

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas

Felipe Rocha da Costa

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DE *Ulomoides
dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae)**

RECIFE
2014

Felipe Rocha da Costa

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DE *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientador: Prof^o Dr. Ricardo Yara

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Costa, Felipe Rocha da

Caracterização e purificação parcial de proteases de *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). / Recife: O Autor, 2014.

60 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Ricardo Yara

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências e anexos

1. Enzimas proteolíticas 2. Besouros 3. Medicina tropical I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Yara, Ricardo (coorient.) III. Título

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 462

FELIPE ROCHA DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DE *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado em: 27 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

Prof^a Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima (Titular Externo)
(Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE)

Prof^o Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Externo)
(Departamento de Bioquímica - UFPE)

*Dedico este trabalho a Evalda,
Vitoriano, Ana. Meus amados pais.
Minha querida irmã. São vocês que
fazem todo o esforço valer a pena.*

AGRADECIMENTOS

Ao “cara lá de cima”, que me concede a força e a coragem necessários para vencer os obstáculos que insistem a aparecer todos os dias.

Aos meus pais, Vitoriano e Evalda, pois seus ensinamentos e seus exemplos me tornaram a pessoa que sou e pelas batalhas vencidas desde meus tempos de colégio para que este momento se tornar-se possível.

A minha querida irmã, Ana, sempre ao meu lado me dando a força, a coragem e as broncas necessárias que me fazem sempre ir além.

A minha estimada madrinha, “Teca”, por toda sua ajuda nos momentos mais vulneráveis de minha vida e da vida de minha família.

Aos professores Tereza Correia e Ricardo Yara pela orientação e pela confiança em mim depositada.

À professora Cláudia Sampaio por me aceitar de volta, de braços abertos, a grande família do Laboratório de Biofísica-Química.

Ao professor Thiago Henrique Napoleão por ser sempre prestativo, atencioso, paciente e por manter as portas abertas sempre que a ele recorria.

Aos “mopis”, Pablo e Fábio, que com sua amizade me ajudam a perceber que somos tão velhos quanto quisermos ser.

Aos amigos da pós-graduação em ciências biológicas, Renan, Rafael “Japa”, Carina, Thiago Pajeú, Fernanda, Gilzane, pelos diversos momentos de descontração que vivemos durante os dois anos de mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica-Química, Renan, Rafael “Japa”, Natália, Paulo, Isabela, Gilvania, Aline, Emília, que tornavam as tardes de experimentos muito mais leves e produtivas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante meu curso de mestrado.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

Ulomoides dermestoides é um besouro cosmopolita, praga de produtos armazenados, nativo da Ásia. Popularmente conhecido como besouro do amendoim, é considerado um “remédio” na medicina popular sendo indicada sua utilização em casos como asma e artrite. Alguns trabalhos têm demonstrado que metabólitos obtidos a partir do *U. dermestoides* apresentam atividade biológica como, por exemplo, ação anti-inflamatória e citotóxica. Este trabalho teve como objetivo purificar proteases de *U. dermestoides* e caracterizar frente a substratos específicos, variação de temperatura e diferentes faixas de pH. Para tanto, uma criação de *U. dermestoides* foi mantida no laboratório de Engenharia Biomédica submetida a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade de 50-60%. O extrato foi preparado utilizando-se 10g de besouro triturados e homogeneizados em 20ml do tampão de extração (Tris-HCl 10mM, NaCl 130mM, KCl 5mM pH7,4) por 30min. Após centrifugação (8000 rpm, 20min) o sobrenadante foi coletado para realização dos testes propostos. A atividade proteolítica total foi avaliada utilizando-se o teste da hidrólise da azocaseína com leitura em comprimento de onda de 366nm. Os testes enzimáticos também foram realizados utilizando-se substratos específicos para serino proteases (Bapna/Tripsina e Sucphenan/Quimiotripsina) sendo a leitura realizada em comprimento de onda de 405nm. Para a caracterização térmica o extrato foi aquecido por 30min nas temperaturas de 40°C , 50°C , 60°C e 100°C . O pH ótimo foi determinado aplicando o extrato bruto a uma faixa de pH variando do pH1 ao pH10. A purificação foi realizada usando cromatografia em coluna de exclusão molecular HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR e em uma coluna de troca iônica DEAE HiPrep™ FF 16/10, ambos acoplados ao sistema AKTA-Prime. A leitura da atividade proteolítica mostra que o extrato de *U. dermestoides* apresentou elevada atividade (75,5U). A atividade proteolítica permaneceu mesmo após o material ser aquecido 100°C (18,3U). A atividade enzimática demonstrou que o este inseto possui pelo menos uma enzima da classe serino protease do tipo tripsina, porém não apresentou proteases do tipo quimiotripsina. A atividade enzimática revelou também que as serino proteases mantiveram sua atividade catalítica a 40°C e na faixa de pH entre o pH3 e o pH8. A purificação mostrou que a enzima obtida é pequena apresentado peso molecular aproximado de 20,6KDa após a exclusão molecular e 22,3 KDa após eletroforese. Por fim, a serino protease purificada apresentou $K_m=0,62 \text{ mM}$ e $V_{\max}=0,33 \times 10^{-3} \mu\text{mol BApNA/min}$. Os resultados obtidos apontam a necessidade de técnicas adicionais na purificação das enzimas de *U. dermestoides* visando a caracterização mais precisa da protease identificada e identificação e caracterização da protease termoestável.

Palavras-chave: *Ulomoides dermestoides*; Medicina tradicional; Protease de inseto.

ABSTRACT

Ulomoides dermestoides is a cosmopolitan beetle, pest of stored products and native from Asia. Popularly known as “*besouro do amendoim*” it is considered a medicine resource in folk medicine being indicated in cases such as asthma and arthritis. Some reports have demonstrated that metabolites obtained from the *U. dermestoides* exhibit biological activity eg. anti-inflammatory and cytotoxic activity. This paper aims to purify *U. dermestoides* proteases and characterize in relation to the specific substrates, variation of temperature and pH ranges and by eletrophoretic and zimography assays. For this purpose, Stock cultures of *U. dermestoides* were kept in the *Laboratório de Engenharia Biomédica* from *Universidade Federal de Pernambuco* at a relative humidity of 50-60% and temperature of 25 ± 2 °C. Raw peanuts were offered as food source to beetles. Adult males and females were crushed for preparation of extracts and homogenized in 20 ml of extraction buffer (10mM Tris-HCl, 130 mm NaCl, 5mM KCl, pH 7, 4) for 30min. After centrifugation (8000 rpm, 20 min) the supernatant was saved for later use. The proteolytic activity was assessed using the azocaseinolytic assay for general proteases, read at a wavelength of 366nm and assessed by the specific substrates BApNA and SucPHenan, read at a wavelength of 405nm. Extract thermal and pH characterization were performed by heating crude extract for 30 minutes at temperatures of 40°C, 50°C, 60°C and subjecting crude extract to a pH range from 1 to 10, respectively. Purification was carried out using gel filtration chromatography column HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR and an ion exchange HiPrepTM DEAE FF 16/10 column, both coupled to ÄKTA-Prime system. Proteolytic activity shows that the extract of *U. dermestoides* presents high proteolytic activity (75.5U). The proteolytic activity remains even when the material is heated to 100°C (18.3U). The enzyme activity demonstrated that this insect has at least one enzyme of the serine protease class of the trypsin but does not presents chymotrypsin type. The enzymatic activity also revealed that serine proteases maintained its catalytic activity at 40°C and at pH values ranging from pH3 and pH8 with maximal activity at pH=7. Purification showed that the enzyme obtained is small and presents approximate molecular weight of 20.6 kDa on gel filtration and 22.3 kDa on electrophoresis. Zimography assay displays tow bands presenting caseinolytic activity weighting 49,5 and 43,9, respectively. Finally, the purified serine protease showed $K_m = 0.62$ mM $V_{max} = 0.33 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol BApNA/min}$. The results indicate the need for additional techniques in order to completely purification of *U. dermestoides* proteases aiming to a more precisely characterization and identify and characterize the thermostable protease.

