por 30 minutos. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi definida em (%). Testes estatísticos Anova e Tunkey (P<0,05*), (p< 0,01**), (p<0,001***) e (ns) não significativo. As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

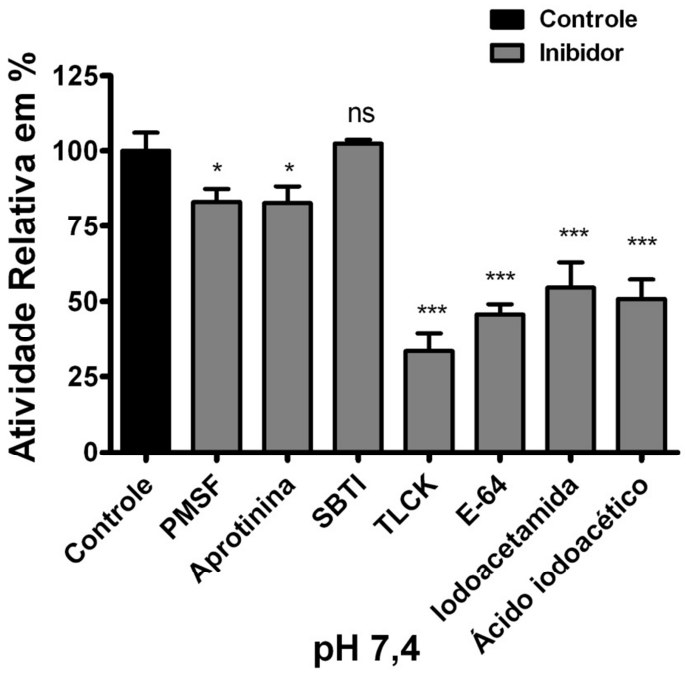


Figura 17: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 7,4. Foram utilizados homogeneizados do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Em 80µL de meio reacional a concentração de proteína foi de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Na presença ou ausência de inibidores. Diluídos em tampão PBS pH 7,4 0,1 M. 0,15 M NaCl. O meio reacional foi incubado a 37ºC, por 30 minutos. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi definida em (%). Testes estatísticos Anova e Tunkey (P<0,05*), (p< 0,01**), (p<0,001***) e (ns) não significativo. As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

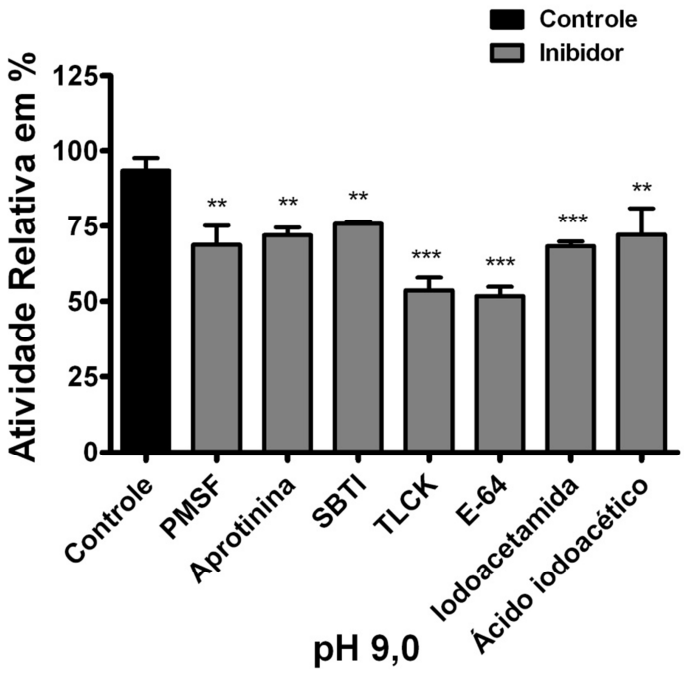


Figura 18: Efeito das diferentes classes de inibidores sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em pH 9,0. Foram utilizados homogeneizados do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* Em 80µL de meio reacional a concentração de proteína foi de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Na presença ou ausência de inibidores. Diluídos em tampão Tris-HCl pH 9,0 0,1 M. 0,15 M NaCl. O meio reacional foi incubado a 37ºC, por 30 minutos. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi definida em (%). Testes estatísticos Anova e Tunkey (P<0,05*), (p< 0,01**), (p<0,001***) e (ns) não significativo. As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

em que o PMSF na concentração 1,0 mM inibiu 36% da atividade proteolítica em pH 5,6 e em pH 7,9 o PMSF inibiu cerca de 77% da atividade proteolítica, utilizando azocaseína como substrato para ambas as análises (VINOKUROV *et al*., 2006a). Não foi observado potencial inibitório do PMSF contra o homogeneizado do intestino médio dos adultos de *Aegorhinus superciliosus*, (Coleóptera Curculionidae) (MEDEL *et al*., 2015). Além disso, foram observados 80 % de inibição da atividade proteolítica, quando adicionado inibidor especifico de serino protease PMSF, estes resultados, sugere que a serino proteases, são responsáveis por grande parte da atividade proteolítica do intestino médio das larvas de *O. coerulescens* (SHARIFI *et al*., 2012). Visto que a digestão de alimentos por serino proteases, é mais comum em lepidópteras (OPPERT *et al*., 2003). Contudo, foram detectada atividade das cisteíno proteases no intestino médio de algumas lepidópteras, pode ser devido à sobre-expressão de cisteíno proteases quando exposta aos inibidores de tripsina, ou sua produção por bactérias intestinais simbiontes associados a esses insetos (VISOTTO *et al*., 2009).

O inibidor de tripsina da soja SBTI na concentração de $0.125 \mu g.\mu L^{-1}$, foram capazes de inibir a atividade proteolítica das proteases presentes no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* em pH 5,6 ocorreu uma inibição de 11,7%, em pH 7,4 o inibidor não apresentou eficiência e em pH 9,0 a atividade proteolítica inibiu 24,3%, figuras16, 17 e 18. O inibidor SBTI é mais frequentemente utilizado para reconhecer enzimas do tipo tripsina (MEDEL *et al*., 2015). A atividade proteolítica máxima em pH 8,0 observada no intestino médio dos adultos de *Aegorhinus superciliosus*, (Coleoptera: Curculionidae), foi significantemente reduzida em 80% por SBTI na concentração 0,1 mM, indicando principalmente presença de proteases alcalinas (MEDEL *et al*., 2015). A atividade proteolítica máxima em pH alcalino indica a presença proteases semelhante à tripsina e quimotripsina, além disso, foi observada uma faixa de atividade proteolítica máxima para tripsina entre o pH 7,0 e 10,0 em vários insetos para diferentes ordens (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2009). Embora estudos sugiram que muitos coleopteros utilizam cisteíno proteases como principal enzima no processo digestivo, análises relataram a presença de proteases tipo tripsina no intestino médio de *Tenebrio molitor* (LEVINSKY *et al*., 1977). Além disso, o SBTI foi capaz de inibir atividade proteolítica de proteases digestivas de vários lepidópteras, lagarta da rosca, *Agrotis ipsilon Hufnagel*; lagarta da espiga, *Helicoverpa zea*, lagarta da maçã, *Heliothis virenscens* (PURCELL *et al*., 1992) e coleopteras tais como bicudo do algodoeiro (FRANCO *et al*., 2003).

Análises realizadas no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* com inibidor aprotinina, também referido como inibidor de tripsina pancreático bovina e um

Tabela 7. Efeito de inibidores específicos sobre atividade proteolítica de proteases presentes no trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus.*

A

Inibidores	Concentração	Inibição em % pH 5,6	Inibição em % pH 7,4	Inibição em % pH 9,0
Controle	*	0	0	0
PMSF	100 µM	5,98(±1,41)	*16,9(±4,26)	*31,3±(6,47)
Aprotinina	20 µM	*17,0(±1,96)	*17,3(±5,42)	*28,1(±2,65)
SBTI	0.125µg.µL^{-1}	*11,7(±0,77)	0,0(±1,47)	*24,3(±0,72)
TLCK	100 µM	*78,1(±2,31)	*66,4(±5,94)	*40,7(±3,90)
E – 64	10 µM	*55,7(±3,24)	*52,7(±3,57)	*48,2(±3,10)
Iodoacetamida	100 µM	*51,5(±4,23)	*45,7(±8,37)	*31,8(±1,56)
Ácido iodoacético	100 µM	*49,9(±5,97)	*49,2(±6,40)	*28,0(±8,78)

B

Inibidores	Atividade Proteolítica U/mg proteína pH 5,6		Atividade Proteolítica U/mg proteína pH 7,4		Atividade Proteolítica U/mg proteína pH 9,0	
	Controle	Inibidor	Controle	Inibidor	Controle	Inibidor
PMSF	12,4(±0,69)	11,6(±0,17)	9,85(±0,58)	8,19(±0,42)	6,65±(0,49)	4,57(±0,43)
Aprotinina	15,7(±0,18)	11,4(±0,27)	11,9(±0,48)	9,79(±0,56)	6,09(±0,07)	4,38(±0,14)
SBTI	13,5(±0,11)	11,9(±0,10)	10,8(±0,15)	11,1(±0,16)	7,35(±0,72)	5,56(±0,05)
TLCK	14,8(±0,69)	3,24(±0,34)	10,1(±0,39)	2,46(±0,48)	5,39(±0,21)	3,20(±0,21)
E – 64	13,0(±0,71)	5,79(±0,42)	12,1(±1,05)	5,74(±0,43)	10,6(±1,09)	5,51(±0,33)
Iodoacetamida	18,6(±0,58)	9,57(±0,78)	12,0(±0,28)	6,53(±1,00)	9,30(±0,11)	6,34(±0,14)
Ácido iodoacético	16,4(±0,85)	8,23(±0,98)	14,8(±0,88)	7,51(±0,94)	8,02(±0,79)	5,80(±0,70)

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína e inibição da atividade enzimática em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

dos membros mais estudados da família kunitz de inibidores (FRITZ *et al*., 1983), inibiu apenas 17% da atividade proteolítica em pH 5,6 e 7,4, entretanto, em pH 9,0 inibiu cerca de 28% da atividade proteolítica na concentração de 20 μM (figuras 16, 17 e 18). Um resumo dos resultados obtidos é apresentado na tabela 7A e 7B. Resultado semelhante foi observado no intestino médio das larvas *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), a atividade proteolítica foi inibida por aprotinina em 50%, na concentração 3,85 μM em pH 8,2 (OLIVEIRA *et al*., 2005). Vários estudos evidenciaram a presença de serino proteases em intestino médio de várias espécies de lepidópteras (VALAITIS *et al.*, 1999), entretanto estudos revelaram que o efeito inibitório de diferentes concentrações de aprotinina na atividade proteolítica de cisteíno proteases em *A. gemmatalis*, não foram significativas, tanto para a fração solúvel, quanto para a fração insolúvel (GOMES, *et. al*., 2011). Em *Zabrotes subfaciatus* foi isolada uma serino protease responsável pela hidrólise do inibidor de α-amilase comum em *Phaseolus vulgaris*, com atividade máxima em pH 8,8, inibida cerca de 90% por aprotinina em uma concentração de 250 μM (SILVA *et al*., 2001). As cisteíno e serino proteases requerem diferentes pHs e condições ideais para ativação e máxima atividade proteolítica, em intestino médio das larvas de *Tenébrio molit*or, foi verificado que a aprotinina não foi efetiva em meio ácido, inibindo apenas 5% da atividade, ao contrário no que ocorreu em pH mais alcalino, inibindo cerca de 83% da atividade proteolítica (NORMAN *et al*., 1990).

Em análises posteriores, foi observado uma redução significativa na hidrólise do substrato azocaseína pelo inibidor TLCK, quando adicionado ao homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, nos diferentes pH analisado: pH 5,6 uma inibição de 78 %, pH 7,4 inibição de 67% e pH 9,0 inibiu cerca de 40% da atividade proteolítica, figuras 16, 17 e 18. Esses inibidores de proteases tendem a formação de complexos estáveis a o se ligar com as enzimas proteolíticas, provocando a inativação das mesmas, (MOSOLOV *et al.* 2001). Segundo SHAW e colaboradores, (1965) os clorometil cetonas, (TLCK) são inibidores irreversíveis de serino proteases que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina, esquema proposto na figura 4. Entretanto estudos realizados comprovam que esta classe de inibidores, apresentam um alto potencial inibitório contra cisteíno proteases, promovendo alquilação no resíduo de cisteina presente no sitio ativo desta enzima, formando um tioéter irreversível, figura 4 (JAMES *et al*., 2002). A presença de uma região reativa do inibidor favorece a interação do inibidor com o sitio ativo da enzima, competindo diretamente com o substrato natural da enzima (SILVA *et al*., 2005). Em larvas de *Diabrotica virgifera* o inibidor de cisteíno e serino proteases TLCK, reduziu a hidrólise do substrato

específico de cisteíno proteases Z-phe-arg-AMC em 90 %, em condições ácidas em pH 4,5, na concentração de 25 μM, resultados semelhantes foram obtidos quando as analises foram realizadas em meio alcalino, pH 9,0, pH ótimo para serino proteases (BOWN *et al*., 2004a). Combinações de serino e cisteíno proteases têm sido reportadas em muitos coleópteros (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2007). Em larvas de *Osphranteria coerulescens* (Coleoptera: Cerambycidae), a atividade proteolítica foi fortemente inibida por TLCK, em pH 8,0, utilizando azocaseína como substrato, cerca de 68 %. Análises realizadas no intestino médio das larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), o inibidor TLCK, inibiu em mais de 80% a atividade proteolítica de cisteíno proteases em pH 4,2 na concentração 1 μM, contra o substrato caseína (OPPERT *et al*., 2003). Segundo OPPERT, (2003), dado ao tipo de inibidor utilizado, a atividade proteolítica ótima em pH ácido, corresponde preferencialmente atividade enzimática de cisteíno proteases, e quando o pH ótimo da atividade proteolítica esta na faixa alcalina corresponde atividade de serino proteases.

O inibidor específico de cisteíno proteases, E-64, em uma concentração de 10 μM, reduziu significativamente a hidrólise do substrato azocaseína, quando adicionado ao homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, quando testado em diferentes valores de pH. Em pH 5,6 inibiu 55,7%; em pH 7,4 inibiu cerca de 52,7% e em pH 9,0 inibiu 48,2% figuras 16, 17 e 18. Em *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae), a atividade proteolítica foi reduzida em torno de 80%, quando utilizado inibidor específico de cisteíno proteases E-64, em pH 6,2 em concentração de 10 μM, resultado estabelecido em uma curva dose–resposta deste inibidor (FABRICK *et al*., 2002). Estes resultados sugerem que a cisteíno proteases é a principal classe de enzima digestiva do extrato do intestino médio deste inseto praga (FABRICK *et al*., 2002). Em larvas de *Tenebrio molitor*, a distribuição das proteases digestivas no intestino médio são difundidas em um contexto espacial e compartimentado, em que o pH do meio é o fator preponderante para essa distribuição (TERRA e FERREIRA, 1994). Intestino médio anterior o pH é ácido em torno de pH 5,2 – 5,6, e no intestino médio posterior o pH é alcalino, variando entre 7,8 – 8,2. As análises das diferentes classes de proteases distribuídas pelo intestino médio anterior e posterior das larvas de *T. molitor*, em que a atividade proteolítica foi avaliada através do extrato do intestino médio anterior em pH 5,6 utilizando azocaseína como substrato e adição do inibidor específico de cisteíno proteases E-64, onde foi observado uma redução na atividade enzimática em 64%, entretanto o PMSF, inibidor específico de serino proteases reduziu em 36% da atividade no mesmo pH (VINOKUROV *et al.*, 2006a). Em extrato do intestino médio posterior das larvas de *T. molitor* em pH 7,9, o E-64 e o PMSF inibiram a

atividade proteolítica em 20% e 76% respectivamente (VINOKUROV *et al.*, 2006a). Resultado semelhante foi observado em nossas análises com homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* em pH 5,6, em que o PMSF inibiu apenas 6% da atividade proteolítica, entretanto o inibidor E-64 inibiu em torno de 56% no mesmo pH. Este resultado sugere que a cisteíno protease é responsável majoritária da atividade proteolítica no intestino médio das larvas de *A. diaperinus*. Entretanto, nossas análises em pH alcalino, foi observado um acréscimo considerável da inibição do PMSF em 31% contra o homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus,* este aumento de inibição da atividade proteolítica do inibidor especifico de serino protease PMSF esta correlacionado ao pH ótimo de atividade proteolítica das serino proteases (BOWN *et al*., 2004a).

Análises com o inibidor E-64 em homogeneizado do intestino médio de *Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus*, contra o substrato específico de cisteíno proteases Z-PheArg-MCA, em pH 6,0, reduzindo por completamente a atividade proteolítica, sugerindo a presença de cisteíno proteases em ambas as espécies (SILVA *et al*., 2001). Contudo foi observado uma redução na atividade proteolítica em 54 %, e 55 %, em *Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus*, respectivamente, quando o inibidor específico de serino protease do tipo aprotinina, foi adicionado ao homogeneizado do intestino médio, de ambas as espécies, utilizando o substrato Z-Phe-Arg-MCA em pH 6,0 (SILVA *et al*., 2001). A atividade proteolítica foi inibida por iodoacetamida, quando adicionado a o homogeneizado do intestino médio das larvas de *A. diaperinus* em pH 5,6 foi observado uma inibição de 51,5 % em pH 7,4 a inibição foi de 45,7 % e 31,8 % de inibição em pH 9,0, figuras 16, 17 e 18. Semelhantes aos resultados obtidos no intestino médio das larvas de *Lissorhoptrus brevirostris* (Coleoptera: Curculionidae), cujo nome popular é bicheira-da-raiz, que é um gorgulho responsável por ocasionar danos à cultura do arroz. A atividade proteolítica foi reduzida por iodoacetamida (1,0 mM) em pH 5,0 (67 %) e pH 7,5 (37 %), não apresentando inibição em pH 9,0 (HERNÁNDEZ *et al*., 2003). Segundo HERNÁNDEZ e colaboradores (2003), estes resultados sugerem que a atividade proteolítica ocorre em uma gama de valores de pH, de ácido a alcalino, onde inibidores específicos de serino proteases foram mais eficiente em pH alcalino e os inibidores específicos de cisteíno proteases mais eficazes em pH mais ácidos, sugerindo que essas espécies de insetos possuem um sistema digestivo baseado em classes de proteases com mecanismos distintos. Entretanto análises em intestino médio das larvas de *Homalinotus coriaceus* (Coleoptera: Curculionidae), uma das principais pragas da cultura do coqueiro, o inibidor iodoacetamida (1 mM), não foi eficiente na redução da hidrólise do substrato azocaseína em pH 5,0 inibindo

apenas 8 % da atividade proteolítica (MACEDO *et al*., 2011). Larvas e adultos da maioria das Curculionidae estudadas apresentam sistemas proteolíticos complexos no processo digestório sendo identificadas cisteíno, serino e aspartil proteases no intestino médio desses insetos (ALFONSO *et al*., 2003). Em adultos de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como moleque da bananeira, uma das mais sérias pragas do plantio de bananas (RUKAZAMBUGA *et al*., 1998), a atividade proteolítica foi caracterizada, utilizando inibidores específicos de proteases. O inibidor de cisteíno proteases iodoacetamida inibiu cerca de 39 % da atividade proteolítica do intestino médio de adultos *C. sordidus*, utilizando azocaseína como substrato em pH 6,0 não apresentando inibição em valores mais alcalinos (MONTESDEOCA *et al*., 2005). Estes resultados sugerem que o intestino médio de algumas espécies de coleópteras apresenta um meio levemente ácido, com isso, a presença de cisteíno proteases, responsáveis por grande parte da atividade proteolítica no intestino médio desses insetos (WILHITE *et al*., 2000).

Segundo OPPERT, (2010), as cisteínos proteases foram encontradas no trato digestivo de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) como principal enzima digestiva. Contribuindo para os resultados observados com o inibidor de cisteíno protease ácido iodoacético na concentração de 100 μM , contra o homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* nos pH analisados. Foi visto que em pH 5,6 inibiu cerca de 49,9 % a atividade proteolítica, em pH 7,4 a inibição foi de 49,2 % e em pH 9,0 inibiu 28 %, figuras 16, 17 e 18. Igualmente ao que foi observada em larvas de *Diabrotica virgifera*, a atividade proteolítica foi fortemente inibida por ácido iodoacético, quando adicionado na concentração 1,0 mM, resultando em 43 % de inibição máxima, em meio levemente ácido (GILLIKIN *et al*., 1992). Resultado semelhante foi demostrado em larvas de *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae), onde o inibidor de cisteíno protease, ácido iodoacético, inibiu cerca de 50 % da atividade proteolítica em pH 6,2, quando adicionado ao homogeneizado do trato digestivo, utilizando caseína como substrato (FABRICK *et al*., 2002). Entretanto a atividade proteolítica em trato digestivo das larvas de *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Pyralidae), foi pouco inibida pelo ácido iodoacético em pH 10, sugestionando que proteases do tipo cisteino, não são predominantemente responsável pelo processo digestório das proteínas no intestino médio dessas espécies (MAHDAVI *et al*., 2013), reportando a importância da alcalinidade do sistema digestório em muitos lepidópteras, sugestionando que o valor da atividade proteolítica esta intrinsicamente ligada ao pH do sistema digestivo (CHOUGULE *et al*., 2008), onde foi analisado alto potencial de inibição do inibidor

específico de serino proteases PMSF em mais de 50 % da atividade proteolítica do trato digestivo *G. pyloalis* (MAHDAVI *et al*., 2013).

Em análises realizadas em zimograma, utilizando gelatina como substrato, foi observado similaridade no perfil inibitório das proteases digestivas presentes no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Proteases do tipo cisteíno protease foi inibida na presença de inibidores específicos E-64, ocasionando o desaparecimento ou na redução da intensidade das bandas P5, P6, P7 e P8 em pH 5,0 (figura 19). Além disso, análise realizada com inibidor específico de serino protease PMSF inibiu a atividade proteolítica das bandas P5, P7 e P8 em pH 7,5, sugerindo a presença de serino proteases no intestino médio das larvas de *A. diaperinus* (figura 20). Em *larvas de Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae), os zimogramas com o inibidor geral da serino protease PMSF revelaram que as atividades das bandas com 56 kDa e 63 kDa foram ligeiramente inibidas, enquanto que não pode ser verificada inibição da atividade na banda com 18 kDa. Além disso, o uso de PMSF inibiu ligeiramente bandas entre 30 kDa e 40 kDa, o que tornou necessário também rastrear outros grupos de serino proteases (WAGNER *et al*., 2002). Pelo menos seis atividades principais de proteases foram detectadas nos extratos do intestino médio de larvas de *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), usando análise de zimograma. Esses achados indicam que quatro tipos de serino protease e uma protease sensível ao E-64, foram detectados.