Keywords: *Ulomoides dermestoides*; Traditional Medicine; Insect Protease.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - <i>Ulomoides dermestoides</i> nos diferentes estágios evolutivos (1- Larva; 2- Pupa; 3- Adulto).....	31
Figura 2: Perfil dos principais componentes voláteis identificados na epicutícula de em <i>Ulomoides dermestoides</i>	33

NO ARTIGO

Figure 1 - <i>Ulomoides dermestoides</i> crude extract pH stability test.....	41
Figure 2: - Electrophoretic profile of <i>U. dermestoides</i> preparations obtained during purification process. SDS-PAGE of molecular mass markers (1), <i>U. dermestoides</i> crude extract (2), extract heated at 100°C (3).....	41
Figure 3: Zymography for proteases of <i>U. dermestoides</i> crude extract (A) and peak IV from gel filtration chromatography (B).....	42
Figure 4: Purification of <i>U. dermestoides</i> trypsin-like protease and electrophoretic profile of <i>U. dermestoides</i> preparations obtained during purification process. (A) Gel filtration chromatography of crude extract on a Hiperp 16/60 Sephacryl S-300 column coupled to ÄKTA Prime system. Fractions of 2.0 mL were collected. Chromatography was performed using 0.15 M NaCl. (B). Ion exchange chromatography of peak IV from gel filtration step on a Hiperp DEAE FF 16/10 column previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, also coupled to the ÄKTA Prime system. Absorbance 280 nm (back solid line) and trypsin-like activity (dotted line) are represented. Elution was performed using a 0-100% gradient of 1.0 M NaCl (grey solid line). Fractions of 2.0 mL were collected. SDS-PAGE of molecular mass markers (1). Peak IV from gel filtration chromatography (2) and peak II from ion exchange chromatography (3), all stained with Coomassie Brilliant Blue.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BAPNA	<i>N</i> -benzoil-DL-arginil- ρ -nitroanilida (do inglês <i>N</i> -benzoyl-DL-arginyl- ρ -nitroanilide)
BmNPV	Bombix mori nucleoployhedrovirus
Bmsp-2	Bombix mori Serine Protease 2
EBQ	Etil-1,4-Benzoquinona
FAP	Fibriblastin activation protein
GelE	Gelatinase E
HCV	Heptates C Virus
IgE	Imunoglobulina E
KDa	Kilo Dalton
MBQ	Metil-1,4-Benzoquinona
MMP-1	Matrix Metallo Protease 1
MMP-9	Matrix Metallo Protease 9
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Tampão fosfato de salina (do inglês <i>Phosphate saline buffer</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila (do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
SDS	Sulfato de sódico de dodecila (do inglês <i>dodecyl sodium sulphate</i>)
SUPHEPA	Ácido 4-({1-[(4-nitrofenil)amino]-1-oxo-3-fenilpropan-2-il} amino)-4-oxobutanóico (do inglês <i>4-({1-[(4-nitrophenyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-4-oxobutanoic acid</i>)
Tris	Trishidroximetilaminometano

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	15
--------------------	----

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS.....	17
-------------------	----

2.1 GERAL.....	17
----------------	----

2.2 ESPECÍFICOS.....	17
----------------------	----

CAPÍTULO III

3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
-------------------------------	----

CAPÍTULO IV

4. Artigo em preparação para ser submetido ao periódico <i>Insect Biochemistry and Molecular Biology</i>	35
--	----

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES.....	48
--------------------	----

CAPÍTULO VI

6. REFERÊNCIAS.....	49
---------------------	----

ANEXO I

Regras para publicação no periódico <i>Insect Biochemistry and Molecular biology</i> ...	56
--	----

ANEXO II

Zooterapia: Utilização de animais na prática médica popular (O que a fauna tem a nos oferecer).....	60
---	----

1. INTRODUÇÃO

“Toda sociedade humana que apresenta um sistema médico utiliza medicamentos feitos à base de animais”. Esta afirmação de Marques (1994) demonstra a importância da zooterapia no que se refere à busca de novos métodos complementares na medicina. A utilização de animais para fins medicinais está intimamente ligada ao conhecimento pertencente a diferentes grupos étnicos espalhados pelo globo.

Cada animal seja ele mamífero, réptil, molusco ou inseto pode contribuir significativamente na busca e descoberta de metabólitos bioativos de interesse médico e/ou industrial. Na verdade, quanto mais diversificado o grupo animal, maior a probabilidade de uma nova molécula ser descoberta, caracterizada e disponibilizada para diferentes finalidades (ALVES; DIAS, 2010).

Dentro desta realidade, o estudo de insetos, em particular aqueles utilizados na prática popular, apresentam-se como alternativa e/ ou ponto de partida para a obtenção de metabólitos bioativos baseado nas aplicações que os populares atribuem as variadas espécies por eles utilizadas (COSTA-NETO, 1999; COSTA-NETO; PACHECO, 2005).

Dentre as classes de metabólitos bioativos que se destacam podem-se citar as proteases de insetos. Esta classe de enzimas, em insetos, tem se mostrado como fontes promissoras de enzimas de interesse biotecnológico e industrial. Diversos exemplos podem ser citados como o caso da protease Per a 10 da *Periplaneta americana*, uma serino protease com potente atividade alergênica (SUDHA et al, 2008). Através de larvas de rainha de *Apis mellifera* foram isoladas proteases com capacidade de hidrolisar a geleia real e devido a isso podem ser usadas na manufatura comercial de mel (MATSUOKA et al, 2012). É também pertinente citar a ação antiviral de uma serino protease de *Bombyx mori*, onde a enzima foi isolada do suco digestivo da larva do inseto e apresentou ação contra um vírus que infecta o bicho da seda (NAKAZAWA et al, 2004). Estas são algumas características que apontam para a utilização de insetos para fins biotecnológicos.

Ulomoides dermestoides é um besouro pertencente à ordem Coleoptera, família Tenebrionidae, conhecido como praga de produtos armazenados. Uma importante característica sobre este inseto é sua aplicação como inseto medicinal tanto por grupos indígenas brasileiros quanto por grupos populares nativos da Ásia (COSTA-NETO; RESENDE, 2004; SANDRONI, 2001). Alguns relatos apontam para a presença de proteínas e metabólitos secundários do *U. dermestoides* com relevante ação biológica tanto no combate a células tumorais quanto no auxílio a depleção do processo inflamatório (VILLAVARDE et al, 2009; SANTOS et al, 2010).

O estudo apresentado nesta dissertação descreve a purificação parcial e caracterização de proteases do *U. dermestoides*. A investigação visou caracterizar protease presente no extrato bruto

do besouro quanto à massa molecular, sua classe enzimática, pH e temperatura ótimo e parâmetros cinnéticos (K_m e V_{max}).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Purificar e caracterizar proteases de *Ulomoides dermestoides*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Extrair proteases a partir de macerados de *U. dermestoides*.
- Caracterizar as proteases através do uso de substratos específicos para tripsina e quimotripsina, de eletroforese e zimografia;
- Purificar serino protease (trypsin-like) através de técnicas cromatográficas;
- Caracterizar frente à variação de temperatura e pH e determinar os parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e o K_m).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ZOOTERAPIA

O homem sempre buscou na natureza os recursos básicos a sua sobrevivência. Isso incluiu a utilização de plantas, animais e minerais na produção de remédios visando à cura de suas enfermidades. Durante muito tempo, uma atenção maior foi voltada à divulgação da flora medicinal, relegando-se o estudo dos animais medicinais a um segundo plano (COSTA NETO, 1999).

A utilização de insetos medicinais está intimamente relacionada à cultura de diversos grupos humanos e como tal sua pertinência não deve ser descartar. O crescente número de trabalhos relacionados com a utilização medicinal de insetos (entomoterapia) demonstra como as comunidades humanas desenvolveram um acurado saber acerca das propriedades terapêuticas e medicinais dos animais e plantas, e o uso desses recursos naturais na medicina tradicional pode representar uma opção na complementação de medicamentos que a indústria farmacêutica coloca à disposição da população a altos custos (COSTA NETO; PACHECO, 2005; ALVES; DIAS, 2010).

O século 21 é uma era na qual grande investimento tem sido aplicado na pesquisa de plantas medicinais em várias partes do mundo. Tais estudos são baseados principalmente em fontes de informação tradicional, étnicas e históricas. Pesquisas acadêmicas sobre o uso medicinal de animais e seus produtos não devem ser negligenciados e sim considerados como um ramo complementar de conhecimento (LEV, 2003). O conhecimento tradicional sobre animais pode auxiliar na localização de agentes terapêuticos em potencial e também preencher lacunas do conhecimento no que concerne o uso desse tipo de recurso (ALVES; ALVES, 2011).

No Brasil, diversas espécies animais são utilizadas como fonte de recursos zoterápicos e em especial os insetos, onde mais de 50 espécies compõem o acervo utilizado no tratamento dos mais diversas condições, tais como: reumatismo, gripe, asma, impotência, problemas cardíacos entre outros (COSTA NETO; RESENDE, 2004).