Entretanto, efeitos de inibidores específicos de proteases sugerem que outras proteases além daquelas capazes de serem inibidas podem estar contribuindo para a digestão de proteínas (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2007). Curiosamente, análises de zimogramas e ensaios de inibição da atividade proteolítica de larvas *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), demonstraram bandas com massa moleculares 28 kDa e 73 kDa, foram inibidas por inibidores específicos SBTI e TPCK, sugerindo ser serino proteases tipo tripsina e quimiotripsina respectivamente. Entretanto proteases cisteínicas, proteases aspárticas, e metaloproteases não foram detectadas no intestino de larvas desses insetos (SELLAMI *et al*., 2016). Estudos evidenciaram que as serino proteases, particularmente tripsinas e quimotripsinas, são majoritárias no ambiente intestinal de larvas de lepidópteros e contribuíram em torno de 95% do total da atividade digestiva. Além disso, as atividades de proteases como as elastases-like, carboxipeptidases, proteases semelhantes à catepsina B e metaloproteases , contribuem muito pouco no processo digestivo, em quase todas as espécies de lepidópteros, (GATEHOUSE *et al*., 1999; HEGEDUS *et al*., 2003; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

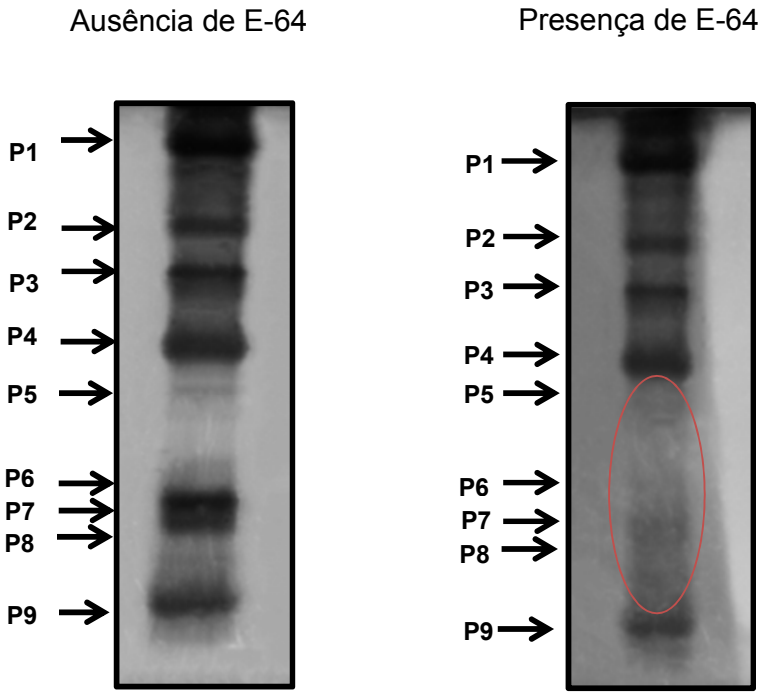


Figura 19: Efeito do inibidor de E-64 na atividade proteolitca no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius daperinus*. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% copolimerizados com gelatina 0,1%, após alimentar-se da dieta comercial, utilizada na manutenção da colônia. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 4 horas a 37ºC em tampão citrato/fosfato 0,1 M pH 5,6. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína/ linha, na ausência (controle) e presença de E-64 10 µM. As bandas mais escuras no zimograma representa a presença de atividade proteolítica (P1 – P9).

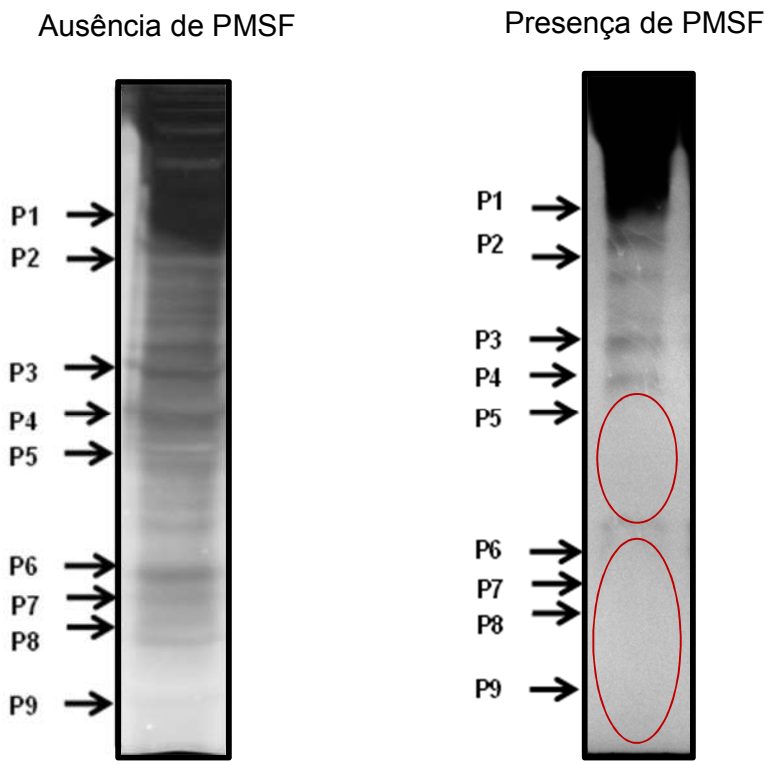


Figura 20: Efeito do inibidor de PMSF na atividade proteolitca no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius daperinus*. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% copolimerizados com gelatina 0,1%, após alimentar-se da dieta comercial, utilizada na manutenção da colônia. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 4 horas a 37ºC em tampão tris/HCl 0,1 M pH 7,4. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína/ linha, na ausência (controle) e presença de PMSF 200 µM. As bandas mais escuras no zimograma representa a presença de atividade proteolítica (P1 – P9).

Ao contrário da maioria dos insetos que utilizam serino proteases para digestão, proteólise digestiva por muitos coleopteros são predominantemente devido à atividade das cisteíno proteases (MURDOCK *et al*., 1987). Como demonstrado em estudos realizados em larvas de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), em que 90 % da atividade proteolítica é atribuível a cisteíno proteases (ZHAO *et al*., 1996). Presumivelmente, as cisteíno proteases digestivas são sintetizadas em células epiteliais intestinais das larvas de *D.virgifera* (GRAF *et al.*, 1986), em seguida, secretadas no lúmen do intestino médio, onde facilitam a assimilação de aminoácidos pela hidrólise das proteínas da dieta (LEHANE *et al*., 1996). Dados bioquímicos e moleculares disponíveis indicam que as proteases do intestino médio da *D.virgifera* são similares às cisteíno proteases lisossômicas do tipo catepsina de mamíferos, particularmente, catepsina B, H e L (MATSUMOTO *et al*., 1997). Presumivelmente, os resultados sugerem que a maioria das proteases do homogenatos do intestino larval de *A. diaperinus* apresentam propriedades ácidas, tais como as cisteíno proteases.

5.5. Efeito do cálcio sobre a atividade das proteases no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. Diaperinus*.

Esse cátion é geralmente ligado ao carboxilato de proteínas ou átomos de oxigênio de amidas com uma geometria de coordenação característica. Muitas proteínas são conhecidas por serem estabilizadas pela ligação de Ca^{+2} a locais específicos (MCPHALEN *et al*., 1991). Para algumas dessas enzimas, o Ca^{+2} também pode ter um papel adicional na função catalítica. Entre muitos outros, os sítios estruturais de ligação de Ca^{+2} foram identificados em α-lactalbumina (BRYANT *et al.,* 1984), α-amilase (BUISSON *et al*., 1987) e a proteína de ligação a galactose de *Escherichia coli* (VYAS *et al*., 1987). Diferentes concentrações de íons de cálcio foram utilizadas para analisar seu efeito na atividade proteolitca do homogeneizado do intestino médio de larvas de *A. diaperinus*, (Figura 21, tabela 8). A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.5. Podemos verificar na figura 21 que a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, foi mais efetiva em 34,4 %, na concentração 10 mM de $CaCl_2$, entretanto na concentração de 250 mM de $CaCl_2$, pode-se observar uma diminuição da atividade proteolítica em 29 %, quando ambos os resultados foram comparado a amostra sem Ca^{2+}. O efeito do Ca^{2+} foi estudado na atividade proteolítica em larvas do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), sendo relatado maior eficiência na atividade enzimática após adicionar diferentes

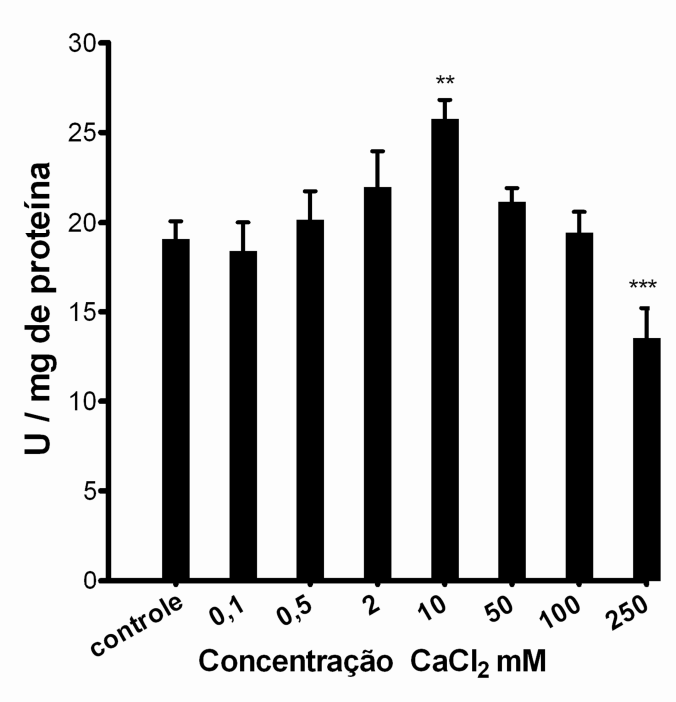


Figura 21: Efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*. Foram utilizados homogeneizados do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Diluídos em 80µL de meio reacional, em uma concentração de proteína de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Foram utilizadas diferentes concentrações de $CaCl_2$: 0,1, 0,5, 2,0, 10, 50, 100, 250mM. Controle sem $CaCl_2$. Diluídos em tampão citraro/fosfato pH 5,6 0,1 M, na presença de DTT 2 mM. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p< 0,01$**), ($p<0,001$***). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

Tabela 8. Efeito do cálcio sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

CONCENTRAÇÃO (Mm)	Controle	0,1	0,5	2,0	10	50	100	250
U/mg de PROTEÍNA	19,05 (±1,03)	18,37 (±1,63)	20,17 (±1,57)	21,97 (±1,99)	*25,75 (±1,10)	21,17 (±0,75)	19,44 (±1,16)	13,54 (±1,66)
ATIVIDADE RELATIVA EM %	100,0	96,43	105,9	114,4	*134,4	109,9	102,8	71,05

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína e atividade enzimática em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

concentrações de $CaCl_2$, quando testado contra proteases do intestino médio das larvas (VAJDA e GARAI, 1981).

Algumas proteases tipo tripsina de insetos utilizam o Ca^{2+} como co-fator (WAGNER *et al*., 2002). Uma peculiaridade observada foi à diferença comportamental entre a tripsina bovina e a atividade proteolítica da protease tipo tripsina em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), em que a presença de cálcio não influenciou na atividade enzimática (JOHNSTON *et al*., 1991). AHMAD e colaboradores (1980), demonstraram que o cálcio não foi necessário para a ação catalítica das proteases em *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Contudo em larvas em larvas de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) a atividade proteolítica variou na presença do cálcio, conforme o substrato empregado, aumentando no uso do substrato BApNA, entretanto não foi obsevado variação da atividade proteolítica no emprego BAEE como substrato, (HOUSEMAN *et al*.,1989). A interpretação desta ativação do cálcio é difícil, pois foi observado, que a hidrólise do substrato BApNA, aumentou na presença de quelantes de cálcio. De acordo com a literatura tripsinas de insetos como: *Diatraea saccharalis*, *Periplaneta americana*, *Tenebrio mollitor* e *Musca domestica,* não são estabilizadas ou ativadas por íons de cálcio (JONHSTON *et al*., 1991). Contrariando estas evidências, OLIVEIRA e colaboradores (2005) sugeriram que uma enzima digestiva semelhante à tripsina de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), parece ser estabilizada por íons Ca^{2+} à semelhança do que ocorre com tripsinas de vertebrados (DIAS *et al*., 1986).

Vários autores reportaram em que diferentes concentrações de íons Ca^{2+}, foram efetivas na ativação e estabilização em serino proteases de invertebrados, efeito semelhante foi observado em crustáceo decápode caranguejola, *Cancer paguros* (SABOROWSKI *et al*., 2004). Estudos sugerem que dependendo da enzima, podem possuir locais específicos de ligação de cálcio no interior da molécula, protegendo-a simultaneamente a autodegradação e aumenta a estabilidade térmica, o que acarreta mudança conformacional da enzima e consequente otimização no posicionamento do centro ativo (CHIANCONE *et al*., 1985). Segundo BODE e SCHWAGER (1975), os sítios de ligação do íon Ca^{2+}, das serino proteases encontram-se localizados nas bordas de um octaédrico quase regular, compreendendo dois carboxilatos (Glu 70 e Glu 80), duas carbonilas (Asn72 e Va175) e duas moléculas de água.

Assim, nossos resultados sugerem a presença de enzimas proteolíticas no sistema digestivo das larvas de *A. diaperinus*, que possivelmente estejam sendo estabilizadas pelos íons de cálcio, levando a mudança na conformação e melhorando o posicionamento do sítio ativo, favorecendo o desempemho catalítico, principalmente nas proteases cálcio-dependente.

5.6. Atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* mantidos em diferentes dietas.

Em coleopteros, foram relatados tempos de passagem dos alimentos pelo canal alimentar em algumas horas até dois dias, mostrando uma aparente tendência de aumentar o tempo de passagem pelo canal alimentar em espécies maiores (CROWSON, 1981). A digestão eficiente depende não apenas da atividade enzimática, mas também do período de tempo para o qual o alimento é retido no intestino e sujeito a atividade enzimática (VAZQUEZ *et al*., 1999). O tempo de retenção ideal também será afetado pela disponibilidade de alimentos e as exigências nutricionais do organismo e os mecanismos regulatórios existentes garantirão que a passagem de alimentos pelo intestino seja ajustada para atender a essas condições variáveis (CHAPMAN, 1985). Após análises preliminares da atividade proteolítica no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, fomos verificar o comportamento da atividade proteolítica quando os insetos eram alimentados em diferentes tipos de dietas. Compreender os requisitos nutricionais dos insetos e os efeitos de diferentes dietas no desenvolvimento de insetos podem fornecer ferramentas para o desenvolvimento de estratégias de controle de insetos e sistemas integrados de manejo de pragas (FABRES *et al*., 2014).

Os resultados obtidos das larvas de *A. diaperinus* criadas em diferentes substratos possibilitaram uma avaliação comparativa da influência da dieta sobre o desenvolvimento do sistema enzimático digestivo, as análises em seu intestino médio demonstraram diferenças na atividade proteolítica, utilizando azocaseína como substrato após serem mantidas com diferentes dietas. Como controle foi empregado uma dieta comercial Prefran-Guabi (21 % de proteína bruta, 0,85 % de material mineral e 0,15 % de cálcio), utilizada na manutenção da colônia das larvas e adultos dos *A. diaperinus*. Outras cinco dietas foram usadas nos delineamentos experimentais, sendo quatro delas destinada ao sistema de produção avícola: Dessas quatro, três são especificamente preparadas para produção de frango de corte, assim sendo, uma para cada fase de desenvolvimento das aves (fase inicial, crescimento e final), e outra dieta preparada somente para aves de postura, responsáveis pela produção de ovos. Para todas as dietas o carboidrato foi derivado do milho e a proteína bruta do farelo de soja, eram os constituintes majoritários nas formulações das rações (Tabela 1). Uma particularidade na ração de postura é a concentração de calcário calcílitico, que é aproximadamente dez vezes superior às concentrações encontradas nas formulações das dietas das fases iniciais, crescimento e final (Tabela 1). Foi utilizada uma dieta não relacionada constituída de farinha de carne e osso, é frequentemente utilizada como ingrediente para a fabricação balanceada de

rações para animais, resultante do cozimento de subprodutos de origem bovina, constituído principalmente de ossos e vísceras, com uma concentração de proteína bruta mínima de 45 % e concentração máxima de cálcio e material mineral em torno de 15 % e 40 % respectivamente, tornando a farinha rica em proteínas, cálcio, fósforo e gordura (FARIA *et al,* 2002). Foram utilizadas 30 larvas no ultimo instar larvar (10 mm de comprimento) após 48 horas em jejum e depois mantidas por sete dias em uma determinada dieta contendo 200 mg de ração. Esses experimentos foram realizados em placas de petri que foram mantidos em BOD a 30ºC, umidade relativa 60%. Após esse período os animais foram recolhidos e seus tratos digestivos foram removidos para a determinação da atividade proteolítica.

Segundo TERRA e colaboradores, (2012) diferentes dietas, possivelmente acarretará a presença de enzimas digestivas complementares produzidas em quantidades relativas, em resposta as diferentes composições das dietas. Os resultados observados sugerem que as dietas fornecidas às larvas do *A. diaperinus* influenciaram diretamente na atividade enzimática das proteases presentes em seu intestino médio (figura 22). Uma das explicações podem ser os constituintes presentes em cada dieta, tanto na formulação como nas concentrações utilizadas, como observado nas concentrações de proteína bruta presente nas diferentes dietas fornecidas as larvas, em que a farinha de carne e osso, entre todas as dietas é a que oferece maior concentração de proteína bruta de 45 %. Quando as larvas foram mantidas na farinha de carne e osso, a atividade proteolítica no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* foi de 16,3 U/mg de proteína, cerca de 70 % mais elevada, quando comparado ao controle, com uma concentração de proteína bruta de 21 %, que foi de 9,15 U/mg de proteína, ao contrário no que foi observado na atividade proteolítica das larvas quando alimentadas com ração de postura 10,3 U/mg de proteína, com uma concentração de proteína bruta de 15,6%, no qual não apresentou diferença significativa na atividade proteolítica, quando comparado ao controle (Tabela 9). Vários estudos procuram entender e avaliar a regulação pós-ingestivo de proteínas nutricionais e carboidratos em insetos, alterando a secreção de enzimas digestivas (PIASECKA-KWIATKOWSKA *et al*., 2013). Estudos mostram que atividade enzimática pode ser regulada pelas substâncias químicas presentes no alimento, atuando diretamente no epitélio do intestino médio através de um mecanismo denominado secretagogo. Esses mecanismos de controle ocorrem em insetos com uma variedade de hábitos alimentares (CHAPMAN, 1998), através do quais diferentes enzimas são controladas independentemente, de modo que somente são produzidas aquelas apropriadas aos alimentos presente no intestino (CHAPMAN, 1998).

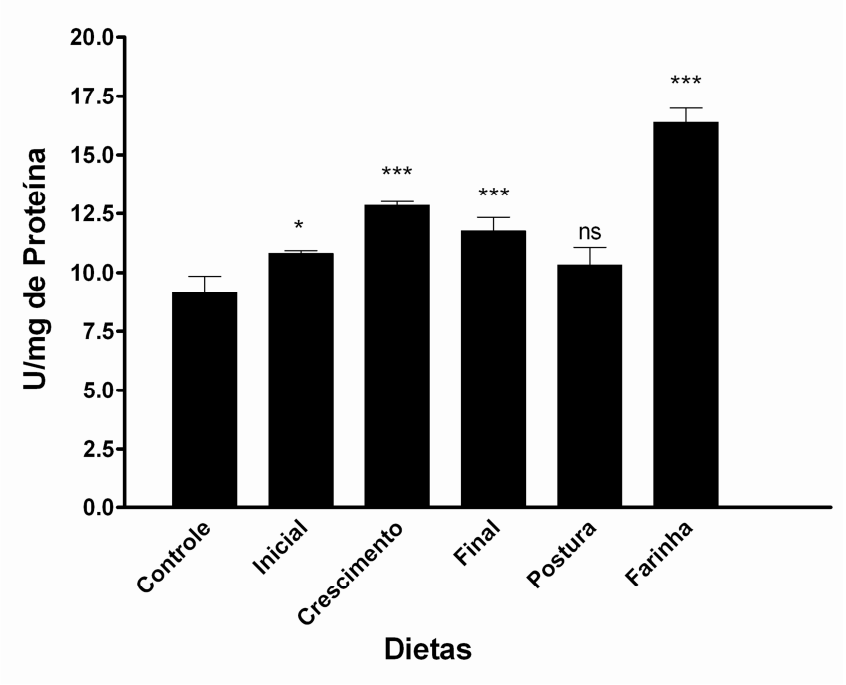


Figura 22: Efeito da dieta na atividade proteásica do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* mantidas com diferentes dietas. Foram utilizados homogeneizados do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, após alimentarem-se de diferentes dietas (inicial 22,2% pb; crescimento 22,2% pb; final 18% pb; postura 15,6% pb e farinha 45% pb) e a dieta comercial utilizada como controle 21% pb. Diluídos em 80µL de meio reacional, em uma concentração de proteína de 0,4 µg de proteína/µL, utilizando azocaseína 1% como substrato para determinação da atividade proteolítica. Diluídos em tampão citrato/fosfato pH 5,6, 0,1M, na presença de DTT 2 mM. Os azopeptideos liberados derivado da azocaseína foram quantificados colorimetricamente a 440 nm. A atividade proteolítica foi expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p<0,05$*), ($p<0,001$***) e ns (não significativo). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M). Proteína Bruta (pb).

Tabela 9: Efeito das diferentes dietas sobre a atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*.

DIETAS	U/mg de proteína	Atividade Proteolítica em %
CONTROLE	9,15(±0,68)	100
INICIAL	*10,8(±0,12)	118
CRESCIMENTO	*12,8(±0,16)	139
FINAL	*11,7(±0,58)	128
POSTURA	10,3(±0,75)	113
FARINHA	*16,3(±0,59)	178

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mg de proteína e atividade enzimática em (%). Análises estatisiticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam diferença significativa nas amostras analisadas. Tukey ($p < 0,05$).

.

Em insetos sugadores de sangue, como o mosquito, por exemplo, uma refeição de açúcar não induz a atividade das enzimas proteolíticas (CHAPMAN, 1998). Segundo BROADWAY e DUFFEY, (1986), após utilizar uma dieta artificial contendo caseína em diferentes concentrações, como fonte primária de proteína, o nível de digestão *in vivo* de proteína e a atividade proteolítica em larvas de *Spodoptera exígua* (Lepidoptera: Noctuídae) foi proporcional à concentração de proteína dietética, sob exposição aguda (24 horas de exposição) e crônica (todo estagio de desenvolvimento larval), e não a quantidade de alimento presente no intestino, sugerindo que a síntese e/ou secreção enzimática é controlada por um mecanismo secretagogo. Entretanto, quando BROADWAY e DUFFEY, (1986), analisaram larvas de *Helicoverpa zeu* (Lepidoptera: Noctuidae) foi observado apenas um mecanismo secretagogo de controle da atividade proteolítica, sob exposição aguda as diferentes concentrações de caseína e sob exposição crônica a atividade proteolítica era uniforme, independentemente da concentração de caseína da dieta.