No Brasil, a utilização de insetos na zooterapia está intimamente relacionada a grupos étnicos ou a povoados. No município de Santa Teresinha, Bahia, em entrevistas com moradores desse povoado, foi relatado o uso de 27 espécies como recursos entomoterapêuticos. Dentre esses recursos foram citados desde a barata (*Periplaneta americana*), passando pela formiga (*Atta* spp.) e também pela abelha (*Apis mellifera scutellata*) (Costa Neto; Pacheco, 2005). Já na tribo Pakararé, natural do nordeste da Bahia, a entomoterapia representa a principal fonte zoterápica nesta comunidade, uma vez que a utilização de insetos corresponde a cerca de 37% dos recursos faunísticos, os quais são usados no tratamento dos mais diversos males (COSTA NETO, 1999).

3.2 BIOTECNOLOGIA AMARELA

Biotecnologia amarela refere-se ao uso de insetos e de produtos obtidos a partir de insetos (substâncias cuticulares, feromônios, moléculas de defesa, proteínas e genes) aplicados nos diferentes ramos da biotecnologia. Insetos têm sido usados na medicinal tradicional desde tempos ancestrais. Na China, por exemplo, mais de 300 insetos divididos em 63 famílias são ou já foram usados para fins medicinais, sejam inteiros ou através do uso de infusões. Devido à relevância deste grupo, métodos de criação em larga escala e cultivos de insetos medicinais são desenvolvidos a fim de suprir a crescente demanda por novos fármacos e drogas de origem entomológica (FENG et al, 2009).

Devido ao interesse no uso de produtos derivados de insetos, tanto na academia quanto na indústria, que estratégias para o cultivo bem sucedido de linhagens celulares entomológicas são empregadas. Como exemplo pode-se citar o caso da “*High Five cells*”, um sistema de células de inseto associadas ao baculovirus que se mostra como uma ferramenta da biologia molecular e celular para suprir a demanda de produtos comerciais como reagentes, fármacos e vacinas de uso humano e animal, como vacinas contra o vírus da gripe humana e vacinas contra os vírus das hepatites B e C (GRANADOS; LI; BLISSARD, 2007). Outra vantagem do uso biotecnológico de linhagens celulares de insetos é a capacidade que estas células apresentam de aplicar as modificações pós-translacionais necessárias como formar pontes dissulfeto e gerar alto rendimento na produção do produto desejado, características não observadas em células bacterianas e de mamíferos, respectivamente (BECKER-PAULY; STOCKER, 2011).

A biotecnologia de insetos também pode ser aplicada na busca por novos métodos de produção de biocombustíveis. Gorduras de insetos, utilizadas como fonte reserva de energia, na metamorfose e na reprodução, podem ser utilizadas na produção de biodiesel a partir de rejeitos orgânicos e servir como possível fonte renovável para produção deste combustível (LI et al., 2011). Além disso, insetos também podem ser utilizados como agentes de pré-tratamento de matéria-prima na produção de bioetanol, otimizando o processo, aumentando a qualidade do produto final e diminuindo custos (SCHARF; BOUCIAS, 2010).

Biotecnologia amarela não se resume apenas ao microscópico ou molecular. Uma das aplicações mais rudimentares da biotecnologia de insetos é a “*maggot therapy*” ou biocirurgia. Este procedimento consiste na utilização de larvas vivas da mosca-varejeira (*Lucilia sericata*; Diptera: Calliphoridae) para curar feridas de difícil cicatrização, infeccionadas ou necrosadas principalmente decorrentes da diabetes ou úlceras. É provável que o processo biocirúrgico ocorra devido à produção de moléculas de *L. sericata* que agem mediando o processo de cicatrização dessas feridas (VILCINSKAS, 2011).

Devido a grande diversidade de espécies de insetos, estes são uma interessante e promissora fonte de produtos naturais ativos de baixo peso molecular que podem ser tanto sintetizados pelo inseto quanto produzido por micro-organismos associados. Muitos metabólitos com potencial farmacêutico podem ser obtidos através da utilização de insetos, bem como estruturas desses metabólitos podem ser utilizadas como base para novos compostos sintéticos (DETTNER, 2011). A medicina tradicional chinesa tem utilizado esses tipos de compostos por mais de 2000 mil anos e ainda assim muito pouco se sabe sobre as bases bioquímicas e moleculares envolvidas na produção destes metabólitos (BODE, 2011). Embora metabólitos sintéticos obtidos de humanos, porcos e animais já tenham sido usados em formulações farmacêuticas e testados em pesquisa clínica o mesmo não ocorreu com metabólitos de origem entomológica, visto que testes com essas moléculas não passaram da fase de experimentação animal (HULL; KATETE; Ntwasa, 2012).

Por ser um grupo capaz de colonizar praticamente todo tipo de nicho presente na Terra os insetos desenvolveram enzimas que os tornam capazes de se alimentar de qualquer fonte nutritiva. Este fato torna enzimas de insetos alvos da biotecnologia alimentícia e industrial no que concerne a aplicação desses metabólitos na hidrólise do glúten, proteína de reserva causadora de distúrbios intestinais além de enzimas que podem ser utilizadas no beneficiamento da celulose, polímero mais abundante do planeta (MIKA; ZORN; RHUL, 2013).

3.3 CLASSES DE ENZIMAS PRESENTES EM INSETOS

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores das reações dos sistemas biológicos. Estando presentes no centro de cada um dos sistemas bioquímicos, elas aceleram reações otimizando assim a conversão de substrato em produto. O estudo das enzimas tem imensa importância prática, visto que em diversas doenças pode haver deficiência e/ ou ausência de enzimas (NELSON; COX, 2011).

Devido a sua grande diversidade, as enzimas podem ser classificadas em grandes grupos de acordo com o aminoácido alvo do sítio catalítico no qual atuam. Sendo assim, os principais grupos são: serino protease, cisteino proteases, aspartil proteases e metalo proteases, sendo as duas primeiras as mais comuns em insetos. Cada grupo possui características próprias no que diz respeito ao mecanismo de ação e substratos sob os quais atuam, sendo isso o que torna as enzimas verdadeiramente versáteis (MOCHIZUKI, 1998).

3.3.1 SERINO PROTEASES

Mais de um terço das enzimas proteolíticas conhecidas são serino proteases que são assim denominadas devido a presença do aminoácido nucleofílico Serina no sítio ativo dessas enzimas e de acordo com o mecanismo catalítico pode-se subdividir este grupo em quatro “clãs” distintos: tripsina, subtilina, carboxipeptidase Y e Clp protease (HEDSTROM, 2002). Entre essas, as tripsinas correspondem ao tipo mais predominante existente estando presente em diversos processos tais como: digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise, apoptose e imunidade (CERA, 2009).

As tripsinas são amplamente distribuídas entre espécies de insetos tendo sido descritas sua presença em várias espécies. Ao contrário de seu homólogo de mamíferos, tripsinas de insetos tem preferência por substratos grandes em detrimento de substratos pequenos. Isso ocorre pois devido a coevolução planta-inseto, na presença de inibidores oriundos de vegetais tornou-se essencial uma mudança na conformação proteica a fim de possibilitar o processo digestivo por parte dos insetos (LOPES; SATO; TERRA, 2009).

3.3.1.1 APLICAÇÕES PARA SERINO PROTEASES

Quando se refere a insetos, fica evidente a função das serino proteases principalmente atuando como enzimas digestivas. Porém, devido a sua grande versatilidade, esta classe apresenta diferentes papéis quando se fala de sua ação em outros organismos (ALMONTE; SWEATT, 2011).

A FAP (Fibroblast activation protein) humana é uma glicoproteína integral de membrana pertencente a família das serino proteases. Sua importância é que esta proteína é expressa na membrana das células tumorais e carcinomas epiteliais, mas ausente em células epiteliais normais e outros tecidos, o que torna esta enzima um alvo não só diagnóstico, mas também terapêutico para o acompanhamento do carcinoma epitelial (CHENG et al., 2002).

Outra relevante serino protease é a HtrA2/Omi, uma proteína mitocondrial relacionada ao processo apoptótico, participando da promoção da morte celular (LOO et al., 2002). Em estudo com células de camundongos sem expressão desta enzima, foi evidenciado que a perda da HtrA2/Omi não diminuiu a taxa de morte celular. Pelo contrário, a falta da enzima levou os camundongos a exibirem um fenótipo semelhante ao Parkinson, onde se concluiu que a citada enzima tem como papel mas importante na prevenção de estresse celular (MARTINS et al., 2004).

No vírus da Hepatite C (HCV) a serino protease NS3/4A desempenha papel fundamental no processo infeccioso. Através da ação desta enzima o HCV é capaz de clivar receptores celulares ligados ao sistema imune responsáveis pela detecção da invasão viral. Com a sinalização deficiente,

o sistema imune não reconhece a infecção que se instala no organismo o que favorece a instalação do vírus nos hepatócitos e consequente disseminação da doença (LI et al., 2005).

A relevância clínica da NS3/4A reside no fato que esta protease foi elencada com alvo para o tratamento contra o HCV. O uso do inibidor VX-950, possível de ser administrado por via oral, mostrou significativa inibição na replicação do HCV o que tornou este inibidor candidato para uma nova terapia contra a hepatite C (PERNI et al., 2006).