A qualidade da comida disponível ou dieta são fatores fundamentais que afetam o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (SIGHINOLFI *et al*, 2008). A qualidade e a quantidade das enzimas digestivas em insetos fitófagos podem ser alteradas em respostas as mudanças proteicas das dietas, entretanto *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae), apresentou diferença após a alimentação, demonstrando as diferentes capacidades de distinguir e responder aos estímulos alimentares entre fitófagos e hemípteros entomófago (PASCUAL-RUIZ *et al*., 2009). Estudos foram realizados para avaliar a capacidade de desenvolvimento, reprodução, atividade digestivos e da digestão de *Chrysopa septempunctata* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. Após serem alimentados com uma dieta artificial ou com presas naturais (pulgões) como controle, foi avaliada a rápida influência dos alimentos sobre esses predadores. Foi observado efeitos variáveis no desenvolvimento, reprodução e atividade digestiva de *C. septempunctata*, visto que a atividade proteolítica foi muito maior quando alimentadas com os pulgões do que naquelas alimentadas com a dieta artificial, além disso, a atividade proteolítica nas larvas foi significativamente maior do que em adultos para ambas as dietas (LIU *et al*., 2013).

Em larvas de *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae), insetos pragas responsáveis por causar danos econômicos por perda de carboidratos, teor de gordura bruta e proteínas de produtos armazenados (AHMEDANI *et al*., 2009), foram avaliados os traços biológicos, índices nutricionais e atividade enzimática digestiva, após alimentarem-se de diferentes dietas. Os resultados demonstraram que as dietas com maior concentração de proteína bruta, a atividade de protease total foi maior em larvas nos últimos estádios de

desenvolvimento, quando comparados com as outras dietas (BORZOUI *et al*., 2015). Talvez o nível de atividade proteolítica de *T. granarium* seja regulado com base na composição protéica e quantidade de amido oferecido aos insetos (BORZOUI *et al*., 2015). Estudos realizados em larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), mostraram que as atividades enzimáticas, variaram durante o desenvolvimento da larva e quando alimentadas com diferentes dietas, inclusive quando alimentadas com diferentes tipos de farinha de trigo. Esses dados mostram que até pequenas mudanças na composição da dieta refletiram diretamente no perfil digestivo de larvas (FABRES *et al*., 2014). Resultados semelhantes foram observados quando as larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), foram alimentadas com pastilhas de leguminosas frescas, vegetais, flores e cereais.

Outros estudos também reportaram que alterações na atividade das enzimas digestivas dos insetos esta diretamente relacionada aos constituintes presentes nas diferentes dietas (WOOL *et al*., 1986; BOUAYAD *et al*., 2008; KOTKAR *et al*., 2009; NASERI *et al*., 2010). Os valores das atividades das proteases do extrato intestinal de larvas *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), alimentadas com diferentes dietas, demonstraram que as atividades proteolíticas das enzimas digestivas eram altas, embora os teores de proteínas alimentares fossem relativamente baixos (dieta artificial 15% de proteína, palmeiras 4% de proteína e 3% de proteína de cana-de-açucar). O desenvolvimento digestivo de larvas de *R. ferrugineus* parece ser influenciado pelo tipo de alimento utilizado durante a criação do inseto. O nível mais alto de atividade de protease foi encontrado nas larvas criadas em dietas artificiais (ALARCO *et al*., 2002).

Uma vez que as proteases desempenham um papel importante na digestão de alimentos para larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus*, é importante caracterizar estas proteases para que possam efetivamente controlá-las em futuras estratégias de manejo desta praga. Compararam-se os diferentes níveis de atividade proteolítica no trato digestivo das larvas e adultos de *A. diaperinus*, após digerir e utilizar diferentes dietas, com diferentes constituintes e concentrações de proteínas, medida e revelada por zimografia, utilizando gelatina 0,1% como substrato em gel parcialmente desnaturante e na ausência do agente redutor DTT (figura 23 A, B e C). Foi observado, pelo menos nove formas de proteases ativas, foram resolvidas a partir dos extratos digestivos das larvas do último instar de *A. diaperinus* e extratos digestivos de adultos, de acordo com a sua mobilidade no gel. Um conjunto mais complexo de bandas ativas foram observadas após serem reveladas com blue comassie, exibindo uma composição de proteases praticamente constante, tanto para larvas como para os adultos, com massa molecular entre 10 kDa - 15 kDa (linha E)

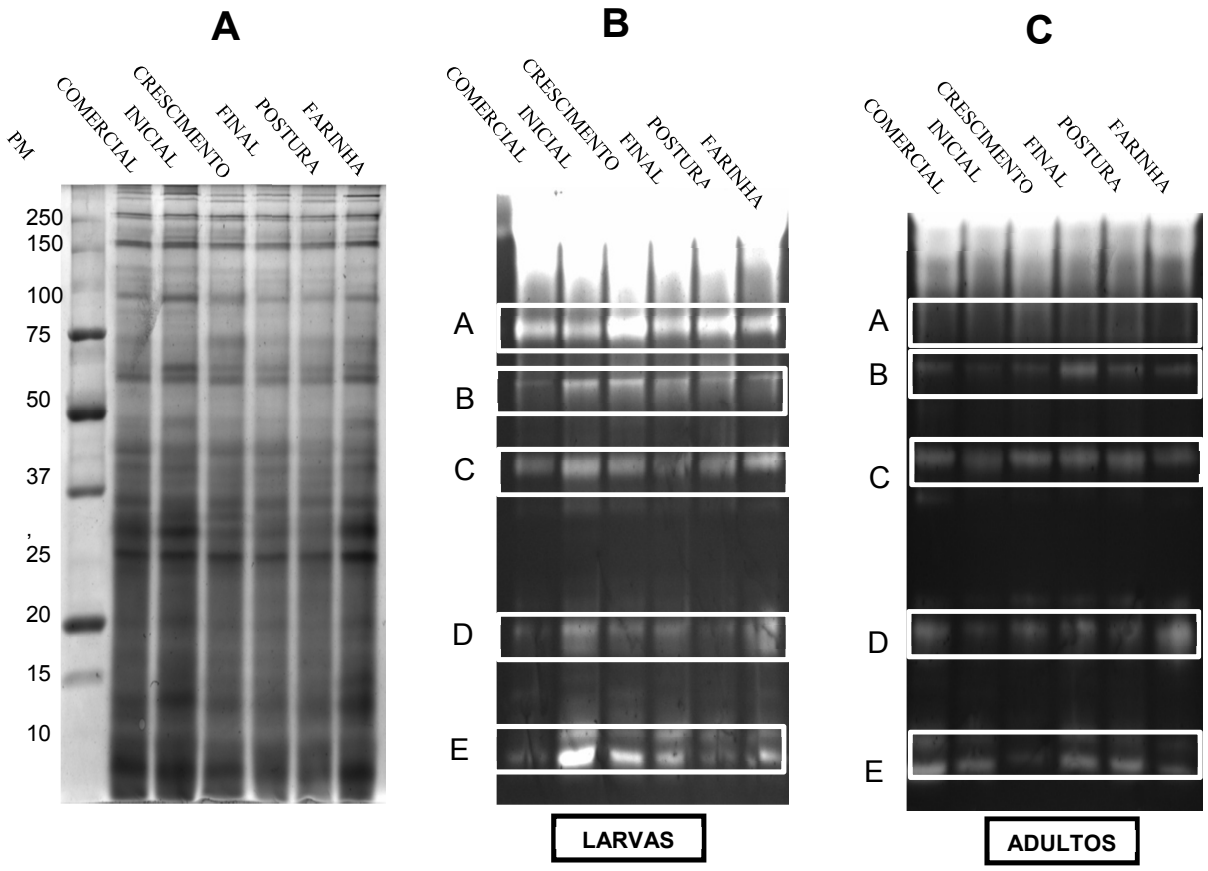


Figura 23: Efeito de diferentes dietas no perfil proteico e na atividade proteolítica das proteases digestiva das larvas e adultos de *A. diaperinus*. (A) eletroforese realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12 %; (B) e (C) Zimograma, copolimerizados com gelatina 0,1%, após larvas e adultos alimentar-se de diferentes dietas (inicial 22,2% pb; crescimento 22,2% pb; final 18% pb; postura 15,6 % pb e farinha 45% pb) e comercial utilizada como controle 21% pb). A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 2 horas a 37ºC em tampão citrato/fosfato 0,1M pH 5,6. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína / linha do trato digestivo de larvas ou adultos. As caixas de (A – E) representa a presença de atividade proteolítica entre as dietas. (MM – Massa Molecular kDa). Proteína Bruta (pb).

20 kDa - 30 kDa (linha D), 40 kDa - 50 kDa (linha C) e 75 kDa (linha B), embora algumas diferenças na intensidade de bandas específicas tenham sido encontradas, visto nas proteases de massa molecular elevada variando de 80 a 100 kDa (linha A), foram mais evidentes nas larvas, quando comparado aos adultos e variam sua intensidade conforme a dieta utilizada (figuras 23 A, B e C). Mudanças nas atividades da protease digestiva foram monitoradas durante o desenvolvimento do besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), extratos do intestino médio das larvas exibiram maior atividade específica de proteases, quando comparados aos extratos digestivos dos adultos com menor intensidade (MICHAUD *et al*., 1995b).

Em análises realizadas em adultos tenerais de *D. abbreviatus*, foram encontradas baixas concentrações de proteases em seus intestinos, quando não alimentados, enquanto que diferentes classes de proteases foram sintetizadas em larvas e adultos completamente formados e alimentados (BEN-MAHMOUD *et al*., 2015). Alterações nas proteases digestivas foram relatadas em outros insetos em resposta a inibidores presente em dieta (BOWN *et al*., 2004b) e durante o desenvolvimento (HOSSEINI-NAVEH *et al*., 2007). No gorgulho das videiras *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae), as larvas alimentam-se exclusiva e extensivamente das raízes das plantas, enquanto os adultos de folhas. A mudança nas proteases digestivas das larvas para o adulto no gorgulho da videira pode, portanto, refletir mudanças na composição das dietas (EDWARDS *et al*., 2010). Segundo WHITWORTH e colaboradores (1998), com base na especificidade das dietas, foi caracterizada a presença de proteases do tipo quimotripsina e do tipo elastase em larvas da formiga de fogo *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), desempenhando um importante papel na sobrevivência da colônia, sendo totalmente responsável pela digestão de alimentos sólidos, que prontamente são utilizados como fonte de nutrientes para os adultos. No mesmo contexto, também é importante ressaltar que adultos quando analisados para essas mesmas enzimas digestivas putativas, encontraram-se desprovidas dessas proteases.

Em estudos realizados em larvas de *Bombyx mori*, o aumento da alimentação para as larvas do último instar e remodelação do tecido do intestino médio durante a metamorfose, foram investigados o padrão de expressão gênica da serino protease durante o desenvolvimento larval-pupa-adulto deste animal. A expressão do mRNA da serino protease foi encontrada em dois estágios: o estágio larval, caracterizado pelo aumento do consumo de ração e nos estágios finais de pupa. Entretanto nenhum sinal foi detectado nos primeiros estágios de pupa e no adulto (LIU *et al*., 2017). Nos mosquitos, os diferentes hábitos alimentares de larvas e adultos impuseram a pressão seletiva, que levou à evolução de

tripsinas larvais e adultas específicas, exibindo diferenças estruturais consideráveis (VENANCIO *et al*., 2009). Entretanto, extratos do intestino médio de larvas de *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae), exibiram taxas mais altas de atividade específica de protease do que aquelas medidas para extratos de adultos. Além dessas variações quantitativas, não foram observadas diferenças qualitativas. Concluindo, que larvas e adultos possuem um perfil proteolítico similar, como esperado em um inseto com os mesmos hábitos alimentares e explorando os mesmos nichos ecológicos nos estágios larval e adulto (ORTEGO *et al*., 1998).

Proteases do intestino médio de larvas de *A. diaperinus* foram detectadas e parcialmente caracterizadas utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% contendo 0,1% (p/v) de gelatina, após alimentarem-se de diferentes dietas (Comercial, Fase inicial, Fase crescimento, Fase final, Postura e Farinha de carne e osso), durante sete dias consecutivos como descrito anteriormente no item 4.2. Após a corrida os géis foram revelados em fotodocumetador de alta resolução e as analise quantitativa como volume e massa foram realizados pelo programa Image Lab 5.1 da BIO RAD. A concentração de proteína utilizada para avaliar a atividade de proteases presente nos homogeneizados referentes às diferentes dietas foram 15 µg de proteína por linha, normalizadas na proporção de 15 µg de proteína por linha do gel. As massas moleculares das proteases presente no zimograma foram aproximadas pela normalização do gel de proteína com o gel de protease (zimograma), realizada pelo programa Image Lab 5.1 da BIO RAD, pois todos os géis possuem mesmas características físicas, além disso, a corrida foi realizada nas mesmas condições experimentais.

Essa análise revelou a presença de diversas bandas proteícas e foi possível observar nos resultados, algumas similaridades no perfil proteico entre as amostras analisadas. Entretanto foi observada a presença de bandas distintas, pelo qual exibiram diferença na intensidade e em seu volume, quando estas foram comparadas entre as linhas contendo as amostras dos extratos digestivos das larvas de *A. diaperinus* alimentadas nas diferentes dietas e foi observadas à presença bandas isoladas em alguns dos tratamentos, como a banda de aproximadamente 15 kDa, revelada na dieta de farinha e ossos (figuras 24A e 24B**).** A zimografia do extrato do intestino médio das larvas de *A. diaperinus* revelou atividade proteolítica para bandas de polipeptídios de aproximadamente de 10 kDa, 15-25 kDa, 35-75 kDa e 75-100 kDa e bandas difusas acima de 100 kDa, observado na parte superior do gel (figura 24B).

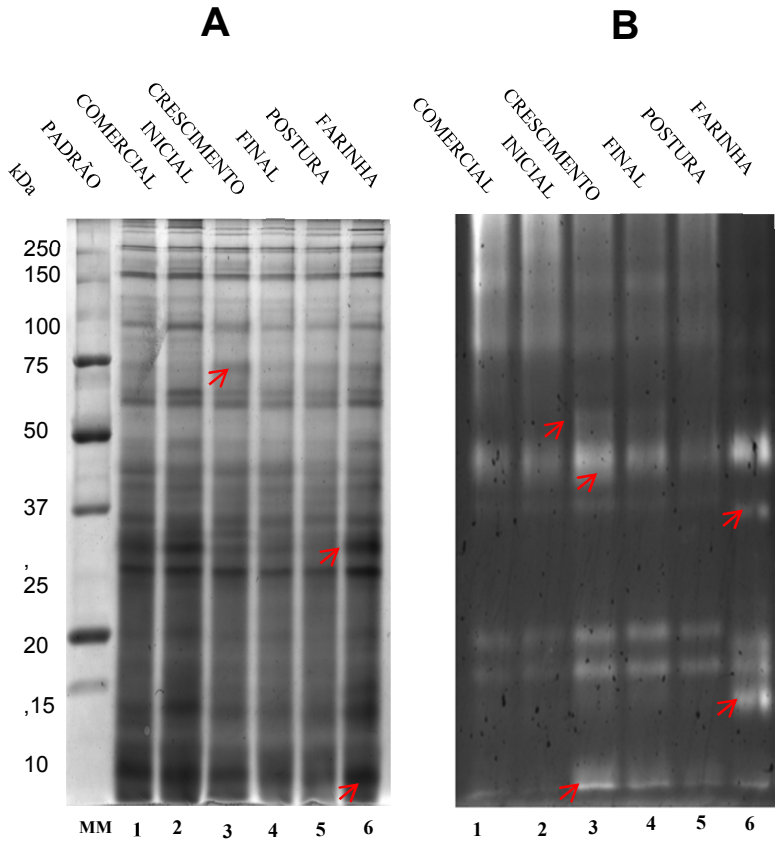


Figura 24: Comparação do perfil das proteínas e da atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* alimentadas em diferentes dietas. A eletroforese foi realizada em gél de acrilamida/bisacrilamida 12% e copolimerizado com gelatina 0,1%, após alimentar-se das diferentes dietas. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 2 horas a 37ºC em tampão citrato/fosfato 0,1M pH 5,6. (A) SDS-PAGE (Linha MM) marcadores de massa molecular; (Linha 1-6) Perfil das proteínas presentes nos homogeneizados dos tratos digestivos referentes diferentes dietas oferecidas às larvas de *A. diaperinus*. (B) Atividade proteolítica do homogeneizados dos tratos digestivos referentes diferentes dietas em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1% como substrato, indicando bandas de polipeptideos com atividade proteolítica (Linha 1-6). O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína/ linha do trato digestivo de larvas. (MM – Massa Molecular em kDa).

Estas proteases de alta massa molecular são consistentes, com observados em larvas de *Costelytra zealandica*, (Coleoptera: Scarabaeidae), em que foram reveladas aminopeptidases com massas moleculares na faixa de 90 kDa à 97 kDa (CHRISTELLER *et al*., 1989), aminopeptidase com massa molecular de 123kDa em larvas de *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) e aminopeptidase em larvas *Spodoptera littoralis* com massa molecular de 116 kDa (LEE e ANSTEE, 1995b).

Em zimografia do extrato do intestino médio das larvas de *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae), foram visualizadas diferentes bandas com atividade proteolítica uma principal com 19 kDa e uma serie difusa de bandas com mais de 97 kDa e outras com massas moleculares de 21 kDa, 23 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 35 kDa, 48 kDa e 50 kDa (ZHANG *et al*., 2011). Em que inibidores específicos de serino proteases como PMSF e TPCK inibiram proteases com massa moleculares 25 kDa, 28 kDa, 48 kDa e 50 kDa e inibidores específicos de cisteíno proteases inibiram ligeiramente proteases com massa moleculares na fixa de 25 kDa, 28 kDa, 35 kDa, 48 kDa e 50 kDa, sugerindo quais as classes de proteases estão presentes no intestino médio de *P. ephippiata* são serino proteases (ZHANG *et al*., 2011). O perfil das proteases do intestino das larvas de *Manestra configurata* (Lepidoptera: Noctudae), alimentadas com diferentes dietas após 96 horas, revelou proteases com massa moleculares de aproximadamente 33 kDa e 55 kDa, quando alimentadas com uma dieta à base de Couve-nabiça (*Brassica napus*). Entretanto não foi notada atividade proteolítica destas proteases quando as larvas foram alimentadas com dieta artificial, porém com a dieta artificial revelou atividades de proteases com massas moleculares de aproximadamente 21 kDa, 30 kDa e 100 kDa (ERLANDSON *et al*., 2010).

Zimografia nos extratos do intestino médio das larvas de *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), foram visualizadas bandas de proteases com massas moleculares de 23 kDa e 24 kDa (ZHU e BAKER, 1999), e análises de espectrometria de massa identificaram proteases tipo tripsina com massa molecular de 24,3 kDa e 24,4 kDa em *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctudae), (MARCHETTI *et al*., 1998). Estudos no intestino médio de adultos de *Locusta migratoria* (Orthoptera) em SDS-PAGE, revelaram tripsinas digestiva com massas moleculares com aproximadamente 23 kDa, 27 kDa e 29 kDa (LAM *et al*., 2000). Ensaios zimográficos revelaram um perfil complexo de serino proteases no intestino médio de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, compostos por pelo menos onze bandas de atividade proteolíticas. Entre essas bandas, três migraram entre 28 kDa a 36 kDa, que é a massa molecular esperada para tripsina monomérica (ISOE *et al*., 2009). Em geral, as massas moleculares de um grande grupo de cisteíno proteases pertencentes ao clã CA, que

variam de 24 kDa a 30 kDa em insetos, no qual incluem as catepsinas e as papaínas, (RAWILINGS e BARRETT, 2004). A massa molecular calculada para catepsina L de *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, é de 36,3 kDa, o que é aproximadamente semelhante com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Haemaphysalis longicornis*, 34,5 kDa e 38 kDa respectivamente (RENARD *et al*., 2000; YAMAJI *et al*., 2009). Cisteíno proteases de *Sphenophorus levis*, (Coleoptera: Curculionidae), é uma protease do tipo Catepsina L com massa molecular de aproximadamente 37 kDa, semelhante ao que se conhece em proteases de catepsinas do tipo L em insetos (SOARES-COSTA *et al*., 2011).

Em seguida avaliamos se os animais mantidos com diferentes dietas teriam o perfil proteico na zimografia afetado pelo pH. Os resultados revelaram bandas proteolíticas com maiores níveis de intensidade e hidrólise do substrato gelatina em pH 5,0, para todas as dietas utilizadas, principalmente as bandas com massas moleculares entre 10 kDa à 30 kDa (figura 25), quando comparado nas analises realizadas em pH 3,0 e 7,5. Similarmente as determinações usando azocaseína como substrato, despontaram pH de atividade ótimo na faixa 5-6 (figura 10). Entretanto, não foi detectada a atividade proteolítica em pH 3,0 (figura 25). Análises semelhantes foram realizadas com os homogeneizados do intestino médio de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfaciatus*, ambas as espécies de bruquídeos demostraram pH ótimo na faixa de 6 a 7, conforme ensaiado por eletroforese parcialmente desnaturante (SILVA *et al*., 2001). Esses resultados apresentaram algumas similaridades com as nossas análises no intestino médio das larvas de *A. diaperinus*, realizadas em pH mais ácidos, em que os extratos digestivos das larvas de *C. maculatus* exibiu atividade muito baixas em pH abaixo de 5,0 e nula em pH 3,0, enquanto *Z. subfasciatus* foram observadas bandas difusas em pH 3,0 e 4,0, e atingindo um pico em pH 5,0 (SILVA *et al*., 2001).

Em larvas de *Lissorhoptrus brevirostris* (Coleoptera: Curculionidae), as análises em zimograma contendo gelatina como substrato, confirmaram a presença de pelo menos três formas de proteases a pH 5,0 que foram inibidas por E-64, inibidor especifico de cisteíno proteases. Além disso, foram reveladas três formas proteolíticas em pH 10, que foram inibidas pelo inibidor de serino proteases PMSF, e quatro bandas proteolíticas em pH 3,0 que, no entanto, não foram inibidas pela pepstatina-A (HERNÁNDEZ *et al*., 2003). Diferentemente ao que foi observado nos resultados obtidos em nossas análises, com trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, no qual a atividade proteolítica não foi determinada em pH 3,0. A maioria das proteases do homogenatos do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* apresentam propriedades ácidas, tais como as cisteíno proteases.