Serino proteases também desempenham papel em transplantes alogênicos. De acordo com Mueller et al. (1988), linfócitos T são capazes de infiltrar corações transplantados através da presença de serino proteases. Nesse caso, essas enzimas atuam como moléculas que não reconhecem o enxerto estimulando as células efetoras a agirem contra o órgão transplantado e assim levando a provável rejeição. Por outro lado, a presença destas enzimas sinalizam células deficientes e possibilitam uma terapêutica mais direcionada.

Devido ao relevante papel das serino proteases em processos fisiológicos, estas enzimas também estão envolvidas em processos fisiopatogênicos do sistema nervoso central. Devido ao papel central que desempenha, a atividade anormal dessas moléculas contribui com o desencadear de alterações como as doenças de Alzheimer e Parkinson, danos traumáticos cerebrais e derrame, além de participarem da modulação da sinapse e do comportamento (ALMONTE; SWEATT, 2011).

3.3.2 CISTEINO PROTEASES

As cisteíno proteases compreendem uma classe de exopeptidases que clivam cadeias polipeptídicas na região C terminal. Muitos autores as caracterizam como enzimas dependentes do grupo tiol (-SH) para que sua catálise ocorra. Cisteíno proteases já foram descritas em todos os grupos animais, desde vírus (Hepatite A) até mamíferos (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997).

3.3.2.2 APLICAÇÕES PARA CISTEINO PROTEASES

Cisteíno proteases têm papel fundamental na biologia humana. Devido a descoberta de novas classes para este tipo de enzima hoje sabe-se que elas desempenham importante papel em diversos processos tais como: apoptose, resposta imune via MHC classe II e remodelamento no desenvolvimento ósseo (TURK; TURK; TURK, 2001). Após muitos anos sendo conhecidas como enzimas inespecíficas presentes em lisossomos, as cisteíno proteases passaram a ser identificadas em inúmeros processos celulares levando ao entendimento de que o desenvolvimento de inibidores

específicos prometem fornecer novas drogas que modulem a imunidade, osteoporose e inflamação crônica (CHAPMAN; RIESE; SHI, 1997).

O papel das cisteíno proteases também é muito diverso. Em plantas, já foi relatada a ação dessa classe de enzimas no processo de morte celular programada ou apoptose (SOLOMON et al., 1999). Através da ativação de um grupo dessas enzimas, as células da soja são capazes de programar e regular todo o processo que leva à morte celular.

A indústria alimentícia também faz bom uso das cisteíno proteases. Uma cisteíno protease do trigo, *Triticum aestivum*, purificada através da cromatografia de troca iônica e exclusão molecular, apresentou bom rendimento, temperatura e pH ótimos respectivamente de 50°C e 4.4, resistência a inibição por diversos cátions e inibidores específicos para outras classes de proteases. É esse conjunto de características que apontam a protease de *T. aestivum* como candidata a utilização em processos da indústria alimentícia (FAHMY; ALI; MOHAMED, 2004).

Outras cisteíno proteases de interesse na indústria são a Proceraína (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003) e a Proceraína B (SINGH et al. 2010), ambas extraídas do látex da *Calotropis procera* (“bombardeira”; “pomo de Sodom”). As duas enzimas, embora extraídas da mesma estrutura vegetal apresentam diferenças no que diz respeito a temperatura e pH ótimo, padrão de inibição, ponto isoelétrico e preferência por substrato. De maneira geral, as duas proceraínas apresentam características semelhantes à enzima da *T. aestivum*, o que as elevam a candidatas a aplicação na indústria, como na produção de queijo e na indústria de solventes (SINGH; DUBEY, 2011).

Processos inflamatórios também ocorrem devido à ação de cisteíno proteases. Em estudo de Cunningham et al. (2012), foi demonstrado que a presença desta classe de enzimas em ratos é capaz de sensibilizar células efectoras do processo inflamatório que ocorre nos pulmões, levando a uma resposta mais rápida e intensa do sistema imune. A papaína, uma cisteíno protease clássica, também já foi caracterizada como um agente intensificador da inflamação quando ratos foram submetidos à inalação dessa enzima (KARAKELIDES et al, 2009).

Cisteíno proteases desempenham numerosas funções na fisiologia de parasitas. Essas proteases tem papel fundamental na imunoinvasão, encistamento/ exocistamento, além da invasão em células e tecidos. Por serem imunogênicas, normalmente essas enzimas são utilizadas como marcadores sorológicos para fins diagnósticos ou alvos para vacinação (SAJID; MCKERROW, 2002).

Em virtude do relevante papel dessa classe em parasitas, drogas com ação inibidora para cisteíno proteases são desenvolvidas a fim de combater o invasor. Um exemplo que pode ser citado é o uso de inibidores da cruzaina, cisteíno protease do *Trypanosoma cruzi*, os quais bloqueiam a

ação da enzima, revertendo a fase aguda da doença e diminuindo as complicações geradas na fase crônica (ENGEL et al., 1998).

3.3.3 ASPÁRTICO OU ASPARTIL PROTEASES

Aspártico proteases são enzimas de característica ácida, encontradas em diversas formas de vida (vírus, fungos, plantas e animais) e são muito empregadas em numerosos tipos de processos industriais, notadamente na indústria alimentícia (YEGIN et al., 2011). Dentre os seus representantes mais conhecidos pode-se citar a pepsina, quimosina e renina. Sua ação catalítica está associada a dois resíduos aspárticos ácidos (Asp32; Asp 215) presentes dentro de seu sítio ativo (POLGÁR, 1987).

3.3.3.1 APLICAÇÕES PARA ASPARTIL PROTEASES

A principal aplicação industrial das aspartil proteases reside na indústria alimentícia. Independente da fonte onde uma nova enzima desta classe é encontrada, as atenções se voltam para a possível aplicação da mesma principalmente na produção de queijo (YEGIN et al., 2011).

De diversas fontes é possível se obter aspartil proteases para a produção de queijo, sendo diversas também as características dessas enzimas. Aquela extraída do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 é uma enzima termofílica (70°C), de pH 5,7 como ótimo e na presença de CaCl₂ apresenta atividade máxima (MERHEB-DINI et al., 2010).

Por outro lado, a enzima extraída do látex da *Ficus racemosa* (figueira), apresenta atividade ótima a 60°C, pH ótimo entre 4,5-6,5 e atividade inalterada na presença de cátions (DEVARAJ; GOWDA; PRAKASH, 2008). Tais características, como ampla faixa de pH, estabilidade térmica e elevada atividade proteolítica, são aquelas desejáveis para a aplicação de uma protease em processos industriais (CHITPINITYOL; CRABBE, 1998).

Outra aplicação interessante é a produção de etanol baseada em aspartil proteases. No relato de Guo et al. (2011), um gene codificante para essa classe de proteases foi inserido em leveduras produtoras de etanol afim de otimizar o processo. O sucesso do trabalho foi visualizado quando observou-se que a levedura que expressa a aspartil protease tem taxa de crescimento, contagem de células e produção de enzimas elevada levando, conseqüentemente, a uma maior produção de etanol.

Conhecer as características das aspartil proteases também apresenta relevância médica. Em estudos de proteases produzidas pelo *Plasmodium falciparum* (agente causador da malária), foi visto que nas formas evolutivas esquistozoíta e trofozoíta essas enzimas são primordiais para o

desenvolvimento das formas evolutivas e para a instalação e propagação do processo infeccioso (PATTANAIK et al, 2003).

Essa classe de protease também pode atuar no processo de invasão a um organismo hospedeiro, como ocorre com o *Trichoderma hazianum*. Este fungo micopatogênico secreta no meio um coquetel de proteases rico em aspartil proteases que estão envolvidas na degradação e penetração na célula hospedeira (SUÁEZ et al, 2005).

Processos alérgicos podem ocorrer à custa da ação de aspartil proteases. Em dois estudos utilizando o tomate (WELTER et al, 2013) e a alface (MUÑOZ-GARCÍA et al., 2013), foi relatado que a presença de aspártico proteases presentes nesses vegetais são capazes de ligar a IgE, confirmando assim a ação inflamatória que alguns indivíduos apresentam ao consumir esses produtos. Com base nesses estudos, é possível definir novas estratégias a fim de desenvolver novos métodos diagnósticos para alergia baseado no uso de proteases.

3.3.4 METALO PROTEASE

Metalo proteases são uma diversa e grande família de enzimas que desempenham variadas funções biológicas, tais como, remodelamento de tecidos, sinalização para peptídeos hormonais e câncer, além de atuarem também nos processos de inativação de zimogênios e proteínas endógenas (SAGHATELIAN et al, 2004).