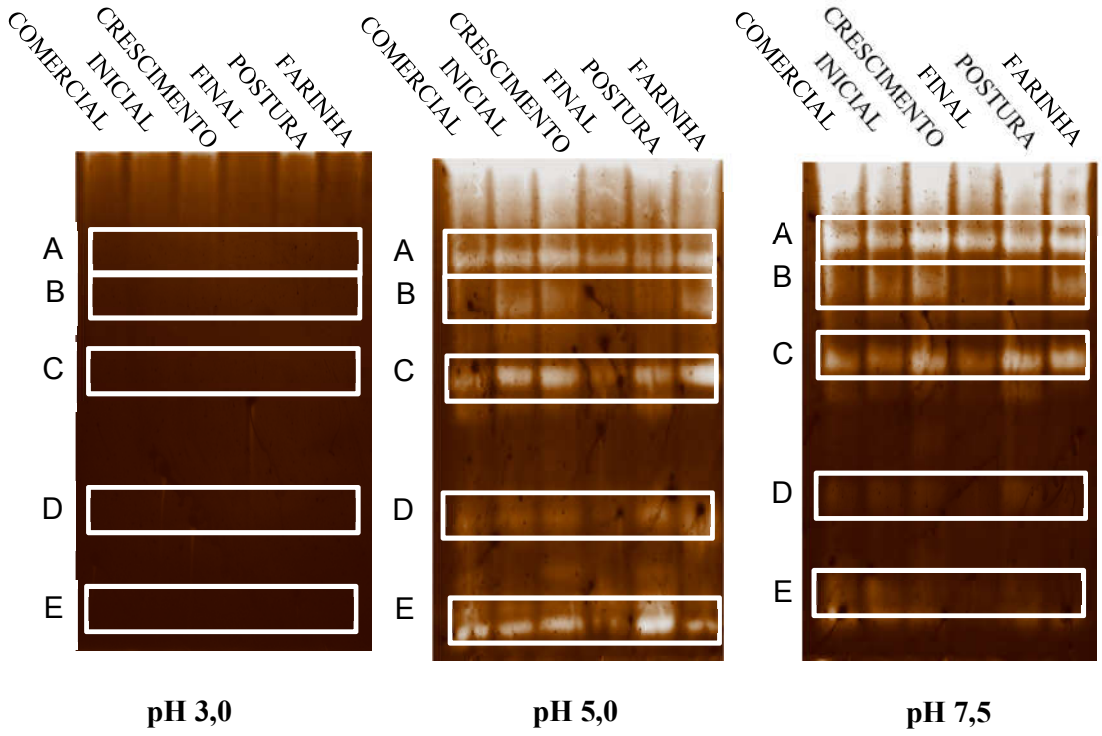


Figura 25. Efeito do pH na hidrólise de gelatina à 0,1% por proteases do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaprinus*. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% copolimerizados com gelatina 0,1%, após alimentar-se das diferentes dietas. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 2 horas a 37ºC em tampão citrato/fosfato pH 3,0 e 5,0, fosfato pH 7,5, 0,1M. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína / linha do trato digestivo de larvas. As caixas de (A – E) representa a presença de atividade proteolítica entre as dietas.

A incubação dos géis com agente redutor DTT proporcionou a ativação da atividade proteolítica, principalmente as bandas de proteases reveladas em massa aparente entre 15 kDa - 40 kDa, dados obtidos em todas as condições analisadas (figura 26). No sentido de avaliar o aumento da atividade na presença do agente redutor DTT , as bandas da zimografia reversa, foram processadas e quantificadas, em que as bandas correspondentes às proteases de intensidade clara e por isso exibindo pixels, em contraste com o fundo do gel escuro foram avaliadas. A área da banda foi selecionada e analisada utilizando software Quantity One, capaz de quantificar a densidade óptica de cada pixel, usando o fundo do gel como escuro.

Desta forma, os valores considerados são diretamente proporcionais ao ganho de atividade proteolítica na presença do ativador proteolítico DTT 2,0 mM, em todas as dietas, principalmente a dieta de farinha de carne e osso, nas linhas C, D e E, e que foram fortemente inibidas por E-64 (figura 19). O ganho de atividade permitiu a análise estatística diretamente com esses valores (figuras 27, 28 e 29) (HAWKES *et al.,* 2010). Entretanto não foi obeservado diferença siginificativa no ganho de atividade proteolítica nas linhas A, B e F (dados não mostrados). Semelhante aos resultados obtidos com as proteases de homogeneizados do intestino médio de *C. maculatus* parece ser cisteíno proteases, porque a incubação do gel de zimograma com inibidor E-64 aboliu a hidrólise da gelatina e a incubação dos géis com DTT 1,5 mM causou ativação da atividade proteolítica e aumento da intensidade das bandas (SILVA *et al*., 2001).

5.6. Atividade proteásica em trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* utilizando substrato sintético específico para cisteíno proteases.

Uma ampla gama de substratos fluorogênicos é empregada para identificação e caracterização de uma série de cisteíno proteases, por exemplos as catepsinas L, V, B, S, K e F, (BROMME *et al*., 2004). No sentido de avaliar a especificidade da atividade proteolítica foi utilizado um substrato sintético Z-Phe-Arg-AMC (Z-P2-P1-Y, (onde Z=benziloxicarbonil; P2= Phe, Trp, Tyr, Leu, Ile, Val e Met; P1= Lys e Arg e Y= 4-amino-7-metillcoumarina (SEMASHKO *et al.,* 2014). A maioria das cisteíno proteases é apontada por forte afinidade por substratos com lisina e arginina na posição um e, em menor grau, para os substratos com resíduos de aminoácidos pequenos e não carregados em P1, como glutamina, treonina e alanina. Na posição P2, os aminoácidos preferidos são os hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr, Leu, Ile, Val e Met) (CHOE *et al*., 2006). Em geral, as cisteíno proteases têm uma especificidade bastante ampla e são capazes de hidrolisar vasta gama de substratos (TURK *et al*., 1998). Foram utilizados extratos brutos do intestino médio de 10 larvas *A. diaperinus*.

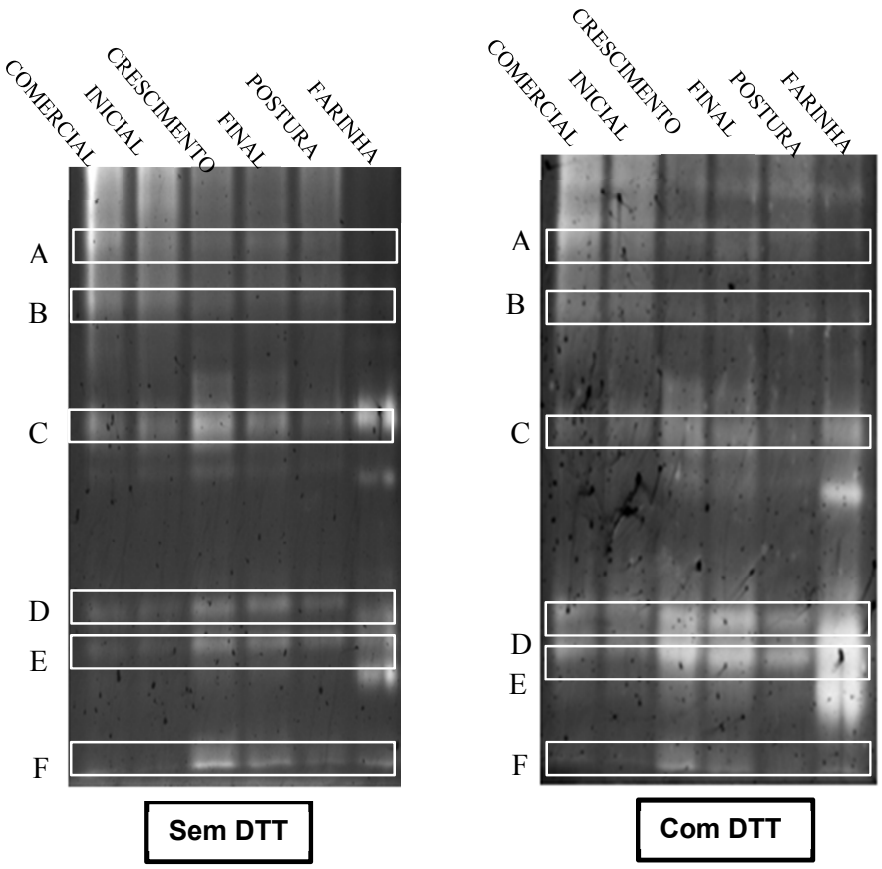


Figura 26: Efeito do agente redutor DTT na atividade de proteases digestivas larvais de *Alphitobius diaprinus*. A eletroforese foi realizada em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% copolimerizados com gelatina 0,1%, após alimentar-se das diferentes dietas (A) sem DTT; (B) com DTT. A atividade proteolítica foi detectada após a incubação dos géis por 2 horas a 37ºC em tampão citrato/fosfato pH 5,6 0,1M. Na ausência e presença de DTT 2 mM. O ensaio proteolítico foi realizado com amostras equivalentes a 15µg de proteína / linha do trato digestivo de larvas. As caixas de (A – E) representa a presença de atividade proteolítica entre as dietas.

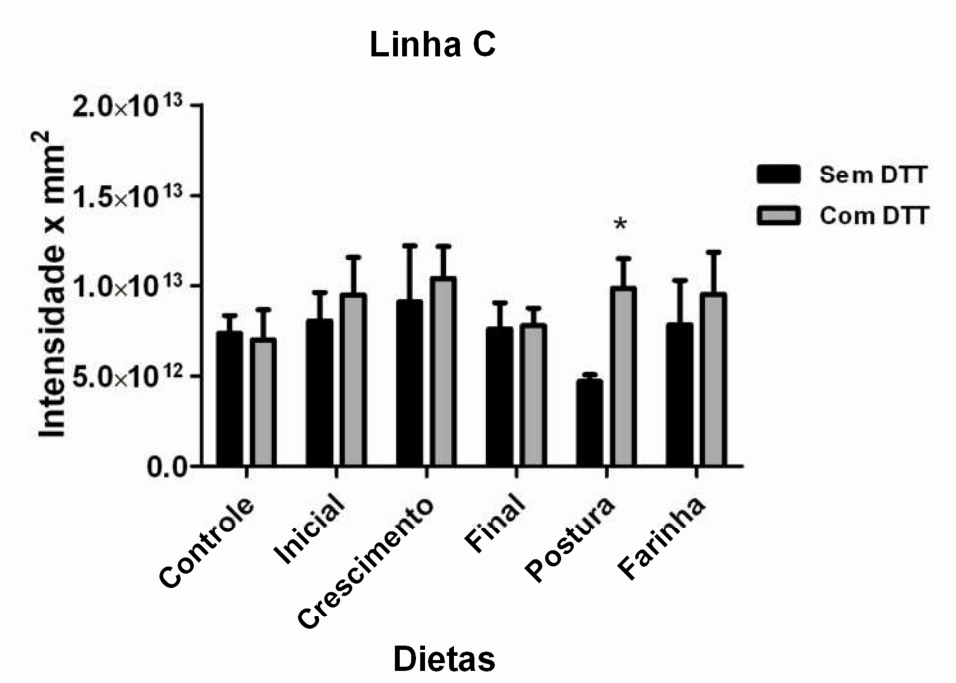


Figura 27: Quantificação da atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *A.diaperinus* (Linha C). Análise em diferentes dietas, com e sem ditiotrietol (DTT) 2 mM com software Quantity One. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p<0,05$*). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

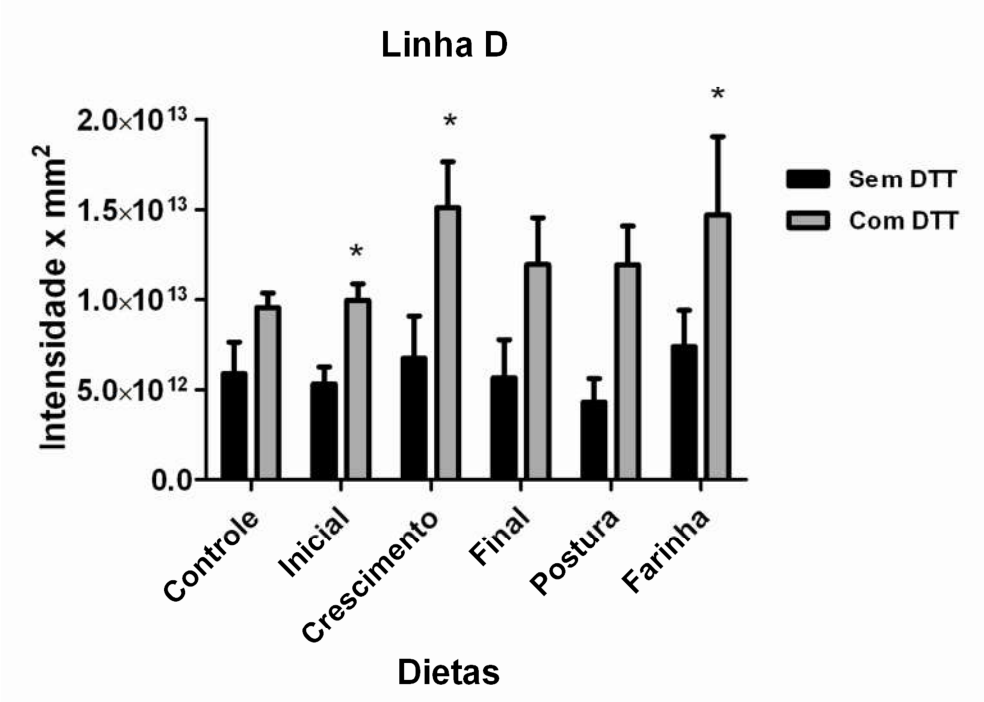


Figura 28: Quantificação da atividade proteolítica do intestino médio das larvas de *A.diaperinus* (Linha D). Análise em diferentes dietas, com e sem ditiotrietol (DTT) 2 mM com software Quantity One. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p<0,05$*). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

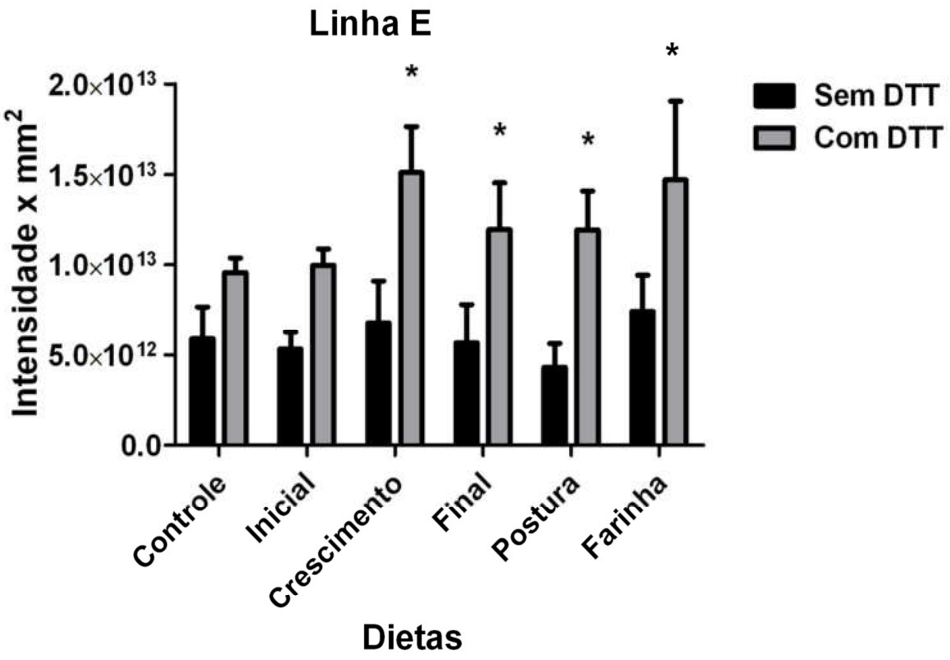


Figura 29: Quantificação da atividade proteolítica do intestino médio das larvas de *A.diaperinus* (Linha E). Análise em diferentes dietas, com e sem ditiotrietol (DTT) 2 mM com software Quantity One**.** Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p<0,05$*). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

Após as larvas alimentar-se em diferentes dietas item (3.14), foram ensaiados quanto à atividade de cisteíno proteases usando substrato sintético Z-Phe-Arg-AMC. Os resultados demonstraram diferentes perfis na atividade proteolítica na hidrólise do substrato, resultando na liberação da molécula de MCA, a qual ao ser excitado no comprimento de onda de 350 nm e emite uma fluorescência no comprimento de onda 440 nm que é detectada pelo fluorimetro. Desta forma o aumento na fluorescência é proporcional a velocidade de reação. Visto que após as análises nos tratos digestivos das larvas de *A. diaperinus*, todas as amostras apresentaram atividade proteolítica, entretanto foi observado maior nível de atividade proteolítica nos tratos digestivos das larvas alimentadas com as dietas da fase final do desenvolvimento de aves de corte e das larvas alimentadas com farinha de carne e osso, 2044 U / mL e 1810 U / mL respectivamente, após 150 segundos de reação (figura 30, Tabela 10). Concordando com os resultados observados quando foi utilizando azocaseína como substrato, onde os extratos digestivos das larvas alimentadas com farinha de carne e osso apresentaram maiores níveis de atividade proteolítica, sugerindo que o aumento na atividade proteolítica pode estar diretamente relacionado à concentração de proteína bruta nas dietas.

Para confirmar a presença de cisteíno proteases nas amostras contendo os tratos digestivos das larvas de *A. diaperinus*. Para reafirmar a presença de cisteíno proteases foi utilizado um inibidor especifico E-64 na concentração 10 μM, em todas as condições o inibidor E-64 foi eficiente na diminuição da hidrolise do substrato Z-Phe-Arg-AMC, em mais de 50% de inibição (figura 30, tabela 10). Estudos descreveram que extratos digestivos do intestino médio das larvas de *Diabrotica vírgifera* (coleoptera: Chyssomelidae), também foram capazes de hidrolisar os substratos Z-phe-arg-AMC, típicos das catepsinas, em que inibidor específico de cisteino proteases E-64 foi responsável por mais de 50 % de inibição para ambos os substratos (BOWN *et al*., 2004a).

Nas análises realizadas em diferentes concentrações de $CaCl_2$, foi possível observar o aumento da atividade proteolítica no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*, frente ao substrato azocaseína, foi de aproximadamente 35%, na concentração 10 mM de $CaCl_2$. Frente a esses resultados verificamos a atividade proteolítica no trato digestivo das larvas *de A. diperinus*, substrato especifico Z-phe-arg-AMC, de cisteíno proteases, para avaliar o efeito do íon cálcio em diferentes concentrações. Entretanto foi possível verificar que a atividade proteolítica das proteases digestivas das larvas de *A. diaperinus* alimentadas com ração comercial para frango de corte, empregada na manutenção da colônia nas análises enzimáticas frente ao substrato Z-phe-arg-AMC não houve diferença significativa entre as concentrações de cálcio testadas (figura 31).

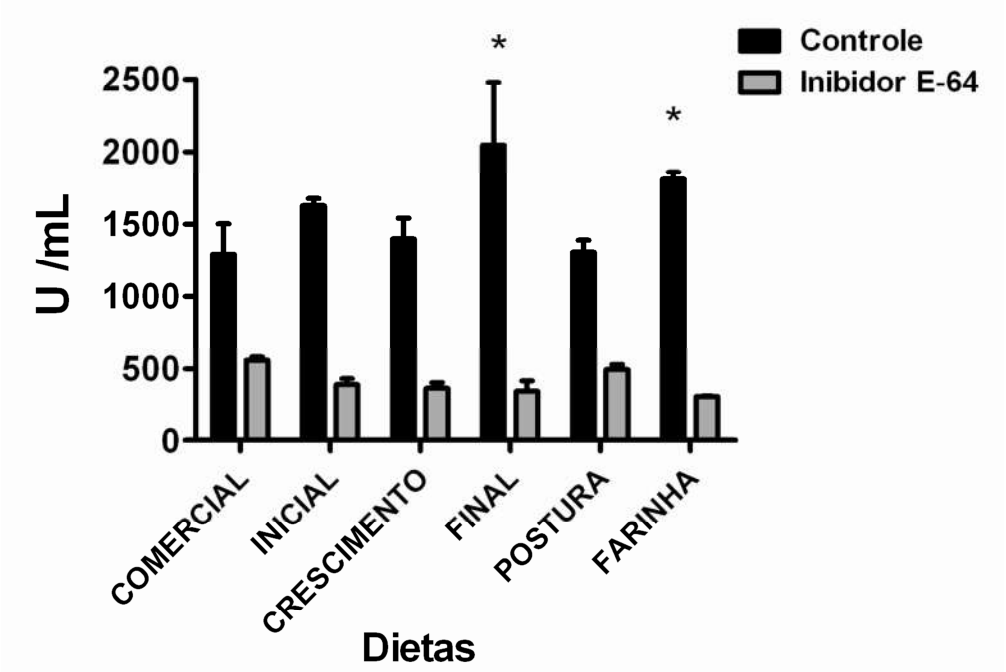


Figura 30: Efeito na atividade de proteases digestivas no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* quando tratadas com diferentes dietas na presença do inibidor E-64, utilizando substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. Perfil da atividade de cisteino proteases presentes no homogeneizado do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* após serem alimentadas com diferentes dietas durante sete dias. dietas (inicial 22,2 % pb; crescimento 22,2 % pb; final 18 % pb; postura 15,6 % pb e farinha 45 % pb) e comercial utilizada como controle 21% pb). Através da utilização do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. Os ensaios com homogeneizado do trato digestivo, foram realizados por incubação em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,6, DTT 2,5 mM, 30 µM do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. A hidrólise do substrato foi monitorada em um fluorímetro Hidex Chameleon em comprimentos de ondas de 350 nm de excitação e 440 nm para emissão de fluorescência. A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (U), em que corresponde µMol de metilculmarina produzida /mL. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey ($p< 0,05$*). As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M). Proteina bruta (pb)

Tabela 10: Hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC por cisteíno proteases do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* quando submetido em diferentes dietas.

DIETAS	Atividade Proteolítica após 150 segundos em U / mL	Atividade Proteolítica após 150 segundos em U / mL (Inibidor E-64)	% relativa de Inibição
CONTROLE	1290 (± 15,3)	556,5 (± 23,4)	57,1
INICIAL	1627 (± 12,2)	387,9 (± 20,7)	76,0
CRESCIMENTO	1396 (± 16,6)	364,4 (± 18,4)	74,0
FINAL	2044 (± 23,7)	342,3 (± 14,3)	83,5
POSTURA	1316 (± 12,5)	493,0 (± 11,2)	62,5
FARINHA DE CARNE E OSSO	1810 (± 11,6)	307,1 (± 8,30)	83,0

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados são expressos em (U) µMol de sulfanilamida produzida por minuto/mL e inibição da atividade enzimática em (%). Análises estatísticas apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam a diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0.05$).