Sua ação catalítica está relacionada a presença de íons metálicos (Zn^{+2}/Mn^{+2}) no centro ativo da enzima. Então, na presença do íon, essas enzimas clivam ligações peptídicas na região C-terminal dos substratos desempenhando assim sua função no organismo (KHAN; JAMES, 1998).

3.3.4.1 APLICAÇÕES PARA METALO PROTEASES

A fim de ilustrar o relevante papel das metalo proteases em diferentes processos biológicos e industriais, muitos exemplos podem ser citados. Para começar pode-se citar o caso da gramelisina I, presente no veneno da serpente *Trimeresurus gramineus*. A gramelisina I é capaz de induzir a apoptose em células epiteliais humanas em cultura. Esta ação é importante, pois sabe-se que a apoptose em células epiteliais está envolvida na regulação da angiogenese e reestruturação vascular (WU et al, 2001).

Metalo proteases também estão envolvidas em processos aterotrombóticos e de inflamação. A MMP-1 (Matrix metalloprotease-1) está presente na superfície das plaquetas na forma de zimogênio e quando ativada, ela promove o processo de agregação plaquetária, importante no processo de coagulação sanguínea (TRIVEDI et al, 2009).

Em relação a processos inflamatórios, pode-se citar o exemplo da MMP-9 (Matrix metalloprotease-9). Esta enzima, presente em diversas desordens que envolvem as vias aéreas, promove a inflamação através do estímulo a produção do fator de crescimento β_1 e através da inibição do fator de crescimento epidérmico e seus receptores (PERNG et al, 2011).

Por outro lado, a gelatinase (GelE), metalo protease produzida pela bactéria *Enterococcus faecalis*, contribuiu para o processo de inflamação intestinal (colite). Através de estudo utilizando ratos imunodeprimidos, foi observado que a GelE atua comprometendo a integridade da barreira intestinal através da translocação de receptores associados à permeabilidade celular (STECK et al, 2011).

Quanto à aplicação industrial das metalo proteases pode-se citar a Ps5. A Ps5 é uma metalo protease alcalina ativada a frio. Produzida pela bactéria *Pseudomonas ludensis*, possui as seguintes características: 46KDa de peso, atividade máxima a 30°C e pH 10,4 mantendo sua atividade por mais de 60 dias a 4°C após vários ciclos de congelamento/ descongelamento. Na presença de Ca^{2+} a Ps5 apresentou atividade em boa faixa de temperatura (25-40°C) e pH (7-11). Além disso, a Ps5 manteve sua atividade quando exposta a detergentes não-aniônicos e branqueadores, características promissoras para aplicação industrial (YANG et al, 2010).

Outra metalo protease de aplicação industrial foi obtida a partir da bactéria *Microbacterium* sp. A queratinase purificada apresenta as seguintes características: 42KDa de peso molecular, máxima atividade a 50°C e pH 7,5 e possui atividade ligada à presença do Zn^{2+} e Mg^{2+} . Quando a atividade queratinolítica foi avaliada, através do uso de penas como substrato, a mesma mostrou-se eficiente na hidrólise do material. Logo, estes resultados implicam em uso potencial desta enzima no tratamento de rejeitos ricos em queratina e além de suplementação ou bioconversão em produtos de valor agregado (THYS; BRANDELLI, 2006).

3.4 ENZIMAS EM INSETOS

Os estudos sobre enzimas em insetos abrangem tanto insetos praga, insetos utilizados na prática medicinal popular e aqueles explorados economicamente. Devido a características marcantes relacionadas a cada grupo, o estudo de suas enzimas é considerado como ponto de partida na busca por metabólitos bioativos de origem entomológica (VINOKUROV et al, 2006a; LI et al, 2011).

3.4.1 *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor é um besouro praga de produtos armazenados, principalmente aveia e trigo pertencente à ordem Coleoptera, família Tenebrionidae. Seu conteúdo de enzimas digestivas tem como principal grupo os da serino proteases. Porém, devido a sua preferência por sementes ricas em inibidores dessa classe também pode-se encontrar cisteino proteases nessa espécie como um mecanismo compensatório que permite ao inseto parasitar aquele vegetal (THIE; HOUSEMAN, 1990).

As enzimas digestivas do *T. molitor* possuem as seguintes características: cisteino proteases estão presentes na porção anterior do intestino do inseto onde o pH 5,9 torna o lúmen ácido. Duas enzimas diferentes estão presentes, uma com 31 kDa e outra com 51kDa. Já suas serino proteases (tripsina e quimiotripsina) estão presentes na porção posterior do intestino onde o pH 7,9 torna o lúmen alcalino, ideal para sua atividade (TERRA; CRISTOFOLETTI, 1996).

Ao estudar a diversidade de enzimas digestivas de *T. molitor*, VINOKUROV et al. (2006a) sugeriram que a digestão neste inseto ocorre devido a ação de um complexo sistema enzimático. Isso acontece pois no intestino do inseto ocorre uma forte variação do pH de 5,2 na porção anterior até pH 9 na porção posterior. Adicionalmente, o mesmo estudo aponta que a ação de cisteino proteases é predominante na porção anterior enquanto ação de serino proteases predomina na porção posterior.

Esses besouros têm como alvo de sua dieta as proteínas de reserva dos grãos armazenados, como a globulina 12S de aveia. Devido à hidrólise dessas proteínas de reserva ser um evento complexo que desencadeia a ativação e desativação de vários fatores, sugere-se que o *T. molitor* desencadeia um processo hidrolítico baseado na formação de um complexo enzimático, valendo-se na ação de várias proteases o que permite a hidrólise do substrato seja iniciada na porção anterior do intestino do inseto (VINOKUROV et al., 2006b).

3.4.2 GÊNERO *Tribolium*

As proteases de dois besouros do gênero *Tribolium*, *Tribolium castaneum* e *Tribolium confusum*, também foram caracterizadas em relação à organização espacial. O pH ao longo do conteúdo intestinal nas duas espécies varia de 5,6 a 7,5 com atividade ótima em pH 4,1. Em condições ácidas a atividade se deu por ação de cisteino proteases enquanto que em condições alcalinas a atividade foi dada por serino proteases. Um conjunto de cisteino e serino proteases

(média de 9 enzimas por besouro) foi identificado nesses insetos sugerindo que um complexo enzimático atua no processo digestivo de insetos do gênero *Tribolium* (VINOKUROV et al., 2009).

3.4.3 *Cynaesus angustus*

Cynaesus angustus (Coleoptera: Tenebrionidae), besouro da farinha preta, é uma praga típica da América do Norte que afeta campos de agricultura de algodão e que acaba afetando também áreas residenciais. Na tentativa de controlar esta praga, estudos visando a caracterização de suas enzimas digestivas foram realizados. Quando submetido à dieta suplementada com inibidores para serino, cisteíno e aspartil proteases, houve inibição importante para aspártico e serino proteases e menor inibição para cisteíno proteases. Devido a este padrão de inibição pode-se afirmar que cisteíno proteases são secundárias no processo digestivo do *C. angustus* e que serino e aspartil proteases ocorrem constitutivamente neste inseto (OPPERT; WALTERS; ZUECHER, 2006).

3.4.4 *Helicoverpa armigera*

No estudo de Johnston et al. (1991), uma serino proatease de *Helicoverpa armigera* foi extraída e parcialmente purificada. Em sua caracterização utilizando BApNA como substrato, o pH ótimo de atuação ficou entre pH 9,5-10. Quando testado para outros tipos de substrato (SUPHEPA) não foi evidenciada reação mostrando que aquele inseto possui enzimas do tipo tripsina, mas não possui do tipo quimotripsina.

Ao aprofundar os estudos sobre as proteases de *H. armigera*, Patankar et al (2001), avaliou a maquinaria enzimática desta praga quando a mesma é submetida a diferentes tipos de dieta, a saber: grão-de-bico, ervilha-de-pombo, algodão e quiabo. Este estudo revelou que embora serino proteases sejam predominantes em quantidade e importância no processo enzimático, quando a praga foi alimentada com ervilha-de-pombo também pôde ser detectada a presença de cisteíno, aspártico e metalo proteases em menor quantidade. Esta diversidade mostra que na escolha do melhor tipo de inibidor deve-se levar em consideração o tipo de vegetal que o inseto está se alimentando.

Devido à plasticidade da maquinaria enzimática de *H. armigera* estudos visando encontrar inibidores eficientes têm sido desenvolvidos. Quando as enzimas desta praga foram submetidas aos inibidores de grão-de-bico (TELANG et al., 2003) e inibidor do feijão alado (GIRI et al, 2003), foi observado a inibição das serino proteases presentes no intestino do inseto. Contudo, uma nova classe de proteases, elastase, não só foi resistente a tentativa de inibição como também hidrolisou o inibidor ao qual foi submetido.