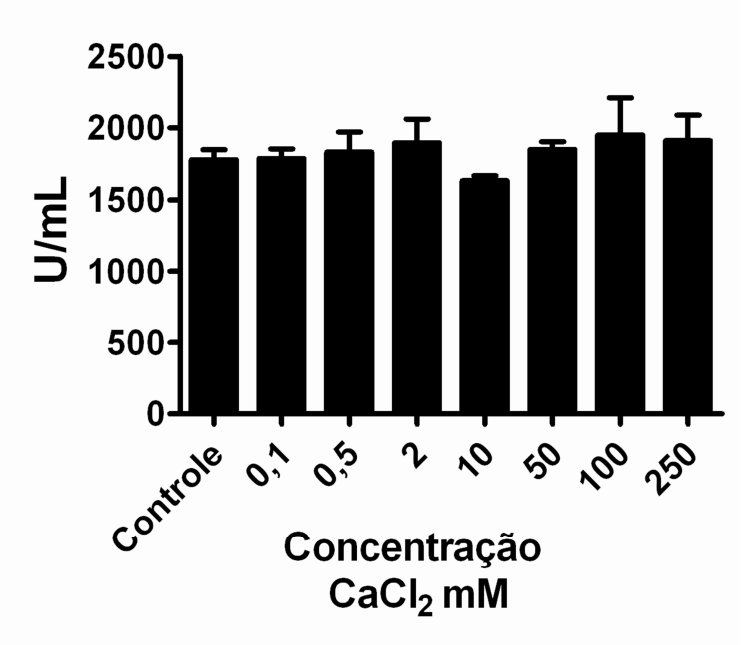


Figura 31: Efeito dos íons de cálcio na atividade proteolítica de cisteíno proteases, do homogeneizado do trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*. Perfil da atividade de proteases presentes no homogeneizado do intestino médio das larvas de *A. diaperinus*, quando submetidas a diferentes concentrações de $CaCl_2$: 0,1, 0,5, 2,0, 10, 50, 100, 250 mM, no controle ausência de $CaCl_2$. Os ensaios com as amostras do trato digestivo foram realizados por incubação em tampão citrato-Fosfato 0,05M, pH 5,6, DTT 2,5 mM, 30 µM do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. A hidrólise do substrato foi monitorada em um fluorímetro Hidex Chameleon em comprimentos de ondas de 350 nm de excitação e 440 nm para emissão de fluorescência. A atividade proteolítica foi quantificada em unidade de atividade (U), em que corresponde µMol de metilculmarina produzida /mL. As análises foram realizadas no mínimo em uma série de três repetições e em triplicata. Testes estatísticos Anova e Tunkey: Não foi observada significância ente os resultados (ns). As barras verticais representam erro padrão (±S.E.M).

Os íons de cálcio são capazes de estabilizar as proteases tipo tripsina minimizando a autólise (VAJDA e GARAI, 1981), como observado em serino proteases do intestino médio das larvas *Antícarsia gemmtalis* (Lepidoptera: Noctudae) (XAVIER *et al.* 2005) e no gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (SILVA *et al*., 2010a). Em cisteíno proteases do intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* a elevação na concentração dos íons de Ca^{2+} entre 5 mM e 10 mM, foram responsáveis pelo aumento da atividade proteolítica (MENDONÇA *et al*., 2012). Resultado semelhante foi observado em cisteino protease do intestino de adultos do gorgulho do milho *S. zeamais* (SILVA *et al*., 2010b). Semelhança entre o centro ativo de serino e cisteino proteases, sugere a existência de sítios de ligações de cálcio em cisteíno proteases (MENDONÇA *et al*., 2012).

5.7. Identificação de proteínas do gel SDS-PAGE através de análise por LC-MS (Q-TOF).

Uma estratégia sequencial foi utilizada para identificar as principais proteínas intestinais das larvas de *A. diaperinus*. Essas proteínas foram extraídas e separadas do intestino das larvas de *A. diaperinus* por SDS-PAGE, corroboraram para revelar o perfil proteico das enzimas digestivas das larvas de *A.diaperinus*, juntamente com nano-HPLC 2D e ESI-MS/MS em uma abordagem proteômica. As proteínas retidas nos diferentes spots foram cortadas horizontalmente em fragmentos de gel (figura 32), com tamanho semelhante e foi tripsinizado e submetida à separação por nano-HPLC. Os picos foram analisados por ESI-MS/MS e filtrados por marcadores de proteínas Mascot. Na abordagem de digestão em solução, mais de 300 peptídeos foram gerados (todos os oito spots), resultando na identificação de diferentes proteases digestivas de acordo com seu índice de proteína, identificadas como uma combinação de sequências conhecidas em bancos de dados existentes (Tabela 11). A identificação das proteínas foi realizada usando o software Mascot 2.2 (www.matrixscience.com) e NCBI_blastp utilizando os espectros MS/MS obtidos de peptídeos trípticos e capazes de identificar diferentes classes de proteases. Confirmando analogia do perfil das enzimas digestivas do próprio *A. diaperinus*, com outras espécies de coleópteras intimamente relacionadas como *T. castaneum* e *T. molitor* Para ampliarem nossas pesquisas, os espectros de massa em linha foram interpretados novamente e as sequências peptídicas obtidas foram usadas para buscas na mesma base de dados usando o programa NCBI_blastp.

.

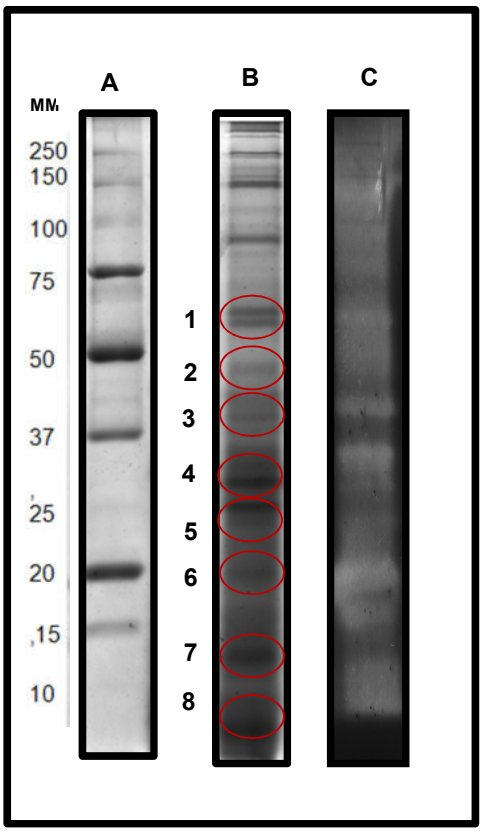


Figura 32: Separação de proteínas de *Alphitobius diaperinus*, trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus* em SDS-PAGE. (A) M marcadores de tamanho (MM – kDa), (B) Perfil proteico do trato digestivo em SDS-PAGE corado com Coomassie Blue com pontos numerados escolhidos para análise em espectrometria de massa. (B) 25 µg de proteína do extrato bruto intestino médio larvas de *A. diaperinus*; (C) Zimograma, atividade proteásica do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*.

Tais correspondências não são muito tolerantes à substituição de aminoácidos, e assim os peptídeos responsáveis por esses acertos devem apresentar homologia nessas espécies (PAUCHET *et al*., 2009). Quando as sequências de aminoácidos foram novamente estimadas a partir dos peptídeos e estas sequências foram utilizadas como consultas para pesquisas NCBI_blastp, foram encontradas correspondências adicionais, por vezes nas mesmas proteínas já identificadas, entretanto foi mais frequente em espécies distantemente relacionadas, aumentando o número de identificações para 11 (Tabela 11). Numerosas proteases são transcritas durante as fases de alimentação larval e na fase adulta destes insetos, a maioria destas proteases pertence à serino proteases (quimotripsinas, tripsinas) e cisteíno proteases (catepsinas B e L) famílias de proteases que são comuns em Coleopteras (EDWARDS *et al*., 2010). Combinado com os dados bioquímicos anteriores do intestino dos tenebrionídeos, podemos identificar vias de proteínas envolvidas no processo biológico como digestão. Pesquisando os conjuntos de dados EST de coleópteros pelo BLAST (NCBI blastp e eegNOG), foram encontrados homólogos da proteína *A. diaperinus* em várias espécies, incluindo coleópteros (*T, castaneum, T, molitor e O. Borbonicus*), Diptera: (*D. melanogaster*), Lepidoptera (*S. frugiperda e Bombyx mori*), Boophilus (*R. microplus*), Hemiptera (*Dysdercus peruvianus*). Os resultados da busca na base de dados foram considerados positivos quando se obteve um escore de identidade proteica de 25 e 23 *T. castaneum* e *O. borbonicus*, respectivamente, maior que o limiar de confiança de 95%. Dentre as proteínas encontradas nas análises LC-MS (Q-TOF), podemos destacar fragmento de peptídeos correspondente a serino proteases do tipo tripsina, RLDDKISAVPRV nas análises realizada na banda correspondente ao spot 3, com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, após ser tripsinizado e submetida à separação por nano-HPLC (figura 32).

Esse resultado era esperado uma vez que em nossas análises foi observada inibição da atividade proteolítica na presença dos inibidores específicos de serino proteases PMSF, aprotinina, SBTI e TLCK em pH alcalino (figuras 16, 17 e 18). Além disso, a presença do PMSF inibiu a atividade proteolítica em zimograma, utilizando gelatina 0,1% como substrato, diminuindo a intensidade das bandas com massas moleculares com aproximadamente 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa e 40 kDa, em pH 7,4 (figura 20). Resultados semelhantes foram observados no intestino médio das larvas de *Tenebrio molitor*, onde atividade semelhante à tripsina e quimotripsina foi predominante no intestino posterior em pH mais alcalino, pois essas diferenças no pH do intestino médio estão relacionadas a diferentes complementos de proteases digestivas (VINOKUROV *et al*., 2006a). Comparando potenciais de proteases digestivas em larvas de *A. diaperinus* com aquelas presentes em outros insetos, encontramos

dois fragmentos de peptídeos relacionados à cisteíno proteases C1 do tipo catepsina, RVKGSVLDLNGRL e NIGVFEWKF, na análise realizada na banda correspondente ao spot 1 e 4, com massa molecular de aproximadamente 60 kDa e 30 kDa respectivamente apos tripisinização (figura 32, Tabela 11). Estes resultados consistem com uma tendência observada em alguns besouros em relação a outros insetos, uma mudança para um intestino mais ácido, propício para a atividade de cisteíno proteases. Em tenebrionidaes, as catepsinas B e L, fazem parte do complexo da peptidase digestiva na larva intestinal (VINOKUROV *et al.,* 2006b). Genes da cisteíno protease C1 do *Tribolium castaneum* codificam as catepsinas B e L. A maioria das peptidases do tipo catepsina B não possuem resíduos conservados em regiões funcionais e, portanto, podem não ter atividade de peptidase, enquanto a maioria dos genes de peptidase do tipo catepsina L de *T. castaneum*, codificam enzimas potencialmente funcionais (TRIBOLIUM GENOME, 2008). As exopeptidases desempenham um papel importante na digestão de proteínas, uma vez que os peptídeos e as proteínas têm que ser convertidos em dipeptídeos ou aminoácidos únicos para serem absorvidos eficientemente pelo intestino (BAYÉS *et al*., 2003). Em nossas análises espectrométricas foram identificadas diferentes tipos de exopeptidases presentes no trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Vistos após tripisinização dos spots 1 e 3, identificamos nos bancos de dados fragmentos de peptídeos homólogos a fragmentos presentes em aminopeptidases de *Drosophila melanogaster e tribolum castaneum*. Segundo LI e colaboradores (2008), foram detectados duas aminopeptidases no transcriptoma do intestino médio das larvas *D. melanogaster*. As aminopeptidases identificadas foram leucil aminopeptidase (EC 3.4.11.1) e aminopeptidase P (EC 3.4.11.9). Ambas as enzimas pertencem a diferentes classes da aminopeptidase N.

Sequência de amino ácidos da principal leucil aminopeptidase isolada do intestino médio das larvas de *M. funereus* , apresentaram uma alta similaridade com todos os peptídeos internos obtidos da análise ESI MS / MS, quando comparada a outras aminopeptidases de coleopteras. Observou-se alta similaridade na sequência peptídica com as sequências de aminopeptidase de *T. castaneum* e *T. molitor* (BOZIC *et al*., 2008). As aminopeptidases são representadas por um espectro extraordinariamente amplo de enzimas e exibem massas moleculares variando de 53 a 140 kDa (TAYLOR, 1993). Vários estudos relataram atividade proteolítica de aminopeptidase encontradas em frações solúveis e ligadas à membrana de intestinos de diferentes espécies de Coleoptera (BAKER e WOO, 1981; CHRISTELLER *et al*., 1989; OSUALA *et al*., 1994; CRISTOFOLETTI e TERRA, 1999; WAGNER *et al*. ., 2002). Metaloproteases foram identificadas em algumas espécies de insetos usando EDTA como um quelante de íons metálicos. Por exemplo, na caracterização da atividade proteolítica

no sistema digestivo de larvas *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Crambidae) mostrou a presença de proteases de diferentes classes mecanísticas para a digestão de proteínas, com metaloproteases como forma dominante, inibida por EDTA (MAHDAVI *et al*., 2013). Em nossos estudos, foi observada a presença de diferentes metaloproteases, identificada após análises em espectrometria de massa dos fragmentos de peptídeos R.EQSVDADTSLAVLK.R e RIGFNLLK, gerados pela digestão triplitica do spot 2, com massa molecular na faixa de 50 kDa - 60 kDa retirado do gel de poliacrilamida 12%.

O valor e-value nos indica o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de score iguais ou melhores que o encontrado por acaso, dado o tamanho do banco de dados. O valor e-value de um hit para um dado score que corresponde à probabilidade de se obter, sequência aleatória de mesmo tamanho e outro alinhamento com score igual ou superior. Desta forma, quanto mais próximo de zero for o e-value, mais confiável será a consulta (SOUZA e LIFSCHITZ, 2007) (Tabela 11). O advento da ionização por eletrospray (ESI) (WHITEHOUSE *et al*., 1985) e da desorção/ionização por matriz assistida a laser (MALDI) (KARAS e HILLENKAMP, 1988) possibilitaram a análise de biomoléculas grandes em base rotineira pela primeira vez. A incorporação de abordagens proteômicas facilitou muito nossos estudos de proteínas intestinais em larvas de coleópteros. As peptidases têm funções importantes em todos os sistemas. Incluem exopeptidases, tais aminopeptidases e carboxipeptidases, também referidas como proteases, que são agrupadas como serino, cisteíno, metalo- ou aspárticas definidas pelo sítio ativo e mecanismo catalítico (NEURATH, 1984).

Muitos insetos possuem cisteíno proteases (Catepsinas B, H, L, M, N, S e T) que são ativas principalmente como proteases intracelulares (CHO *et al*., 1999). Em coleópteros, através de abordagens proteômica, foram encontradas no epitélio do intestino médio em *Callosobruchus maculatus* proteases tipo catepsina B e aminopeptidase N de membrana (NOGUEIRA *et al*., 2012). Cisteíno proteases, como a catepsina L, e as serino proteases, tais como tripsinas e quimotripsinas, são importantes enzimas digestivas em *T. castaneum* e *T. molitor* (ELPIDINA *et al*., 2007). Em larvas de *T. castaneum*, 80% da atividade proteolítica total é encontrada no intestino anterior, e 97% da atividade é devida a cisteíno proteases (VINOKUROV *et al*., 2009). Sob condições dietéticas normais, as larvas de *T. castaneum* usam principalmente cisteíno proteases para a digestão de proteínas (OPPERT *et al*., 2003). No entanto, quando desafiados com inibidores de cisteíno proteases, as larvas respondem com o aumento na atividade proteolítica de serino proteases (OPPERT *et al*., 2005).

Tabela 11. Identificação pelo Mascot de proteases no intestino médio em larvas de *Alphitobius diaperinus* separadas por SDS-PAGE, digestão por tripsinização e análise por LC-MS (Q-TOF).

Spot	Descrição	Banco de dados	Organismo	Proteina	MM	E - value	aa	Peptideos	Mascot score	Max score blastp	Alinhamento Local
1	Catepsina	eggnog	*Tribolium castaneum*	ENOG410356S	84387	-	-	R.VKGSVLDLNGR.L	9	-	-
1	Aminopeptidase	D.melanogaster_Uniprot	*Drosophila melanogaster*	EDX13822.1	107009	0.009	948	K.GATFIRMIK.H	18	39.7	100%
2	Peptidase	O. borbonicus _Uniprot	*Oryctes borbonicus*	KRT79135.1	53616	0.009	463	K.GMIYNLKTK.E	*23	39.7	100%
2	Dipeptidase	D.melanogaster_Uniprot	*Drosophila melanogaster*	NP_650192.1	55237	*0.024	491	R.IEDDVLITK.T	20	38.4	100%
2	Metaloprotease	R. microplus_Uniprot	*Rhipicephalus microplus*	AAZ39658.1	55753	*1 $^{e-6}$	493	R.EQSVDADTSLAVLK.R	24	54.5	100%
2	Metaloprotease	eggnog	*Dysdercus peruvianus*	ENOG410343H	757701	-	-	R.IGFNLLK.-	16	-	-
3	Aminopeptidase	T_Castaneum_Uniprot	*Tribolium castaneum*	XP_008200957.1	114079	*0.034	979	K.VLDQNVTIK.E	*25	38.0	100%
3	Tripsina	O.borbonicus_Uniprot	*Oryctes. borbonicus*	KRT85123,1	45202	*0.004	407	R.LDDKISAVPR.V	19	40.5	100%
4	Catepsina b	eggnog	*Tribolium castaneum*	ENOG41033X3	35032	-	-	NIGVFEWK.F	8	-	-
6	Peptidase	eggNOG	*Spodoptera frugiperda*	ENOG41033XW	36970	-	-	K.TTDSPLSPFSSIR.R	13	-	-
6	Dipeptidase	B. mori_Uniprot	*Bombyx mori*	XP_021208649.1	13669	*0.047	342	R.NVPDTILR.M	15	37.1	100%

Descrição: Número de entrada das proteínas classificadas pelo Mascot, utilizando banco de dados personalizado; Número de acesso à proteína NCBI. MM (massa molecular) em kDa, preditos a partir da sequência fasta NCBI por blastp. Número de aminoácidos da proteína (aa). * Significância de 95% ($p < 0,05$).

Pelo menos 20 diferentes atividades de peptidases foram relatadas no intestino larval de *T. molitor*: quatro aminopeptidases, duas carboxipeptidases, seis cisteíno proteases, e as demais serino proteases (TERRA e CRISTOFOLETTI, 1996; CRISTOFOLETTI *et al*., 2005; ELPIDINA *et al*., 2005 TSYBINA *et al*., 2005). Inicialmente estudos realizados em larvas *Oemona hirta* (Coleoptera: Cerambycidae), descrevem a presença da atividade proteolítica de tripsina, quimotripsina e aminopeptidase. Entretanto os percentuais de atividade proteolítica se apresentaram muito baixas no intestino posterior em comparação com as altas taxas encontradas no intestino médio. Além disso, foram encontrados baixos níveis de atividade proteolítica de carboxipeptidase A e dipeptidases no intestino médio de suas larvas (SHAW *et al*., 2009). Devido às condições ácidas do intestino médio, em muitos coleópteros, como as larvas das lagartas da raiz do milho ocidental *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chysomelidae), a digestão de proteínas é realizada principalmente por cisteíno proteases. Contudo no intestino médio destes insetos foram identificadas atividades proteolíticas de aminopeptidases. Por conseguinte, sob condições ácidas, a atividade destas proteases foram inferiores em comparação com as condições alcalinas (KAISER-ALEXNAT, 2009).

No sistema digestivo de insetos as aminopeptidases desempenham um papel dominante na fase intermediária e terminal da digestão de proteínas ao hidrolisar oligopeptídeos parcialmente digeridos para facilmente difundir os produtos (LOMATE *et al*., 2010). Estas enzimas têm temperaturas e pHs ótimos variáveis e requerem cátions divalentes (LOMATE *et al*., 2010). Em insetos essas enzimas são geralmente mais ativas do que as carboxipeptidases (TERRA E FERREIRA, 1994). Na classe insecta, as aminopeptidases foram encontradas no intestino médio de representantes das ordens de Coleoptera (OSUALA *et al*., 1994). A ocorrência de apenas endopeptidases no sistema digestivo de insetos não completaria a hidrólise de proteínas ingeridas para pequenos peptídeos e aminoácidos. Exopeptidases como metalocarboxipeptidases devem desempenhar um papel importante na digestão de proteínas e afetar a degradação de produtos de endoproteólise (BAYES *et al*., 2003).

O programa Blast2Go (CONESA *et al*., 2005) foi utilizado para atribuir grupos funcionais por termos de ontologia gênica (GO), termos InterPro (InterProScan, EBI) e códigos de classificação enzimática (EC) nas proteínas obtidas no meio do intestino médio das larvas de *A. diaperinus* (figura 33). Segundo a categorização do GO, os grupos mais abundantes foram "intracelular", ¨parte intracelular¨, "organela intracelular", "organela delimitada por membrana" e "componente intrínseco da membrana", dentro da superclasse "Componente celular"; "Atividade hidrolásica", "atividade catalítica, atuando sobre uma proteína", "ligação

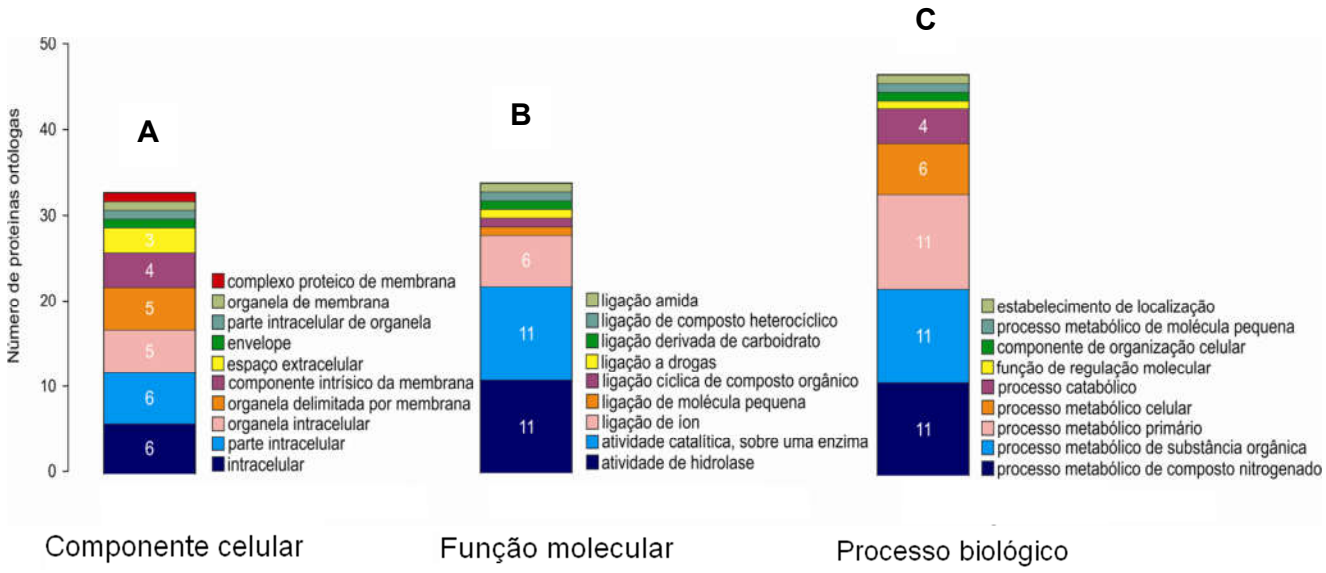


Figura 33. Análise de ontologia genética (GO) nível 3. As proteínas identificadas no trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*, depois de alimentados com a dieta comercial, foram classificadas em três categorias principais de ontologia de genes. (A) Componente celular; (B) Funções moleculares; (C) Processos biológicos.

iônica", dentro da superclasse "Função molecular"; e "processo metabólico composto de nitrogênio" e "processo metabólico de substância orgânica", "processo metabólico primário", "processo metabólico celular", dentro da superclasse "Função molecular"

5.8. Efeito inibitório de imidazolonas sobre atividade proteásica no trato digestivo das larvas de *A. Diaperinus*.

As moléculas descritas são das classes de imidazolonas e foram sintetizadas a partir das tirfostinas, atuam como inibidoras de cisteino proteases. A presença do grupo α,β insaturado e essenciais para a atividade desta série funcionando como um aceptor de Michael para a formação de ligação covalente entre o ligante e a enzima alvo. Os substuintes em R1, no anel aromático ligado ao benzilideno, foram escolhidos de modo a se variar as propriedades fisico-químicas dos compostos e também a modular a reatividade sobre a dupla ligação (figura 34). Foram realizadas análises com os inibidores de cisteíno proteases imidazolonas, sobre atividade proteolítica no intestino médio das larvas de *A. diaperinus*. Os resultados demonstraram que todos os compostos de imidazolonas utilizados nos experimentos apresentaram diferentes níveis de inibição, quando comparado ao controle com DMSO (Figura 35). O inibidor E-64 foi diluído em DMSO e utilizado como controle positivo para assegurar a eficiência da metodologia. Os compostos LDQM 87, 88, e 85, apresentaram maiores níveis de inibição, 71%, 68% e 67%, respectivamente, quando comparado ao controle com DMSO. O composto com menor potencial inibitório foi LDQM 84, apresentou 40%, entretanto uma inibição significativa quando comparado ao controle (Tabela 12).

Em relação ao composto LDQM 87 que proporcionou maior coeficiente de inibição da atividade proteolitica. Pode ser dada ao caracter eletrônico dos grupos adicionados ao anel aromático vizinho ao benzilideno, neste caso a presença do grupo nitro. Esse grupo acionado tem como característica possuir um forte caracter retirador de elétrons do sistema por indução e ressonância contribuindo para uma maior deficiência de elétrons no carbono benzilidênico, o que aumenta a sua reatividade frente a um ataque nucleofílico (MARCH, 1992). O mesmo pode ser observado no composto LDQM 85, entretanto o grupo cloro é um fraco retirador de elétrons do sistema de indução, contribuindo com menor eficiência inibitória (MARCH, 1992). A presença de um grupo espaçador no residuo do grupamento amina do composto LDQM 88, e consequentemente maior liberdade conformacioanal sobre a atividade da imidazolona, sugerindo como uma das explicações viáveis para seu potencial inibitório. As moléculas de imidazolonas apresentaram resultados semelhantes utilizadas como inibidores de deubiquitinases e apresentaram atividade biológica frente a diferentes linhagens de células

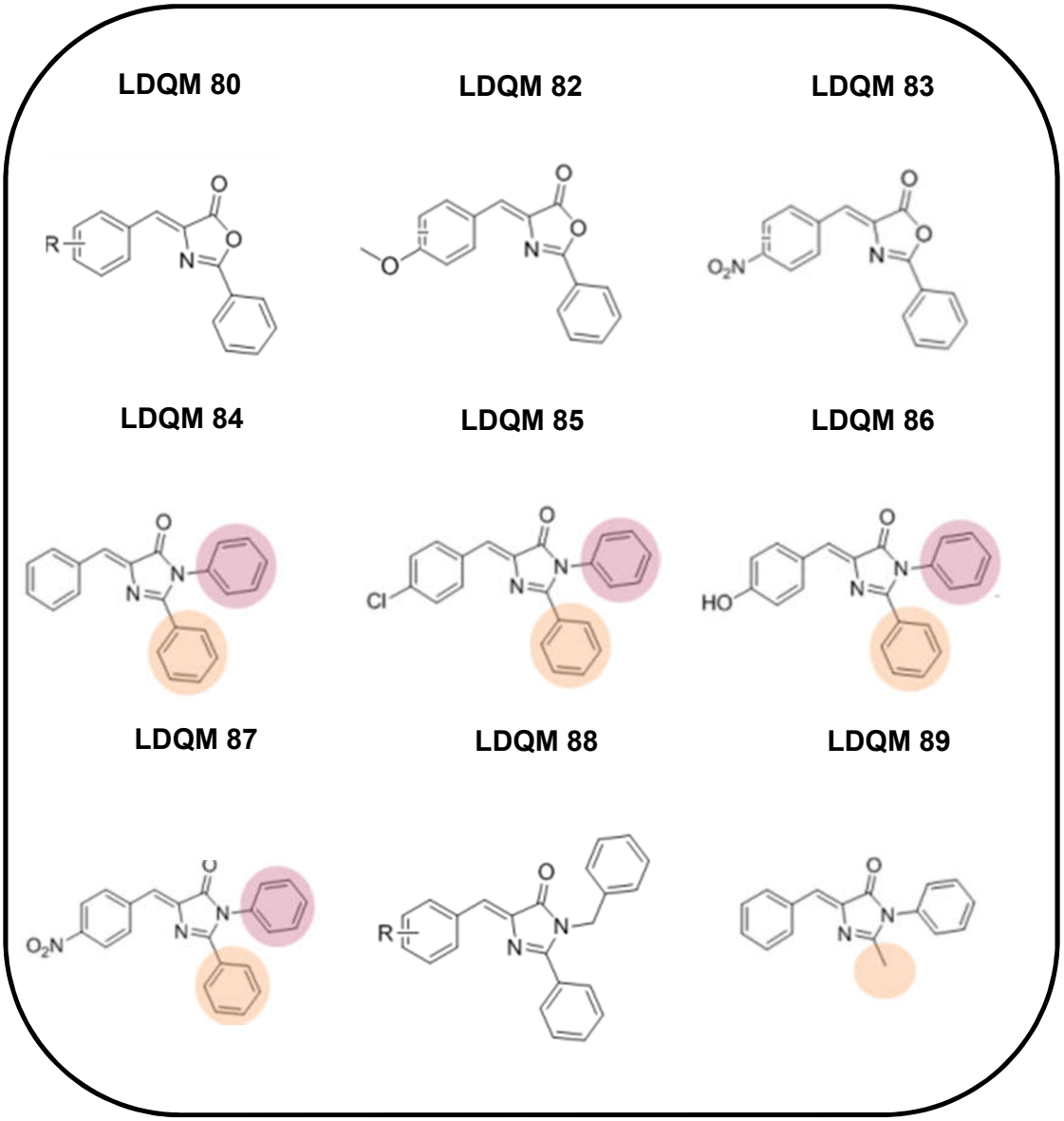


Figura 34: Estruturas das imidazolonas selecionadas para avaliação de atividade inibitória em cisteino proteases do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus*. Em destaque as diferenças entre as séries, em rosa, destaca-se a diferença pela adição de grupo espaçador, em laranja, a diferença de volume das séries (AZEVEDO *et al*., 2019).

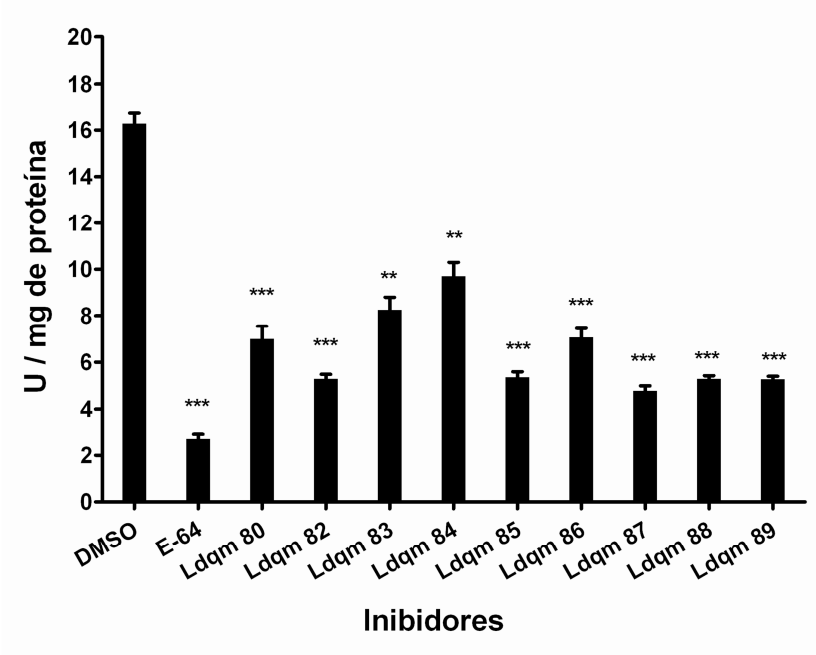
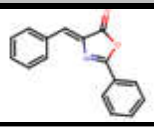
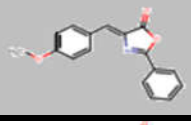
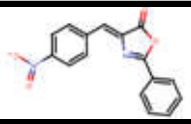
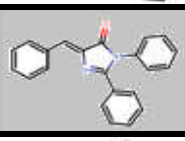
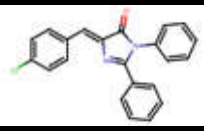
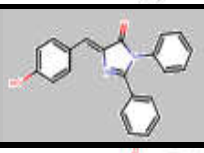
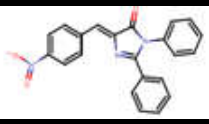
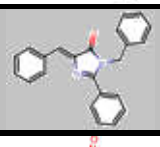
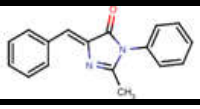


Figura 35: Efeito de inibidores sintéticos sobre a atividade proteolítica no homogeneizado do intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus*. Atividade proteolítica na presença dos inibidores de cisteíno proteases, Ldqm 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 e 89 na concentração de 100 µM em 30 µl de amostra. A reação foi disparada após adicionar 50 µl de azocaseína 1% como substrato, diluída em tampão citrato/fosfato pH 5,6 0,1 M, 0,15 M NaCl em uma concentração final de 0,4 µg/µl de proteína. A hidrólise do substrato foi monitorada durante 30 minutos a 37 ^{0}C. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína, quantidade em µMol de sulfanilamida formado por minuto/mg de proteína. Como controle foi utilizado DMSO 1%, controle positivo foi utilizado E-64 10 µM. Testes estatísticos Anova e Tunkey, ($p< 0,01$**), ($p<0,001$***). As barras verticais representa erro padrão (±S.E.M).

Tabela 12: Efeito de inibidores sintéticos sobre atividade proteolítica de cisteíno proteases presentes no intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus.*

INIBIDORES	CONCENTRAÇÃO	ESTRUTURA INIBIDORES	MASSA MOLECULAR kDa	INIBIÇÃO EM % PH 5,6
CONTROLE	_	_		0
E-64	10 µM	_		*83
LDQM 80	100 µM		249,26	*57
LDQM 82	100 µM		279,29	*67
LDQM 83	100 µM		294,26	*49
LDQM 84	100 µM		324,38	*40
LDQM 85	100 µM		358,82	*67
LDQM 86	100 µM		340,47	*57
LDQM 87	100 µM		369,37	*71
LDQM 88	100 µM		338,40	*68
LDQM 89	100 µM		362,31	*68

Todos os valores são as médias de pelo menos três ensaios separados em triplicata. Os resultados referentes ao efeito dos inibidores proteolíticos estão expressos em percentagem de inibição para cada tratamento. Dados apresentaram normalidade entre as médias. *Indicam a diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0.05$).

leucêmicas. As deubiquitinases são enzimas que possuem papel importante na regulação do sistema ubiquitina-proteínas intracelulares. Estas enzimas são cisteíno proteases, ou seja, atuam na clivagem de ligações peptídicas através de um resíduo de cisteína presente no sítio catalítico desta enzima (AZEVEDO *et al* 2019).

6. CONCLUSÕES.

Os resultados deste estudo mostraram que larvas e adultos de *Alphitobius daiperinus* exibiram diferentes tipos de proteases nos extratos do intestino médio, indicando a adaptação deste inseto quando submetido a diferentes tipos de dietas.

Mudanças na atividade proteolítica devido à alimentação indicam uma correlação entre atividade proteolítica digestiva e composição dos nutrientes das várias dietas.

Este estudo indica que as dietas com maiores concentrações de proteína bruta em sua constituição, influenciaram positivamente na atividade proteolítica das proteases digestivas presentes no extrato do intestino médio das larvas de *Alphitobius diaperinus*.

Embora, foi observada atividade proteolítica de serino e cisteíno proteases, as cisteíno proteases foram às proteases mais ativas no intestino médio de *A. diaperinus* sendo identificada cisteíno proteases tipo catepsinas, sugerindo como principal endoproteases do sistema digestivo.

7. PERSPECTIVAS.

Após observar o comportamento no processo digestivo do *Alphitobius diaperinus*, quando submetidos em diferentes dietas, pode-se estabelecer no programa de manejo de pragas quais os períodos mais suscetíveis à infestação e proliferação do inseto no sistema de produção de aves;

O conhecimento prévio das principais proteases responsáveis pelo processo digestivo, em estudos posteriores, pode ser utilizado como alvo principal no controle biológico do *Alphitbius diaperinus*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; SALEEMUDDIN, M.; SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of army worm, Spodoptera litura. **Insect Biochemistry**, v. 10, n. 6, p. 667–673, 1980.

AHMEDANI, M. S.; HAQUE, M. I.; AFZAL, S. N.; ASLAM, M.; NAZ, S. Varietal changes in nutritional composition of wheat kernel (Triticum aestivum L.) caused by khapra beetle infestation. **Pak. J. Bot.** 41 (3), pp: 1511-1519. 2009.

ALARCÓN F. J.; MARTÍNEZ, T. F.; BARRANCO, P. 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.

ALBRECHT, J.; TALBOT, M.; KIMELBERG, H. K.; ASCHNER, M. The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride-induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. **Brain Research**, v. 607, n. 1, p. 249–254, 1993.

ALFONSO-RUBÍ, J.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P.; CARBONERO, P.; DÍAZ, I. Transgenic Expression of Trypsin Inhibitor CMe from Barley in Indica and Japonica Rice, Confers Resistance to the Rice Weevil Sitophilus Oryzae. **Transgenic Research**, v. 12, n. 1, p. 23–31, 2003.

AMARAL, P. F. G. Novas adequações avícolas sugeridas pelo Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Umuarama**, Informativo Técnico, 8. ed. Agro Industrial Parati Ltda, 4 p, 2010.

ARENDS, J. J. Control, management of the litter beetle. **Poult. Dig.**, p. 172–176, 1987.

AXTELL, R. C. Poultry Integrated Pest Management: Status and Future. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 4, n. 1, p. 53–73, 1999.

AZEVEDO, L. L. DE. Síntese e avaliação farmacológica de novas imidazolonas planejadas como inibidoras de cisteíno proteases para o tratamento da leucemia. , 2013. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/handle/jspui/2747>. Acesso em: 22/8/2019.

BAKER, B. R.; HURLBUT, J. A. Irreversible enzyme inhibitors. CXIV. Proteolytic enzymes. 4. Additional active-site-directed irreversible inhibitors of .alpha.-chymotrypsin derived from phenoxyacetamides bearing a terminal sulfonyl fluoride. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 241–245, 1968.

BAKER, J. E.; WOO, S. M. Properties and specificities of a digestive aminopeptidase from larvae of Attagenus megatoma (Coleoptera: dermestidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 189–193, 1981.

BAKER, J. E.; WOO, S. M.; MULLEN, M. A. Distribution of proteinases and carbohydrases in the midgut of larvae of the sweetpotato weevil Cylas formicarius elegantulus and response of proteinases to inhibitors from sweet potato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 36, n. 2, p. 97–105, 1984.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases: Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. In: **Methods in Enzymology**. (ed. BARRETT AJ). **Academic Press**, San Diego. 244: p.1-15, 1994.

BARRETT. A. J**.;** Proteolytic enzyme: nomenclature and classification. In BEYNON, R., BONDE, J. S. Proteolytic enzyme: a practical approach (2ª ed**)**. **Oxford University Press,** Oxford, 1-21, 2001.

BARRETT, A. J.; WOESSNER, J. F.; RAWLINGS, N. D. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier, 2012.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sôbre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae): IV. parte: o complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 3–4, p. 517–583, 1954.

BAYÉS, A.; SONNENSCHEIN, A.; DAURA, X.; VENDRELL, J.; AVILES, F. X. Procarboxypeptidase A from the insect pest *Helicoverpa armigera* and its derived enzyme. Two forms with new functional properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 14, p. 3026–3035, 2003.

BAYER HEALTH CARE, Manual de Biossegurança Bayer. 2010.

BAZAN, J. F., FLETTERICK, R. J. Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases**. Semin. Vir.** vol.1, p:311-322, 1990.

BEN-MAHMOUD, S.; RAMOS, J. E.; SHATTERS, R. Gl. Cloning and characterization of a basic cysteine-like protease (cathepsin L1) expressed in the gut of larval *Diaprepes abbreviatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 72, p. 1–13, 2015.

BODE, W., SCHWAGER, P. The Refined Crystal Structure of Bovine beta- Tripsin at 1.8 A Resolution II. Crystallographic Refinement, Calcium Binding Site, Benzamide Binding Site and Active Site at pH 7.0. **FEBS Letters**, 56, pp: 139- 143, (1975).

BOLTER, C. J.; LATOSZEK-GREEN, M. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 83, n. 3, p. 295–303, 1997.

BONATTI, A. R., MONTEIRO, M. C. G. B. Biosseguridade em granjas avícolas de matrizes. **INTELLECTUS – Revista Acadêmica Digital do Grupo POLIS Educacional**, Ano-04, Número 05. Jaguariúna, SP, 2008.

BOOTH, N. H., MCDONALD L., E. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária, **Rio de Janeiro, ed. Guanabara** Koogan, p. 997,. 1988.

BOOTH, R. G.; COX, M. L.; MADGE, R. B. Q. G. **IIE guides to insects of importance to man. 3. Coleoptera**. CAB International, 1990.

BORZOUI, E.; NASERI, B.; RAHIMI NAMIN, F. Different diets affecting biology and digestive physiology of the Khapra beetle, Trogoderma granarium Everts (Coleoptera: Dermestidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 1–7, 2015.

BOTOS, I.; MEYER, E.; NGUYEN, M. The structure of an insect chymotrypsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 5, p. 895–901, 2000.

BOUAYAD, N.; RHARRABE, K.; NOUROUTI, N.; SAYAH, F. Effects of different food commodities on larval development and α-amylase activity of Plodia interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 373–378, 2008.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**. v. 29, n. 3, p. 278–290, 2004a.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; JONGSMA, M. A.; GATEHOUSE, J. A. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (Diabrotica virgifera) by expression in the yeast Pichia pastoris. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 305–320, 2004b.

BOZIC, N.; DOJNOV, B.; MARGETIC, A. Characterization of endopeptidases from the midgut of Morimus funereus (Coleoptera : Cerambycidae) larvae. **Archives of Biological Sciences**, v. 60, p. 403–409, 2008.

BOZIĆ, N.; VUJCIĆ, Z.; NENADOVIĆ, V.; IVANOVIĆ, J. Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of Morimus funereus (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 134, n. 2, p. 231–241, 2003.

BREDDAM, K. Serine carboxypeptidases. A review. **Carlsberg Research Communications**, v. 51, n. 2, p. 83, 1986.

BRIEGEL, HANS; LEA, ARDEN O. Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 9, p. 1597-1604, 1975.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTSON, M. H. General up regulation of Spodoptera frugiperda trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 12, p. 1283–1290, 2007.

BROADWAY, R. M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 9, p. 855–874, 1997.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n. 8, p. 673–680, 1986.

BROMME, D.; NALLASETH, F. S.; TURK, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 32, n. 2, p. 199–206, 2004.

BRUNE, A.; DIETRICH, C. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 145–166, 2015.

BRYANT, D. T.; ANDREWS, P. High-affinity binding of $Ca2^{+}$ to bovine alpha-lactalbumin in the absence and presence of EGTA. **Biochemical Journal**, v. 220, n. 2, p. 617–620, 1984.

BUCHON, N.; OSMAN, D. All for one and one for all: Regionalization of the Drosophila intestine. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 67, p. 2–8, 2015.

BUISSON, G.; DUÉE, E.; HASER, R.; PAYAN, F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 A resolution. Role of calcium in structure and activity. **The EMBO journal**, v. 6, n. 13, p. 3909–3916, 1987.

BURMEISTER GETZ, E.; XIAO, M.; CHAKRABARTY, T.; COOKE, R.; SELVIN, P. R. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl) phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. **Analytical Biochemistry** 273,p.73–80, 1999.

BLAKEMORE, D.; WILLIAMS, S.; LEHANE, M. J. Protein stimulation of trypsin secretion from the opaque zone midgut cells of *Stomoxys calcitrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 2, p. 301-307, 1995.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J. J.; HARTLEY, B. S. Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin. **Nature**, v. 221, n. 5178, p. 337–340, 1969.

BLUNDELL, T. L.; COOPER, J. B.; ŠALI, A.; ZHU, Z. Comparisons of the Sequences, 3-D Structures and Mechanisms of Pepsin-Like and Retroviral Aspartic Proteinases. In: B. M. Dunn (Org.); **Structure and Function of the Aspartic Proteinases: Genetics, Structures, and Mechanisms**, Advances in Experimental Medicine and Biology. p.443–453, 1991. Boston, MA: Springer US. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6012-4_57>. Acesso em: 22/8/2019.