3.4.5 *Spodoptera littura*

Spodoptera littura é um tipo de mariposa que devasta plantações de algodão e ocorre principalmente em território Português. Devido à necessidade de controle desta praga o conteúdo de enzimas intestinais de suas larvas foi caracterizado. Três proteases, que atuam em pH elevado (pH 9-11) foram purificadas pelos métodos de exclusão molecular e troca iônica. Com peso molecular estimado de 17 kDa, 21 kDa e 53 kDa, as três enzimas foram inibidas pelo inibidor para tripsinas PMSF, sendo assim classificadas como serino proteases (AHMAD, SALEEMUDDIN ; SIDDI, 1980). Logo, esta larva apresenta grande sensibilidade quando o inibidor de tripsina da soja (MCMANUS; BURGESS, 1995) ou o inibidor do melão-de-são-caetano (TELANG et al., 2003) estão presentes na dieta, uma vez que esses inibidores retardam o crescimento do animal, sua taxa de fecundidade e fertilidade.

3.4.6 *Bombyx mori*

Três proteases do bicho da seda (*Bombyx mori* L.) foram parcialmente purificadas e caracterizadas. Embora possuindo diferenças no que diz respeito à especificidade de substratos, efeito de inibidores e influência de cátions bivalentes essas proteases foram classificadas como serino proteases, fato confirmado uma vez que as três enzimas foram inibidas pelo inibidor de tripsina da soja (EGUCHI; IWAMOTO, 1982).

Foi relatado que uma serino protease do suco intestinal de larvas *B. mori* apresenta atividade antiviral. Através do estudo da BmSP-2 (*Bombyx mori* serine protease-2), uma enzima clonada a partir da sequência de cDNA, mostra que enzimas digestivas de *B. mori* podem desempenhar papel importante no combate a infecção pelo BmNPV (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus), evitando ou diminuindo perdas na produção de seda. Embora se saiba que a atividade antiviral da BmSP-2 esteja relacionada a ligação desta enzima ao substrato luciferase presente na cápsula viral, o real mecanismo de inativação ainda é incerto. Mas cogita-se que a presença da BmSP-2 suprime a ligação da proteína viral a parede epitelial do intestino do inseto fornecendo proteção ao animal nos estágios iniciais da infecção pelo BmNPV (NAKAZAWA et al., 2004).

3.4.7 *Apis mellifera*

Apis mellifera é a abelha comum produtora de mel. Este inseto usa no seu processo digestivo enzimas do tipo serino proteases. Devido à presença de diversos inibidores para esta classe em plantas de interesse comercial, estudos foram realizados visando esclarecer os efeitos desses

inibidores nesses insetos. Ao submeter abelhas à ingestão da cistatina da clara de ovo, da orizacistatina I e do inibidor da soja tipo Bowman-Birk foi evidenciado que exposição em curto prazo a esses inibidores não surtiu efeitos nas abelhas ao passo que a exposição em longo prazo leva a uma mudança na maquinaria enzimática, o que incapacita os animais a digerir alimento da dieta o que eventualmente acaba levando a mortalidade dos indivíduos (GIRARD et al., 1998).

Devido a sua importância industrial, as enzimas envolvidas na hidrólise da geleia real de *A. mellifera* foram caracterizadas. A partir de homogenatos de larvas da rainha foi possível vislumbrar a atividade hidrolítica do material. Adicionalmente, após purificação em coluna catiônica seguida por uma coluna de exclusão molecular, foram obtidas duas enzimas, uma com atividade carboxipeptidase A e outra com atividade quimiotripsina. As duas enzimas purificadas são passos importantes no aperfeiçoamento e produção em larga escala da manufatura de mel real baseado na utilização de enzimas das próprias abelhas (MATSUOKA et al., 2012).

Além do característico papel industrial de enzimas de abelha, aplicações biotecnológicas também surgem como alternativa. Através da caracterização de uma serino protease presente no veneno da abelha, observou-se dupla função: fator ativador de profenoloxidase, que em insetos é responsável pela modulação e ativação do sistema imune; e em mamíferos ocorre ação fibrin(ogen)olítica, levando a degradação da fibrina e de seus derivados podendo atuar em processos trombóticos e ateroscleróticos. Estes dados apontam como abelhas se defendem de agressores (insetos ou humanos) e revelam uma nova fonte para estudos biotecnológicos (CHOO et al., 2010).

3.4.8 *Periplaneta americana*

A maquinaria enzimática da barata, *Periplaneta americana* é complexa, versátil e baseada na ação de serino proteases (HIVRALE et al., 2005). Em estudo visando à busca por novos inibidores para insetos causadores de perdas econômicas, diferentes dietas suplementadas com sementes foram oferecidas ao inseto. Através da técnica do filme de raio X em gel foi possível identificar através da formação das bandas a inibição de serino proteases mas também foi possível visualizar novas bandas, sugerido um mecanismo compensatório do inseto frente a adversidade imposta através da produção de outras proteases (HIVRALE et al., 2011).

Devido à diversidade das enzimas digestivas de *P. americana*, muitos estudos focam na capacidade alergênica dessas enzimas já que elas podem levar ao desenvolvimento de asma ou iniciar um episódio de crise alérgica (JEONG; KIM; YONG, 2010). Essa indução pode ocorrer uma vez que as proteases da barata tem a capacidade de se ligarem aos receptores das células deflagradoras do processo inflamatório, como os eosinófilos, iniciando ou estimulando a cascata de eventos responsável pela crise alérgica (WADA et al., 2011).

Para reforçar o papel das serino proteases de *P. americana* como importantes alérgenos pode-se citar a proteína Per a 10. Per a 10 é uma serino protease de aproximadamente 28kDa isolada do extrato de corpo inteiro da barata que apresenta elevada capacidade de deflagrar reação alérgica através da estimulação da liberação da histamina e de interleucinas pró-inflamatórias. Com isso, é possível utilizar a Per a 10 para fins diagnósticos e na tentativa de elucidar os mecanismos fisiológicos que levam à inflamação (SUDHA et al., 2008).

Além da importância médica de serino protease de barata vale ressaltar sua importância industrial. No relato de Sanatan et al. (2013), uma serino protease de barata com as seguintes características foi isolada: 27,8 kDa de peso molecular, pH e temperatura ótimos de 8,0 e 60°C, respectivamente, merecendo destaque a capacidade desta enzima ser estável na presença de agentes detergentes, oxi-redutores e branqueadores além de ser estável na presença de solventes orgânicos. Estas características apontam para a possibilidade de se utilizar enzimas de insetos para fins industriais.

3.5 BESOURO DO AMENDOIM, *Ulomoides dermestoides*

Ulomoides dermestoides é um besouro pertencente à ordem Coleoptera, família Tenebrionidae, encontrado em várias partes do mundo e originário da região do Oriente. Frequentemente considerado uma praga de produtos armazenados, como o milho, a aveia e o amendoim, é popularmente conhecido como “besouro do amendoim”. Através do conhecimento popular é tido como “remédio” para diversas doenças, como leucemia, asma, artrite e impotência (ANDRADE, 1982). Além disso, também já foi relatada a ação anti-inflamatória da fração hidrossolúvel de *U. dermestoides* em ratos albinos (SANTOS et al., 2010).



Figura 1: *Ulomoides dermestoides* nos diferentes estágios evolutivos (1- Larva; 2- Pupa; 3- Adulto).

Fonte: <http://1.bp.blogspot.com/-cApBs7xifiA/TkLrG-YdIrl/AAAAAAAAALY/HH6JVvwtFAk/s320/bbbb.jpg>

O consumo de *U. dermestoides* como produto medicinal é antigo e bastante difundido. Diversos povos, como os chineses, malaios e índios nativos brasileiros, utilizam esse besouro para fins medicinais visando o tratamento de condições tais como: impotência, irritação nos olhos e reumatismo (COSTA NETO; RESENDE, 2004). Embora exista uma gama de aplicações para o *U. dermestoides* é importante lembrar que a ingestão de besouros vivos representa um risco potencial para a saúde pública visto que o besouro pode servir de hospedeiro para vermes capazes de infectar humanos como o *Hymenolepis diminuta* (CHU; PALMIERI; SULLIVAN, 1977).

3.3.1 METODOLOGIAS PARA CRIAÇÃO DE *U. dermestoides*

No processo de criação e manutenção de colônias de *U. dermestoides*, algumas condições importantes devem ser levadas em consideração. A primeira delas é a quantidade de alimento disponibilizada tanto às larvas quanto aos besouros adultos. A baixa disponibilidade de amendoim para as larvas (de 1, 2, e 5 mg/larva/semana) prolonga o desenvolvimento larval, aumenta o número de instars (fases do desenvolvimento da larva) e maior taxa de mortalidade. Além disso, os adultos originados dessas larvas apresentaram período de préovoposição e taxa de fecundidade reduzida (CHUA; CHANDRAPAL, 1977).