CADEL, S.; FOULON, T.; VIRON, A. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 2963–2968, 1997.

CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and α-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 51–57, 1989.

CASSIA, S. D., SAKAUCHI, D., ANTONIA, P. E. A., LIMA, S. N., IOURTOV, D., RAW, I., SALDANHA, F. K. Purification and characterization of aprotinin from porcine lungs**. Biotechnol Lett** 30, pp: 807–812, 2008.

CHAPMAN, R. F**.** Structure of the digestive system**. In Comprehensive Insect Physiology. Comprehensive Insect Physiology, Volume 4: Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion**. Elsevier, 1985.

CHAPMAN, R. F.; CHAPMAN, REGINALD FREDERICK. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 1998.

CHARLES, J. L., BONADÈ, M. B., AUGUSTIN, S., PILATE, G., DUMANOIS, V. L.T., DELPLANQUE, A., CORNU, D., JOUANIN, L. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor**. Molecular Breeding** 1, pp: 319-328, 1995.

CHERNAKY, A. M., ALMEIDA, L. M. Morfologia dos Estágios Imaturos e do Adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera:Tenebrionidea). **Revista brasileira zoologia**, vol. 18, n.2, p.351-363, 2001.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V. B.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 3, p. 243–247, 2002.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ALMEIDA, L. M.; LOPES, I. DE O. N. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 125–128, 2011.

CHIANCONE, E.; DRAKENBERG, T.; TELEMAN, O.; FORSÉN, S. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens: A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. **Journal of Molecular Biology**, v. 185, n. 1, p. 201–207, 1985.

CHOE, Y.; LEONETTI, F.; GREENBAUM, D. C. Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12824–12832, 2006.

CHO, W. L.; TSAO, S. M.; HAYS, A. R., WALTER, R.; CHEN, J. S.; SNIGIREVSKAYA, E. S.; RAIKHEL, A. S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **Journal of Biological Chemistry**, 274 (19), 13311-13321, 1999.

CHOUGULE, N. P.; DOYLE, E.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from Mamestra brassicae (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 3, p. 563–572, 2008.

CHRISTELLER, J. T.; SHAW, B. D.; GARDINER, S. E.; DYMOCK, J. 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.

COELHO, F. S.; SANCHES, A. P. C.; PINTO, F. C. R.; CARVALHO, T.; KIYOTA, S. Identificação de inibidores de serinoproteases nas frações protéicas de sementes de *Senna occidentalis* como os prováveis fatores antinutricionais tóxicos para animais. **São Paulo**, p. 6, 2006.

COLLINS, P. R.; STACK, C. M.; O'NEILL, S. M. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (Fasciola hepatica) virulence: propetide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17038–17046, 2004.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

COOPER, J. B. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 2, p. 155–173, 2002.

COSTA, I. A.; SAMUELS, R. I.; BIFANO, T. D.; TERRA, W. R.; SILVA, C. P. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from the midgut tissue of *Dysdercus peruvianus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, n. 3, p. 235–241, 2011.

CRISTOFOLETTI, P. T.; R. TERRA, W. Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from Tenebrio molitor (Coleoptera) midgut cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 807–819, 1999.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 8, p. 883–901, 2005.

CRISTOFOLETTI, P. T.; DE SOUSA, F. A. M.; RAHBÉ, Y.; TERRA, W. R. Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrthosiphon pisum* midgut cells. A major binding site for toxic mannose lectins. **The FEBS journal**, v. 273, n. 24, p. 5574–5588, 2006.

CROWSON, R. A. **The biology of the coleoptera**. London ; New York : Academic Press, 1981.

DANGLES, O.; MESÍAS, V.; CRESPO-PEREZ, V.; SILVAIN, J. F. Crop damage increases with pest species diversity: evidence from potato tuber moths in the tropical Andes.**Journal of Applied Ecology**, 46(5), 1115-1121, 2009.

DAVIES, D. R. The structure and function of the aspartic proteinases. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 19, p. 189–215, 1990.

DE MEESTER, P.; BRICK, P.; LLOYD, L. F.; BLOW, D. M.; ONESTI, S. Structure of the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (STI): implication for the interactions between members of the STI family and tissue-plasminogen activator. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 54, n. Pt 4, p. 589–597, 1998.

DEL LAMA, M.; MARIA BEZERRA, R.; SOARES, E.; CLAUDIA COLLA RAVOLO-TAKASUSUKI, M. Genetic, ontogenetic, and tissue-specific variation of aminopeptidases of Apis mellifera. **Apidologie**, v. 32, p. 25–35, 2001.

DESPINS, J. L.; AXTELL, R. C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poultry Science**, v. 74, n. 2, p. 331–336, 1995.

DESPINS, J. L.; TURNER, E. C.; RUSZLER, P. L. Construction Profiles of High Rise Caged Layer Houses in Association with Insulation Damage Caused by the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) in Virginia. **Poultry Science**, v. 66, n. 2, p. 243–250, 1987.

DI CERA, E. Serine Proteases. **IUBMB life**, v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.

DIAS, C. L.; ROGANA, E. Autolysis of beta-trypsin at pH 3.0. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 19, n. 1, p. 11–18, 1986.

DOYEN, J. T. Reconstitution of Coelometopini, Tenebrionini and Related Tribes of America North of Colombia (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of the New York Entomological Society.**, v. 97, p. 277–304, 1989.

DUNFORD, J. C.; KAUFMAN, P. E.; DUNFORD, J. C.; KAUFMAN, P. E. **EENY-367 Lesser Mealworm, Litter Beetle,Alphitobius diaperinus(Panzer) (Insecta: Coleoptera:** 2011.

EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Molecular and biochemical characterisation of a dual proteolytic system in vine weevil larvae (Otiorhynchus sulcatus Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 11, p. 785–791, 2010.

EDWARDS, M. J.; LEMOS, F. J.; DONNELLY-DOMAN, M.; JACOBS-LORENA, M. Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito Anopheles gambiae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 12, p. 1063–1072, 1997.

ELPIDINA, E. N.; GOPTAR, I. A. Digestive peptidases in *Tenebrio molitor* and possibility of use to treat celiac disease. **Entomological Research**, v. 37, n. 3, p. 139–147, 2007.

ELPIDINA, E. N.; TSYBINA, T. A.; DUNAEVSKY, Y. E. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 771–779, 2005.

ERLANDSON, M. A.; HEGEDUS, D. D.; BALDWIN, D.; NOAKES, A.; TOPRAK, U. Characterization of the Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae) larval midgut protease complement and adaptation to feeding on artificial diet, Brassica species, and protease inhibitor. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 75, n. 2, p. 70–91, 2010.

ERTHAL, M.; PERES SILVA, C.; IAN SAMUELS, R. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1101–1111, 2007.

FABRES, A.; DE CAMPOS MACEDO DA SILVA, J.; FERNANDES, K. V. S.; et al. Comparative performance of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) on different plant diets. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 3, p. 495–506, 2014.

FABRICK, J.; BEHNKE, C.; CZAPLA, T.; et al. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 405–415, 2002.

FAHRNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α-Chymotrypsin, and Trypsin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 7, p. 997–1000, 1963.

FALOMO, A. A. **The Pheromone Biology of the Lesser Mealworm, Alphitobius Diaperinus (Panzer), (Coleoptera: Tenebrionidae)**. University of Wisconsin--Madison, 1986.

FARIA FILHO, D. E.; FARIA, D. E.; JUNQUEIRA, O. M.; et al. Avaliação da Farinha de Carne e Ossos na Alimentação de Frangos de Corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 1, p. 00–00, 2002.

FERREIRA, C.; BELLINELLO, G. L.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, v. 20, n. 8, p. 839–847, 1990.

FERREIRA, C.; REBOLA, K. G. O.; CARDOSO, C.; et al. Insect midgut carboxypeptidases with emphasis on S10 hemipteran and M14 lepidopteran carboxypeptidases. **Insect Molecular Biology**, v. 24, n. 2, p. 222–239, 2015.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; GARCIA, E. S.; TERRA, W. R. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of Rhodnius prolixus posterior midgut cells. **Insect Biochemistry**, v. 18, n. 6, p. 521–530, 1988.

FINGERMAN, M. Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 6: Bio-Organic Compounds: **Chemistry and Biomedical Applications**. CRC Press, 2002.

FONSECA, F. P. P.; SOARES-COSTA, A.; RIBEIRO, A. F. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, Sphenophorus levis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 58–69, 2012.

FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., MELO, F. R., BLOCH JR, C., SILVA, C. P., GROSSI DE SÁ, M. F. Resistências de planta a insetos. **Plant Mol. Biol**, (1999).

FRANCO, O. L.; DOS SANTOS, R. C.; BATISTA, J. A. N. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, p. 343–349, 2003.

FRITZ, H.; WUNDERER, G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. **Arzneimittel-Forschung**, v. 33, n. 4, p. 479–494, 1983.

GALI, R. R.; BOARD, P. G. Identification of an essential cysteine residue in human glutathione synthase. **Biochemical Journal**, v. 321, n. Pt 1, p. 207–210, 1997.

GATEHOUSE, A. M. R.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; et al. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, n. 6, p. 545–558, 1999.

GATEHOUSE, J. A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011.

GAZARA, R. K.; CARDOSO, C.; BELLIENY-RABELO, D. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of midgut tissues of four non-model insects pertaining to Hemiptera, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. **Gene**, v. 627, p. 85–93, 2017.

GAZONI, F. L.; FLORES, F.; BAMPI, R. A. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 69–74, 2012.

GIRARD, C.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L. Two strains of cabbage seed weevil (Coleoptera: Curculionidae) exhibit differential susceptibility to a transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Journal of Insect Physiology** 44, pp.569-577, 1998.

GILLIKIN, J. W.; BEVILACQUA, S.; GRAHAM, J. S. Partial characterization of digestive tract proteinases from western corn rootworm larvae, Diabrotica virgifera. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 285–298, 1992.

GOMES, E. M., EVANGELISTA, L. V., CRISTINA, N. S. C., RAINHA F. R., ANTÔNIO, J. O., GORETI, M. A. O. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciênc. Agrotec,** Lavras, v. 35, n.3 p. 446-454, 2011.

GOLD, A. M.; FAHRNEY, D. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α-Chymotrypsin*. **Biochemistry**, v. 3, n. 6, p. 783–791, 1964.

GOODWIN, M. A.; WALTMAN, W. D. Transmission of Eimeria, Viruses, and Bacteria to Chicks: Darkling Beetles (*Alphitobius diaperinus*) as Vectors of Pathogens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, n. 1, p. 51–55, 1996.

GRAF, R.; RAIKHEL, A. S.; BROWN, M. R.; LEA, A. O.; BRIEGEL, H. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). **Cell and Tissue Research**, v. 245, n. 1, p. 19–27, 1986.

GREENBERG, B.; PARETSKY, D. Proteolytic Enzymes in the House Fly, Musca Domestica (L.). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 48, n. 1–2, p. 46–50, 1955.

GRUDEN, K.; STRUKELJ, B.; POPOVIC, T. 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.

GURD, F. R. N. [34a] Carboxymethylation. **Methods in Enzymology**, Enzyme Structure, Part B. v. 25, p.424–438, 1972. Academic Press. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687972250388>. Acesso em: 23/8/2019.

HAARD, N. F.; SIMPSON, B. K. **Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality**. CRC Press, 2000.

HABIB, H.; MAJID, K. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review Vol. 2 (3), pp. 068-085,** v. 2, p. 68–85, 2007.

HARPER, J. W.; POWERS, J. C. Reaction of serine proteases with substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins and 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins: new reactive mechanism-based inhibitors. **Biochemistry**, v. 24, n. 25, p. 7200–7213, 1985.

HAWKES, S. P.; LI, H.; TANIGUCHI, G. T. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 622, p. 257–269, 2010.

HEDSTROM, L.; SZILAGYI, L.; RUTTER, W. J. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5049, p. 1249–1253, 1992.

HEGEDUS, D.; BALDWIN, D.; O'GRADY, M.; et al. Midgut proteases from Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003.

HERNÁNDEZ, C. A.; PUJOL, M.; ALFONSO-RUBÍ, J.; et al. Proteolytic gut activities in the rice water weevil, *Lissorhoptrus brevirostris Suffrian* (Coleoptera: Curculionidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 19–29, 2003.

HOOPER, N. M. Proteolytic enzymes: A practical approach Edited by R J Beynon and J S Bond. pp 259. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 1989. £29 (spiral bound)/£19 (paper) ISBN 0-19-963058-5/963059-3. **Biochemical Education**, v. 18, n. 1, p. 55–55, 1990.

HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 3, p. 865–869, 1998.

HOSSEININAVEH, V.; BANDANI, A.; AZMAYESHFARD, P.; HOSSEINKHANI, S.; KAZZAZI, M. Digestive proteolytic and amylolytic activities in Trogoderma granarium Everts (Dermestidae: Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 515–522, 2007.

HOSSEININAVEH, V.; BANDANI, A.; HOSSEININAVEH, F. Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. **Journal of Insect Science (Online)**, v. 9, p. 1–11, 2009.

HOUSEMAN, JON G.; MORRISON, P. E.; DOWNE, A. E. R. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* Stål (Hemiptera: Phymatidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 6, p. 1288-1291, 1985.

HOUSEMAN, JON G.; MACNAUGHTON, W. K.; DOWNE, A. E. R. Cathepsin B and aminopeptidase activity in the posterior midgut of *Euschistus euschistoides* (Hemiptera: Pentatomidae). **The Canadian Entomologist**, v. 116, n. 10, p. 1393-1396, 1984.

HOUSEMAN, J. G.; PHILOGÈNE, B. J. R.; DOWNE, A. E. R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 4, p. 864–868, 1989.

HU, G.; LEGER, R. J. S. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 6, p. 1204–1214, 2004.

HUA, G.; TSUKAMOTO, K.; TAGUCHI, R.; et al. Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1383, n. 2, p. 301–310, 1998.

ISOE, J.; ZAMORA, J.; MIESFELD, R. L. Molecular Analysis of the *Aedes aegypti* Carboxypeptidase Gene Family. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 1, p. 68–73, 2009.

JAMES, C. P., JULIANA, L. A., OZLEM, D. E., KAREN, E. J. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chemical Reviews**, Vol. 102, No. 12, pp.4639−4750, (2002).

JAPP, A. K.; BICHO, C. DE L.; SILVA, A. V. F. DA. Importance and measures of control for *Alphitobius diaperinus* in poultry houses. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1668–1673, 2010.

JIA, Z.; HASNAIN, S.; HIRAMA, T.; et al. Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5527–5533, 1995.

JONHSTON, K. A., GATEHOUSE, J. A., ANSTEE, J. H**.** The partial Purification and Characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera***, Insect Biochemistry**. 21: p. 389-397. (1991).

JOHNSTON, K. A.; LEE, M. J.; BROUGH, C.; et al. Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 375–383, 1995.

JOHNSTON, K. A.; LEE, M. J.; GATEHOUSE, J. A.; ANSTEE, J. H. The partial purification and characterisation of serine protease activity in midgut of larval Helicoverpa armigera. **Insect Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 389–397, 1991.

KAISER-ALEXNAT, R. Protease activities in the midgut of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera* virgifera LeConte). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 3, p. 169–174, 2009.

KALLIES, B.; MITZNER, R. Substrate Specifity of Chymotrypsin. Study of Induced Strain by Molecular Mechanics. **Molecular modeling annual**, v. 2, n. 6, p. 149–159, 1996.

KAUFMAN, P.; STRONG, C.; A RUTZ, D. Susceptibility of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) adults and larvae exposed to two commercial insecticides on unpainted plywood panels. **Pest management science**, v. 64, p. 108–11, 2008.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, 60 (20), 2299-2301, 1988.

KEIL, B.; DLOUHÁ, V.; HOLEYŠOVSKÝ, V.; ŠORM, F. Hypothesis of three-dimensional arrangement of polypeptide chain in trypsin. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 33, n. 7, p. 2307–2315, 1968.

KNIGHT, P. J.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17765–17770, 1995.

KOIWA, H.; SHADE, R. E.; ZHU-SALZMAN, K.; et al. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **FEBS Letters**, v. 471, n. 1, p. 67–70, 2000.

KOTKAR, H. M.; SARATE, P. J.; TAMHANE, V. A.; GUPTA, V. S.; GIRI, A. P. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 8, p. 663–670, 2009.

KRAUT, J. 5 Chymotrypsinogen: X-Ray Structure. In: P. D. Boyer (Org.); **The Enzymes**, Hydrolysis: Peptide Bonds. v. 3, p.165–183, 1971. Academic Press. Disponível: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874604708603960>. Acesso em: 23/8/2019.

KUWAR, S. S.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut *of Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 59, p. 18–29, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LABREMONT, E. N., FISK, F. W. ASHRAFI, S. Pepsin-like enzyme in larvae of stable flies. **Science** 129, p:1484-1485, (1959).

LAM, W.; COAST, G. M.; C. RAYNE, R. Isolation and characterisation of two chymotrypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 7, p. 653–660, 1999.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 85–94, 2000.

LAMONICA, S., IDE S., Principais Grupos de Insetos Pragas em Plantas de Interessse Econômico. **Biológico,** São Paulo, v.64, n.2. p: 235-238, (2002).

LASKOWISKI, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 593–626, 1980.

LAVAZEC, C.; BONNET, S.; THIERY, I.; BOISSON, B.; BOURGOUIN, C. cpbAg1 encodes an active carboxypeptidase B expressed in the midgut of *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 2, p. 163–174, 2005.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 5–6, 2002.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Characterization of midgut exopeptidase activity from larval *Spodoptera littoralis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 63–71, 1995a.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Endoproteases from the midgut of larval Spodoptera littoralis include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 49–61, 1995b.

LEE W.C., KATERYN R.,, ADRIAN J.D., JOHN F., ROBERTO B., NAN-Y. S., ALEC C.G., PETER J.O., JAMES F.C., TIM J.L., SANDRA A.A. Arthropod Surveillance Programs: Basic Components, Strategies and Analysis, **Ann Entomol Soc Am.** March ; 105 (2): 135–149 (2012).

LEHANE, M.; BILLINGSLEY, P. (ORGS.). **Biology of the Insect Midgut**. Springer Netherlands, 1996.

LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (Vigna unguiculata) seeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 56, n. 3, p. 219–227, 1987.

LESCHEN, R. A. B., STEELMAN, C. D. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: tenebrionidea), larva and adult mouthparts. **Entomological News**: v. 99, n. 4, p. 221-224, 1988.

LETH-LARSEN, R.; ÁSGEIRSSON, B.; THÓRÓLFSSON, M.; NØRREGAARD-MADSEN, M.; HØJRUP, P. Structure of chymotrypsin variant B from Atlantic cod, Gadus morhua. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1297, n. 1, p. 49–56, 1996.

LEVINSKY, H.; BIRK, Y.; APPLEBAUM, S. W. Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 10, n. 3, p. 252–264, 1977.

LI, H.-M.; BUCZKOWSKI, G.; MITTAPALLI, O.; et al. Transcriptomic profiles of *Drosophila melanogaster* third instar larval midgut and responses to oxidative stress. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 4, p. 325–339, 2008.

LIMA, A. P.; DOS REIS, F. C.; SERVEAU, C.; et al. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 41–52, 2001.

LIU, F.; LIU, C.; ZENG, F. Effects of an artificial diet on development, reproduction and digestive physiology of *Chrysopa septempunctata*. **BioControl**, v. 58, n. 6, p. 789–795, 2013.

LIU, H.-W.; LI, Y.-S.; TANG, X.; et al. A midgut-specific serine protease, BmSP36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Science**, v. 24, n. 5, p. 753–767, 2017.

LIU, Y.; SALZMAN, R. A.; PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 10, p. 1069–1077, 2004.

LIVELY, M. O.; POWERS, J. C. Specificity and reactivity of human granulocyte elastase and cathepsin G, porcine pancreatic elastase, bovine chymotrypsin and trypsin toward inhibition with sulfonyl fluorides. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 525, n. 1, p. 171–179, 1978.

LOMATE, P. R.; HIVRALE, V. K. Partial purification and characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) active aminopeptidase secreted in midgut. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 155, n. 2, p. 164–170, 2010.

LONCAR, N.; BOZIC, N.; NENADOVIC, V.; IVANOVIC, J.; VUJČIĆ, Z. Characterization of Trypsin-Like Enzymes from the Midgut of *Morimus Funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) Larvae. **Archives of Biological Sciences**, v. 61, p. 713–718, 2010.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006.

LORINI, I., KRZYZANOWSKI, F. C., FRANÇA-NETO, J. B., HENNING, A. A., HENNING, F. A. Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. Brasília: Embrapa, 2010.

LORINI, I**.** Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento-Série sementes**. Londrina: Embrapa Soja,** 12p. (Circular Técnica. Embrapa Soja. ISSN 1516-7860, n. 73), 2008**.**

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. DAS G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; DE OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of Inga laurina Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 158, n. 2, p. 164–172, 2011.

MAHDAVI, A.; GHADAMYARI, M.; SAJEDI, R. H.; SHARIFI, M.; KOUCHAKI, B. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid*, Glyphodes pyloalis*. **Journal of Insect Science (Online)**, v. 13, p. 81, 2013.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. 3rd edition ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1992.

MARCHETTI, S.; CHIABÀ, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PITOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 7, p. 449–458, 1998.

MARTYNOV, A. G.; ELPIDINA, E. N.; PERKIN, L.; OPPERT, B. Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. **BMC genomics**, v. 16, p. 75, 2015.

MATHUR, L. M. L. Digestive Physiology of Tur Pod Bug *Clavigralla gibbosa*. I**nd. J. Ent.** 31 (3): 251 – 257, 1969.

MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K.; ARAI, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. **Journal of Biochemistry**, v. 121, n. 3, p. 464–476, 1997.

MCGRATH, M. E. The lysosomal cysteine proteases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 181–204, 1999.

MCKAY, T.; STEELMAN, C. D.; BRAZIL, S. M.; SZALANSKI, A. L. Sustained Mass Release of Pupal Parasitoids (Hymenoptera: Pteromalidae) for Control of *Hydrotaea aenescens* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Broiler-Breeder Poultry Houses in Arkansas. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 24, n. 2, p. 67–85, 2007.

MCPHALEN, C. A., STRYNADKA, N. C. J.,JAMES, M. N. G. Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. **Adv. Protein Chem**. *42*, pp:77–144, 1991.

MEDEL, V.; PALMA, R.; MERCADO, D.; et al. The Effect of Protease Inhibitors on Digestive Proteolytic Activity in the Raspberry Weevil, *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 77–83, 2015.

MEHRABADI, M., FRANCO, L. O., BANDANI, R. A. Plant Proteinaceous α-Amylase and Proteinase Inhibitors and Their Use in Insect Pest Control. **New Perspectives in Plant Protection. Bandani** (Ed.), ISBN: 978-953-51, 2012.

MÉNARD, R.; CARMONA, E.; PLOUFFE, C.; et al. The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. **FEBS Letters**, v. 328, n. 1–2, p. 107–110, 1993.

MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)). **Journal of Pest Science**, v. 85, n. 1, p. 117–123, 2012.

MICHAUD, DOMINIQUE; BERNIER-VADNAIS, N.; OVERNEY, S.; YELLE, S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1041–1048, 1995a.

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995b.

MOCHIZUKI, A. Characteristics of digestive proteases in the gut of some insect orders. **Applied Entomology and Zoology**, v. 33, n. 3, p. 401–407, 1998.

MONTESDEOCA, M.; LOBO, M. G.; CASAÑAS, N.; et al. Partial characterization of the proteolytic enzymes in the gut of the banana weevil, Cosmopolites sordidus, and effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on larval performance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 116, n. 3, p. 227–236, 2005.

MONICA, F. P., BRAD, S. C., CHRISTOPHER, P. C., ADALBERTO, A. P., JAY, D. E., KEVIN H., DE WAYNE, S., Agricultural applications of insect ecological genomics**. Current Opinion in Insect Science** , 13, p: 61–69, (2016).

MOSOLOV, V. V.; GRIGOR'EVA, L. I.; VALUEVA, T. A. Plant Proteinase Inhibitors as Multifunctional Proteins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 545–551, 2001.

MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; et al. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 783–787, 1987.

NAGRADOVA, N.K. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase purified from rabbit muscle**. Methods Enzymol**., v. 41, pp: 264-267, 1992.

NANUS, D. M.; ENGELSTEIN, D.; GASTL, G. A.; et al. Molecular cloning of the human kidney differentiation antigen gp160: human aminopeptidase A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 15, p. 7069–7073, 1993.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V.; GATEHOUSE, A. M. R. Digestive proteolytic and amylolytic activities of Helicoverpa armigera in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest Management Science**, v. 66, n. 12, p. 1316–1323, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger - 5.ed.** Artmed Editora, 2011.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4647, p. 350–357, 1984.

NEURATH, H.; DIXON, G. H. Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. **Federation Proceedings**, v. 16, n. 3, p. 791–801, 1957.

NOGUEIRA, F. C.; SILVA, C. P.; ALEXANDRE, D.; SAMUELS, R. I.; SOARES, E. L.; ARAGÃO, F. J.; CAMPOS, F. A. Global proteome changes in larvae of Callosobruchus maculatus Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **Proteomics**, 12 (17), 2704-2715, 2012.

NORÉN, O.; SJÖSTRÖM, H.; NORÉN, O. **The enzymes of the enterocyte plasma membrane. In: Molecular and cellular basis of digestion**. Amsterdam; New York: Elsevier, 1986.

NORMAN, M. R., HOUSEMAN, G. Cysteine and Serine Proteolytic Activities In Larval Midgut of Yellow Mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insect Biochem**. Vol. 20, No. 7, pp. 741-744, 1990.

NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 36, n. 3, p. 181–201, 1997.

NWILENE, F. E.; NWANZE, K. F.; YOUDEOWEI, A. Impact of integrated pest management on food and horticultural crops in Africa. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 128, n. 3, p. 355-363, 2008.

OAKLEY, BERL R.; KIRSCH, DONALD R.; MORRIS, N. RONALD. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 105, n. 1, p. 361-363, 1980.

OLIVEIRA, A. A. DE; GOMES, A. V. DA C.; OLIVEIRA, G. R. DE; et al. Desempenho e características da carcaça de frangos de corte alimentados com rações de diferentes formas físicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2450–2455, 2011.

OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, 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. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005.

OPPERT, B.; ELPIDINA, E. N.; TOUTGES, M.; MAZUMDAR-LEIGHTON, S. Microarray analysis reveals strategies of Tribolium castaneum larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 280–287, 2010.

OPPERT, B.; HARTZER, K.; SMITH, C. Digestive Proteinases of Alfalfa Weevil, Hypera postica, (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). **Trans Kansas Acad Sci**, v. 1003, 2000.

OPPERT, B.; HARTZER, K.; ZUERCHER, M. Digestive proteinases in Lasioderma serricorne (Coleoptera: Anobiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 4, p. 331–336, 1999.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; HARTZER, K.; et al. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 134, n. 4, p. 481–490, 2003.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; HARTZER, K.; KRAMER, K. J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 140, n. 1, p. 53–58, 2005.

OPPERT, B.; WALTERS, P.; ZUERCHER, M. Digestive proteinases of the larger black flour beetle, Cynaeus angustus (Coleoptera: Tenebrionidae). **Bulletin of entomological research**, v. 96, p. 167–72, 2006.

ORTEGO, F.; FARINOS, G. P.; RUÍZ, M.; MARCO-MANCEBÓN, V.; CASTAÑERA, P. Characterization of digestive proteases in the weevil Aubeonymus mariafranciscae and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 265–274, 1998.

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

OSUALA, C. I.; DONNER, R. L.; NIELSEN, S. S. Partial purification and characterization of an aminopeptidase from the bean weevil larvae Acanthoscelides obtectus Say (Coleoptera, Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 2, p. 241–248, 1994.

OURO FINO SAÚDE ANIMAL. Programa de manejo integrado para controle de cascudinho (***Alphitobius diaperinus***) em aviários. Disponível em: http://www.**ourofino.com/saude-animal**/aves-e-suinos/programas-sanitarios/>. Acesso em: 26 nov, 2013.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 7–8, p. 1220–1236, 2008.

PAINE, T. D. Insects colonizing eucalypts in California. In: Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems. **Springer, Cham**, p. 711-730, 2016.

PARDE, V. D. Inhibition of Helicoverpa armigera gut zymogen activation by plant protease inhibitors, 2009. phd, Dr. **Babasaheb Ambedkar Marathwada University**. Disponível em: <http://oar.icrisat.org/128/>. Acesso em: 24/8/2019.

PASCUAL-RUIZ, S.; CARRILLO, L.; ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; et al. The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier

bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 5, p. 487–491, 2009.

PATANKAR, A. G.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; et al. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4–5, p. 453–464, 2001.

PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOS, A.; HECKEL, D. G. Chromatographic and electrophoretic resolution of proteins and protein complexes from the larval midgut microvilli *of Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 7, p. 467–474, 2009.

PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOŠ, A.; HECKEL, D. G.; PREISS, S. Mapping the Larval Midgut Lumen Proteome of *Helicoverpa armigera*, a Generalist Herbivorous Insect. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1629–1639, 2007.

PEER, W. A. The role of multifunctional M1 metallopeptidases in cell cycle progression. **Annals of Botany**, v. 107, n. 7, p. 1171–1181, 2011.

PEREIRA, M. E.; DÖRR, F. A.; PEIXOTO, N. C.; et al. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, p. 1633–1641, 2005.

PEREIRA, M. H.; SOUZA, M. E.; VARGAS, A. P.; et al. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). **Acta Tropica**, v. 61, n. 3, p. 255–261, 1996.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. **Nature**, v. 228, n. 5273, p. 726–734, 1970.

PIMENTEL, A. C.; FUZITA, F. J.; PALMISANO, G.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Role of cathepsins D in the midgut of Dysdercus peruvianus. **Comparative**

Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, v. 204, p. 45–52, 2017.

PIASECKA-KWIATKOWSKA, D.; NAWROT, J.; GAWLAK, M.; ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, M. Applicability of zymograms for detection of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) α-amylases left on grain after insects infestation. **Progress in Plant Protection,** 53(1), 70-73, 2013.

PLAPP, B. V. Application of affinity labeling for studying structure and function of enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 87, p. 469–499, 1982.

POOTANAKIT, K.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; PANYIM, S. Identification of two isoforms of aminopeptidase N in Aedes aegypti larval midgut. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 5, p. 508–513, 2003.

POWELL, S.; FORSLUND, K.; SZKLARCZYK, D.; et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D231-239, 2014.

PREISS, F. J.; DAVIDSON, J. A. Characters for Separating Late-Stage Larvae, Pupae, and Adults of Alphitobius diaperinus and A. laevigatus (Coleoptera: Tenebrionidae),,. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, n. 3, p. 807–808, 1970.

PURCELL, J. P.; GREENPLATE, J. T.; DOUGLAS SAMMONS, R. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 1992.

RANJBAR, M.; ZIBAEE, A.; SENDI, J. J. A trypsin-like proteinase in the midgut of Ectomyelois ceratoniae Zeller (Lepidoptera: Pyralidae): purification, characterization, and host plant inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 1–12, 2014.

RAWLINGS N.D, BARRETT A.J. Introduction: the clans and families of cysteine peptidases. In: BARRETT A.J, RAWLINGS N.D, WOESSNER J.F, editors. Handbook of proteolytic enzymes, vol. II. **Amsterdam: Elsevier**. p 1051–1071, (2004).

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D227-233, 2010.

REECK, G. R.; OPPERT, B.; DENTON, M. (ORGS.). **Insect proteinases. In: Proteases New Perspectives**. Birkhäuser Basel, 1999.

RENARD, G.; LARA, F. A.; DE CARDOSO, F. C.; MIGUENS, F. C.; DANSA-PETRETSKI, M.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect molecular biology,** 11(4), 325-328, 2002

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological basis of insect digestion. **Animal nutrition and transport processes. 1. Nutrition in wild and domestic animals.**, p. 96–105, 1990.

RUEDA, L. M.; AXTELL, R. C. Temperature-dependent development and survival of the lesser mealworm, Alphitobius diaperinus. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, n. 1, p. 80–86, 1998.

RUKAZAMBUGA, N. D. T. M.; GOLD, C. S.; GOWEN, S. R. Yield loss in East African highland banana (Musa spp., AAA-EA group) caused by the banana weevil, Cosmopolites sordidus Germar. **Crop Protection**, v. 17, n. 7, p. 581–589, 1998.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.

SABOROWSKI, R.; SAHLING, G.; NAVARETTE DEL TORO, M. A.; WALTER, I.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases

from the gastric fluid of the marine crab Cancer pagurus. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3, p. 109–118, 2004.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002.

SARATH, G.; LA MONTE, S. L., W., F. W. (ORGS.). **Protease assay methods. In: Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford ; New York: IRL Press at Oxford University Press, 1996.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967.

SCHAFER, S. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.177-181, 2005.

SHEWRY, P. R.; CASEY, R. Seed proteins. In: **Seed proteins**. Springer, Dordrecht. p. 1-10, 1999

SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (Vicia sativa L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1423–1433, 2000.

SCHOWALTER, T. D. Insect ecology: an ecosystem approach. **Academic Press**, 2016

SEMASHKO, T. A.; VOROTNIKOVA, E. A.; SHARIKOVA, V. F.; et al. Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures. **Analytical Biochemistry**, v. 449, p. 179–187, 2014.

SELLAMI, S., JAMOUSSI, K. Investigação de larvas digestivas β-glicosidase e proteases da praga de tomate *Tuta absoluta* para inibir o desenvolvimento de insetos. **Boletim de pesquisa entomológica** , v. 106, n. 3, p. 406-414, (2016).

SHARIFI, M.; CHITGAR, M. G.; GHADAMYARI, M.; AJAMHASANI, M. Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *Osphranteria Coerulescens* red tenbacher (coleoptera: cerambycidae). , 2012.

SHARMA, P.; NATH, A. K.; KUMARI, R.; BHARDWAJ, S. V. Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from *Albizia lebbeck* seeds. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 1, p. 131–137, 2012.

SHAW, B. D.; CHRISTELLER, J. T. Characterization of the proteases in the midgut of the xylophagous larvae of Oemona hirta (Coleoptera: Cerambycidae). **Insect Science**, v. 16, n. 5, p. 381–386, 2009.

SHAW, E.; MARES-GUIA, M.; COHEN, W. Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from Nα-Tosyl-L-lysine*. **Biochemistry**, v. 4, n. 10, p. 2219–2224, 1965.

SHIU, H.-Y.; CHAN, T.-C.; HO, C.-M.; et al. Electron-Deficient Alkynes as Cleavable Reagents for the Modification of Cysteine-Containing Peptides in Aqueous Medium. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, n. 15, p. 3839–3850, 2009.

SIGHINOLFI, L.; FEBVAY, G.; DINDO, M. L. Biological and biochemical characteristics for quality control of Harmonia axyridis (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) reared on a liver-based diet. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 68, n. 1, p. 26–39, 2008.

SIMONE, S. G., SILVA, J. F. P. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento** n.22, 12 2001.

SILVA, A. S. DA; HOFF, G.; DOYLE, R. L.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Ciclo biológico do cascudinho Alphitobius diaperinus em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 177–181, 2005.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; LIMA, R. M. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 1, p. 18–28, 2001.

SILVA, F. C. B. L.; ALCAZAR, A.; MACEDO, L. L. P. Digestive enzymes during development of Ceratitis capitata (Diptera:Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 7, p. 561–569, 2006.

SILVA, L. B.; REIS, A. P.; PEREIRA, E. J. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, Sitophilus zeamais. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 155, n. 1, p. 12–19, 2010a.

SILVA, L. B.; REIS, A. P.; PEREIRA, E. J. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Altered cysteine proteinase activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 80–87, 2010b.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J.; SILVA, J. R. Digestão em Insetos: Topicos Avançados em Entomologia Molecular: **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. Itabajara da Silva Vaz Junior, 2012.

SNEDEKER, C.; WILLS, F. K.; MOULTHROP, I. M. Some studies on the infectious bursal agent. **Avian Diseases**, v. 11, n. 4, p. 519–528, 1967.

SOARES-COSTA, A.; B DIAS, A.; DELLAMANO, M.; et al. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil Sphenophorus levis. **Journal of insect physiology**, v. 57, p. 462–8, 2011.

SOCORRO, M.; CAVALCANTI, M.; OLIVA, M. L. V.; FRITZ, H. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from Swartzia pickellii.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 291, n. 3, p. 635–639, 2002

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431–444, 1999.

SOUZA, D. X., LIFSCHITZ, S. A avaliação do e-value para execução do BLAST sobre bases de dados fragmentadas. **Monografias em Ciência da Computação**. PUC 17/07 15, 2007.

SREEDHARAN, S. K.; VERMA, C.; CAVES, L. S. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64-beta-trypsin complex. **The Biochemical Journal**, v. 316 (Pt 3), p. 777–786, 1996.

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.

STACHOWIAK, K.; TOKMINA, M.; KARPIŃSKA, A.; SOSNOWSKA, R.; WICZK, W. Fluorogenic peptide substrates for carboxydipeptidase activity of cathepsin B. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 1, p. 81–92, 2004.

STEELMAN, C. Comparative Susceptibility of Adult and Larval Lesser Mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), Collected from Broiler Houses in Arkansas to Selected Insecticides. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 25, p. 111–125, 2008.

STOREY, R.D., WAGNER, F.W. Plant proteases: a need for uniformity. **Phytochemistry** 25, 2701–2709, 1986.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbial and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211–220, (2006).

SZECSI, P. B. The aspartic proteases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 210, p. 5–22, 1992.

TABATABAEI, P. R.; HOSSEININAVEH, V.; GOLDANSAZ, S. H.; TALEBI, K. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, Ectomyelois ceratoniae (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 2, p. 187–194, 2011.

TAYLOR, A. Aminopeptidases: structure and function. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 2, p. 290–298, 1990.

TERRA, W.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 4, p. 171–224, 2005.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 725–730, 1996.

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

TERRA, W. R., FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L.I. (Ed.), Insect Molecular Biology and Biochemistry. **Academic Presse Elsevier**, pp. 365-418, 2012.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BASTOS, F. Phylogenetic considerations of insect digestion: Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the Tenebrio molitor larvae. **Insect Biochemistry**, v. 15, n. 4, p. 443–449, 1985.

TERRA, W. Evolution of digestive systems of insects. **Annu. Rev. Entomol**. 35, 181–200, (1990).

TERRA, W. R.; FERREIRA, C., JORDÃO, B. P.; DILLON, R. J. Digestive enzymes. In: Biology of the Insect Midgut. Edited by LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Chapman and Hall: London**, pp. 153–194, 1996.

THIE, N. M. R.; HOUSEMAN, J. G. Cysteine and serine proteolytic activities in larval midgut of yellow mealworm, Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insect Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 741–744, 1990.

THOMAS, M. B. Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management.**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, p. 5944-5951, 1999.

TIMOTIJEVIC, G.;MILISAVLJEVIĆ, M.; R RADOVIĆ, S.; M KONSTANTINOVIĆ, M.; MAKSIMOVIC, V. Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. **Journal of plant physiology**, v. 167, p. 61–8, 2010.

TRIBOLIUM GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949–955, 2008.

TURK, D.; GUNCAR, G.; PODOBNIK, M.; TURK, B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biological Chemistry**, v. 379, n. 2, p. 137–147, 1998.

TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 68–88, 2012.

VAJDA, T.; GARAI, A. Comparison of the effect of calcium(II) and manganese(II) ions on trypsin autolysis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 15, n. 4, p. 307–315, 1981.

VALAITIS, A. P.; AUGUSTIN, S.; CLANCY, K. M. Purification and characterization of the western spruce budworm larval midgut proteinases and comparison of gut activities of laboratory-reared and field-collected insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 5, p. 405–415, 1999.

VAZQUEZ-ARISTA, M.; SMITH, R. H.; MARTÍNEZ-GALLARDO, N. A.; BLANCO-LABRA, A. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 35, n. 2, p. 167–174, 1999.

VENANCIO, T.; CRISTOFOLETTI, P.; FERREIRA, C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; TERRA, W. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: A comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. **Insect molecular biology**, v. 18, p. 33–44, 2009.

VERHOEF, H. A. Soil Moisture and the Population Dynamics of Coexisting Collembola. **Ecological Bulletins**, , n. 25, p. 480–482, 1977.

VINOKUROV, KONSTANTIN S.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B.; et al. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 145, n. 2, p. 126–137, 2006a.

VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B.; et al. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 145, n. 2, p. 138–146, 2006b.

VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; ZHUZHIKOV, D. P.; et al. Digestive proteolysis organization in two closely related Tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 4, p. 254–279, 2009.

VISOTTO, L. E.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; RIBON, A. O. B.; GOOD-GOD, P. I. V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 3, p. 185–191, 2009.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; et al. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 1, p. 10–19, 2003.

VOLPICELLA, M., LEONI, C., COSTANZA, A., DE LEO, F., GALLERANI, R., CECI, L. R. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants.**Current Protein and Peptide Science**, 12(5), 386-398, (2011).

VYAS, N. K.; VYAS, M. N.; QUIOCHO, F. A. A novel calcium binding site in the galactose-binding protein of bacterial transport and chemotaxis. **Nature**, v. 327, n. 6123, p. 635–638, 1987.

WAGNER, W.; MÖHRLEN, F.; SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, Melolontha melolontha (Coleoptera: Scarabaeidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 7, p. 803–814, 2002.

WANG, P.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, Trichoplusia ni. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 611–620, 2005.

WEIDLICH, S.; HUSTER, J.; HOFFMANN, K. H.; WOODRING, J. Environmental control of trypsin secretion in the midgut of the two-spotted field cricket, Gryllus bimaculatus. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 11, p. 1477–1484, 2012.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Routledge, 1994.

WHITWORTH, S. T.; BLUM, M. S.; TRAVIS, J. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, Solenopsis invicta. Isolation and characterization of four serine endopeptidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14430–14434, 1998.

WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical chemistry**, 57(3), 675-679, 1985.

WIELKOPOLAN, B.; OBRĘPALSKA-STĘPLOWSKA, A. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. **Planta**, v. 244, n. 2, p. 313–332, 2016.

WIELKOPOLAN, B.; WALCZAK, F.; PODLEŚNY, A.; NAWROT, R.; OBRĘPALSKA-STĘPLOWSKA, A. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (Oulema melanopus, Chrysomelidae, Coleoptera). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 192–202, 2015.

WIENS, J. J.; LAPOINT, R. T.; WHITEMAN, N. K. Herbivory increases diversification across insect clades.**Nature communications**, v. 6, p. 8370, 2015.

WIEMAN, K. F.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval Acanthoscelides obtecus say (Coleoptera, Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 2, p. 419–426, 1988.

WIGGLESWORTH, V. B. **The Principles of Insect Physiology**. Springer Netherlands, 1972.

WILHITE, S. E.; ELDEN, T. C.; BRZIN, J.; SMIGOCKI, A. C. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 12, p. 1181–1188, 2000.

WILLOCQUET, L.; AUBERTOT, J. N.; LEBARD, S.; ROBERT, C.; LANNOU, C.; SAVARY, S. Simulating multiple pest damage in varying winter wheat production situations. *Field Crops Research*, *107*(1), 12-28, 2008.

WILSON, T. H.; MINER, F. D. Influence of Temperature on Development of the Lesser Mealworm, Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 42, n. 3, p. 294–303, 1968.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 4, p. 1089–1102, 1990.

WOOL, D.; NAMIR, Z.; BERGERSON, O. Dietary Regulation of Amylase Activity Levels in Flour Beetles (Coleoptera: Tenebrionidae): (Tribolium). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 3, p. 407–413, 1986.

XAVIER, L. P.; ALMEIDA OLIVEIRA, M. G.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, A. V.; DE SIMONE, S. G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae). **EJE**, v. 102, n. 2, p. 147–153, 2005.

YAN, X. H.; DE BONDT, H. L.; POWELL, C. C.; BULLOCK, R. C.; BOROVSKY, D. Sequencing and characterization of the citrus weevil, Diaprepes abbreviatus, trypsin cDNA. Effect of Aedes trypsin modulating oostatic factor on trypsin biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 262, n. 3, p. 627–636, 1999.

YAMAJI, K.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M. K.; HATTA, T.; ALIM, M. A.; FUJISAKI, K. A salivary cystatin, HlSC-1, from the ixodid tick Haemaphysalis longicornis play roles in the blood-feeding processes. **Parasitology research**, 106(1), 61-68, 2009.

YI, L.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; BOEREN, S.; LAKEMOND, C. M. M. Protein identification and in vitro digestion of fractions from Tenebrio molitor. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 8, p. 1285–1297, 2016.

ZHANG, S., XU, Y., FU, Q., JIA, L., XIANG, Z. H., HE, N. J. Proteomic Analysis of Larval Midgut from the Silkworm (*Bombyx mori*). **Comparative and Functional Genomics,** 2011.

ZHAO, Y.; BOTELLA, M. A.; SUBRAMANIAN, L.; et al. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiology**, v. 111, n. 4, p. 1299–1306, 1996.

ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J.-E. Cowpea bruchid Callosobruchus maculatus uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 135–145, 2003.

ZHU, Y. C.; BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Insect biochemistry and molecular biology**,29(12), 1053-1063, 1999.

ZINKLER, D.; POLZER, M. Identification and characterization of digestive proteinases from the firebrat thermobia domestica. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 3, p. 669–673, 1992.