Outras condições importantes a serem consideradas são a temperatura de criação e a dieta fornecida às culturas. Embora o *U. dermestoides* seja uma praga de produtos armazenados (em especial o amendoim), e apenas o consumo do amendoim seja suficiente para o seu desenvolvimento, foi observado que uma dieta de amendoim suplementada com casca e sementes de frutas aliado uma colônia submetida em temperatura entre 21-24°C aumenta a viabilidade dos indivíduos além de encurtar o tempo de desenvolvimento dos mesmos (MARINONI; RIBEIRO-COSTA, 2001).

3.3.2 METABÓLITOS BIOATIVOS PRESENTES EM *U. dermestoides*

Alguns estudos utilizando o *U. dermestoides* e seus metabólitos tem sido realizados. No trabalho de Villaverde et al (2009), foram caracterizadas secreções voláteis e epicuticulares (camada superficial) do besouro do amendoim. Essas secreções tem por finalidade atuarem como sistema de defesa causando um tipo irritação ao agressor e também atuarem como feromônios do inseto. Dentre as substâncias isoladas destacaram-se metil-1,4-benzoquinina (MBQ), etil-1,4-benzoquinona (EBQ), as quais atribuí-se ação irritante e de proteção e o hidrocarboneto pentadecadieno (C_{15:2}), ao qual atribuí-se ação de ferormonio. Os principais componentes identificados estão presentes na figura 2.

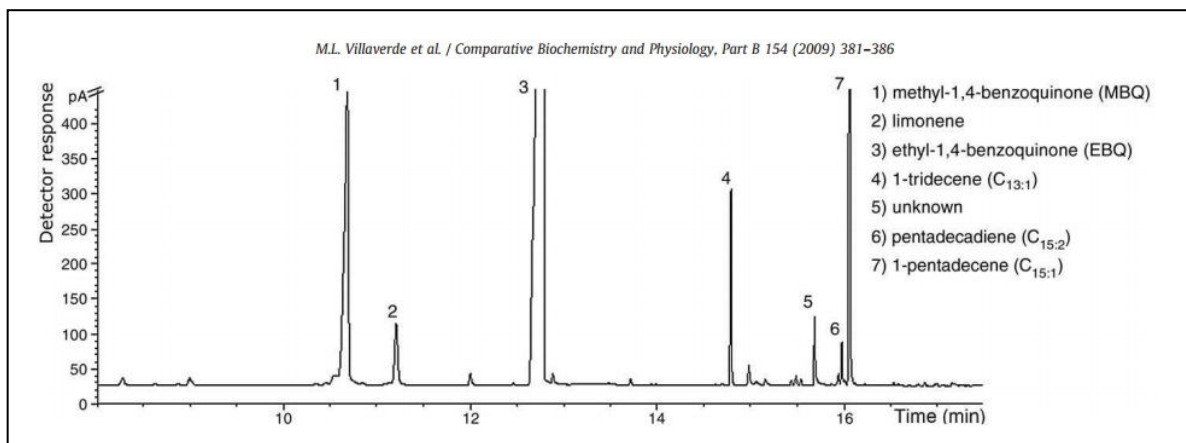


Figura 2: Perfil dos principais componentes voláteis identificados na epicutícula de em *Ulomoides dermestoides*.
 Fonte: Villaverde et al, 2009 (Adaptado)

Baseado na caracterização mencionada acima, Crespo et al (2011) determinaram a citotoxicidade e genotoxicidade da MBQ e EBQ frente a linhagem A-549 de células de carcinoma epitelial humano. Nesse estudo, comprovou-se que tanto o MBQ quanto o EBQ apresentaram citotoxicidade, através da redução da viabilidade celular e genotoxicidade, através de danos induzidos ao DNA, frente a essa linhagem.

Em estudo recente foi realizada a análise dos metabólitos encontrados no besouro do amendoim a partir de extratos de corpo inteiro. Neste trabalho, utilizando-se extratos metanólicos e hexânicos foram identificados outros compostos como: limoneno e os ácidos graxos mirístico, palmítico, esterático, oleico e linoleico. Adicionalmente, tal estudo também identificou a presença de substância anti-irritante presente no extrato metanólico. Este estudo corrobora com o de Villaverde et al, (2009) apontando o *U. dermestoides* como fonte potencial de metabólitos bioativos (MENDOZA; SAAVEDRA, 2013).

Além da presença de metabólitos secundários bioativos, sabe-se também que o extrato aquoso (em PBS) de *U. dermestoides* reduziu significativamente os parâmetros da pleurisia induzida em ratos através da carragenina, tais como volume de exudato, concentração proteica, número de neutrófilos e contagem total de leucócitos. Desta forma, este resultado aponta a possível presença de metabólitos primários, como por exemplo, proteínas ou enzimas, com ação biológica presentes no extrato aquoso do besouro do amendoim (SANTOS, 2010).

3.6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES

A primeira etapa na purificação de proteases é a extração do material proteico, o que pode ser feito tanto em solução salina quanto em tampões. Após a extração a atividade enzimática do extrato bruto pode ser avaliada através de testes inespecíficos para a presença dessas enzimas como o teste de hidrólise da azocaseína (AZEEZ et al, 2007). Caso o extrato apresente boa atividade enzimática a amostra pode ser submetida ao fracionamento de proteínas com sulfato de amônio (SANTANA et al., 2012).

Outras técnicas muito empregadas na purificação de proteases são os métodos cromatográficos. Através da aplicação dessas técnicas, enzimas podem ser purificadas através do tamanho da molécula (cromatografia de exclusão molecular), através da carga líquida (cromatografia de troca iônica) e através da afinidade por moléculas específicas (cromatografia de afinidade). A utilização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteases nativas revela a carga líquida da enzima e PAGE sob condições desnaturantes e em condições redutoras podem revelar a massa molecular e a subunidade ativa da protease (TERRA; CRISTOFOLETTI, 1996).

Ensaio utilizando substratos específicos e o uso de inibidores também específicos para bloquear a ação de enzimas purificadas são métodos consagrados na caracterização de proteases. Estes mesmos testes também podem ser empregados quando pretende-se caracterizar a ação de proteases frente aquecimento e estabilidade em diferentes valores de pH (THIE; HOUSEMAN, 1990).

4. ARTIGO

Partial purification and characterization of proteases from de medicinal beetle *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidea)

ARTIGO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO “Insect Biochemistry and Molecular Biology”.



Fator de impacto: 3.620 (JCR, 2013)

Partial purification and characterization of proteases from the medicinal beetle *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidea)

Felipe R. Costa^{a,b}, Emanuel V. Pontual^a, Patrícia M. G. Paiva^a, Luciana Iannuzzi^d, Claudia S. A. Lima^b, Thiago H. Napoleão^a, Ricardo Yara^c, Maria Tereza S. Correia^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^bDepartamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^cDepartamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^dDepartamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

* Corresponding author:

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

+55 81 21268540

ABSTRACT

Ulomoides dermestoides is a cosmopolitan beetle known as stored-product pest and widely used for folk medicinal purposes. This study aimed to purify and characterize *U. dermestoides* trypsin-like protease. Extract from whole live adult beetles, males and females, were obtained in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 130 mM NaCl and 5 mM KCl. Crude extract was evaluated for protease activity by using the general substrate azocasein and specific substrates for trypsin-like (BAPNA) and chymotrypsin-like (SucPheNan) enzymes. Optima temperature and pH ranges using crude extract were determined. Purification of trypsin-like protease was performed by gel filtration followed by ion exchange chromatography. Extract and sample from purification process were evaluated by SDS-PAGE. The kinetic parameters (K_m and V_{max}) for sample obtained after the last chromatography were also determined. Protease activity from crude extract was retained (24%) after heating at 100 °C for 30 minutes. Crude extract presented only trypsin-like activity, which was detected at a broad pH range (pH 3-8, with maximum at pH 7.0) and showed optimum temperature of 40 °C. After gel filtration and ion exchange chromatographies, a main polypeptide band with 22.3 kDa was revealed by SDS-PAGE. This band showed positive result in zymography. The values of K_m and V_{max} were 0.62 mM and $0.33 \times 10^{-3} \mu\text{mol BAPNA/min}$, respectively. In conclusion, a trypsin-like serine protease was partially purified from *U. dermestoides* and additional steps are needed to achieve homogeneity.

Keywords: *Ulomoides dermestoides*; Serine Protease; Yellow Biotechnology; Chromatography

1. Introduction

During many years the application of insects for medicinal ends was set aside in favor of plants derived-compounds due to the most traditional usage of plants derived-products in science

(Costa-Neto, 1999; Costa-Neto and Pacheco, 2005; Alves and Dias, 2010). Studies about insect immunology have proven the great plasticity of proteins found in these animals, presenting novel proteins and protein domains correlated with insect adaptation to both abiotic and biotic environmental stresses, therefore pointing out these proteins as eligible targets for biotechnological research (Iwanaga and Lee, 2005; Lopes et al., 2009; Vilcinskas, 2012).

The medicinal beetle *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidea) is known in Portuguese as “besouro do amendoim”. This beetle, also known as a stored-product pest, is a cosmopolitan insect native from Asia and popularly used for treatment of several diseases such as asthma, rheumatism, eye rash and impotence (Costa-Neto, 1999). However few reports have been focused on the isolation of *U. dermestoides* products and their potential application.

Villaverde et al. (2009) purified several of volatile hydrocarbons from secretions and epicuticle of this beetle. The major compounds found were methyl-1,4-benzoquinone (MBQ), ethyl-1,4-benzoquinone (EBQ), 1-tridecene (C13:1), and 1-pentadecene (C15:1), representing more than 90% of the volatile blend. Based on this previous reports, Crespo et al. (2011) have evaluated the cytotoxicity and DNA damaging ability of MBQ and EBQ on human lung carcinoma epithelial cell line A549. The authors demonstrated that the beetle’s benzoquinones reduced cell viability and induced DNA damage. A more current report has identified the chemical composition of methanolic and hexanic extracts of *U. dermestoides*. This study reported additional information on new compounds like limonene and myristic, palmitic, stearic, oleic, and linoleic fatty acids; the authors also described the anti-irritant effect of methanolic extract in the HET-CAM test (Mendoza and Saavedra, 2013). Other report states the anti-inflammatory properties of polar whole body extract of *U. dermestoides* using carrageenan-induced paw edema assay in rats; however, the specific anti-inflammatory compounds in this extract are still unknown (Santos et al, 2010).

Reports about potencial metabolites from insects have arisen in recent years (Feng et al, 2009). Since insects are capable of occupying almost every niche in the planet interesting researches have been carried out in order to identify these compounds. Many relevant compounds can be quoted such as low molecular weight peptides toward bacterial cells (Dettner, 2011), biofuel manufacturing proteases (Li et al., 2011), wound-healing factors (Vilcinskas, 2011) and potent allergens (Sudha et al., 2008). These studies highlight the prominent role of insects as active metabolites resource.

In the light of these facts, the present report deals with the purification and characterization of proteases from *U. dermestoides*.

2. Materials and methods

2.1. Insect rearing

Stock cultures of *Ulomoides dermestoides* were kept in the *Laboratório de Engenharia Biomédica* from *Universidade Federal de Pernambuco* with humidity of 50-60% and temperature of 25 ± 2 °C. Raw peanuts were offered as food source to beetles. Adult males and females were used for preparation of extracts.

2.2. Extraction of proteases

The extraction of proteases was performed according to procedure described by Cao et al. (2010) with slight modification. Approximately 10 g of animals were weighed, crushed using pestle and then homogenized for 30 min in 20 ml of 10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 130 mM NaCl and 5 mM KCl. The whole beetle proteins were then extracted after centrifugation (8,000 g, 20 min). The supernatant obtained was collected and stored at -20 °C for later use.

2.3. Protein determination

Protein content was determined according to the method described by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL) as standard.

2.4. Protease activity

Protease activity was determined using azocasein (Sigma–Aldrich, USA) as substrate, according to Azeez et al. (2007). The extract (50 µl, 0.324 mg of protein) was mixed with 300 µl of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 containing 0.6% (w/v) azocasein. The mixture was supplemented with 100 µl of 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated at 37 °C for 3 h. The reaction was stopped by adding 200 µl of 10% (w/v) trichloroacetic acid. After incubation at 4 °C for 30 min, the mixture was centrifuged at 9,000 g for 10 min and the absorbance at 366 nm of the supernatant was determined. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that gave an increase of 0.01 in absorbance.

2.5. Trypsin and chymotrypsin activity

Trypsin and chymotrypsin activities in the extract were determined using 8 mM *N*-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA) or 8 mM *N*-succinyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide

(SucPheNan), respectively. The assays were performed by incubating 20 μ l of crude extract with 10 μ l of substrate in 170 μ l of 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. The mixture was incubated at 37 °C and absorbance at 405 nm was measured before and after 30 minutes of incubation.

2.6. Heating and pH stability assays

Thermal stability of protease activity in *U. dermestoides* extract was assessed by heating the sample at 40 °C, 50 °C, 60 °C for 30 min. Next, heated samples were submitted to trypsin activity assay as described in section 2.5.

pH stability was determined by the method described by Vironukov et al, (2006) with modifications. Samples of the extract were pre-incubated in pH 1.0-10.0 for 2 h at 25 °C. After incubation the material was centrifuged at 8000 g for 20min and the supernatant was used for performing trypsin activity assay as described in section 2.5.

2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE)

Non-heated and 100 °C-heated (30 min) samples of extract were evaluated for SDS-PAGE profile using a 12% polyacrylamide gel according to Laemmli (1970). Molecular mass markers (GE Healthcare, Sweden) phosphorylase b (97000 Da), bovine serum albumin (66000 Da), ovalbumin (45000 Da), carbonic anhydrase (30000 Da), soybean trypsin inhibitor (20100 Da), and α -lactalbumin (14400 Da) were also applied on gel. After run, the gels were stained with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid.

2.8. Zymography for proteases

The detection of post-electrophoretic activity of proteases in the extract was assessed by zymography (García-Carreño et al., 1993). Electrophoretic run was performed under the same conditions mentioned in previous section. After the run, the gel was washed in 2.5% (v/v) Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 for 30 min in order to remove SDS. Following washing, the gel was incubated for 90 min with a solution of 3 % (w/v) casein prepared in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Next the casein was removed and the gel washed with Tris buffer before staining with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid. Polypeptide bands with protease activity appeared white in contrast with a dark background.

2.9. Chromatographies

The extract was initially submitted to gel filtration chromatography. The sample (2 mL, 12.96 mg of protein) was chromatographed on a HiprepTM Sephacryl 16/60 S-100HR column coupled to a FLPC-ÄKTA Prime system (GE Healthcare, Sweden) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 2.0 mL were collected and those with absorbance at 280 nm higher than 0.01 were evaluated for trypsin activity. Phosphorylase b (97000 Da), albumin (66000 Da), ovalbumin (45000 Da), carbonic anhydrase (30000Da), trypsin inhibitor (20100 Da), and α -lactalbumin (14400 Da) were similarly chromatographed as molecular mass standards.

The fractions 27–30 from gel filtration chromatography were pooled and dialyzed against 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and loaded (2.0 mL, 1.6 mg of protein) onto an ion exchange HiprepTM DEAE FF 16/10 column previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, also coupled to the ÄKTA Prime system. The elution was performed using a 0-100% gradient of 1.0 M NaCl. Eluted fractions that showed absorbance at 280 nm higher than 0.05 were evaluated for trypsin activity.

The pools of proteins containing highest specific protease activity obtained after gel filtration (fractions 27-30) and ion exchange (fractions 24-27) chromatographies were also evaluated by SDS-PAGE as described in section 2.7.

2.10. Kinetic study

Kinetic study of protease activity was performed using the pool of proteins containing highest specific protease activity (fractions 24-27) from DEAE column. The assays were performed according Silva et al. (2011) with slight modification. Enzyme reactions were carried out in triplicate in microplates by incubating 30 μ l of sample (61 μ g/ml) with 155 μ l of 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 15 μ l of substrate BApNA. The final concentrations of BApNA ranged from 0.094 to 9.0 mM. The data were plotted in Lineweaver-Burk graph and the Michaelis-Menten kinetic parameters ($V_{\max}$ and K_m) were calculated using the software OriginTM 6.0 (MicrocalTM Inc., USA).

3. Results

U. dermestoides crude extract showed specific protease activity of 233 U/mg on azocasein, a non-specific substrate. When assayed using specific substrates, the extract showed hydrolytic activity toward BApNA but there was no reaction with SucPheNan. The results reveal the presence of trypsin-like serine proteases in the extract.

Thermal stability of proteases from crude extract was evaluated by heating a sample at 100°C and using azocasein as substrate. Interestingly, the sample was still able to hydrolyze the substrate after heating exhibiting residual activity of 18.3U and specific activity of 56.48 U/mg.

Then thermal stability was investigated at distinct temperatures (40, 50, and 60 °C) and using BApNA as substrate. Maximal hydrolytic activity was determined for the sample heated at 40°C with activity loss at 50°C.

The effect of pH on the proteolytic activity of crude extract from *U. dermestoides* was measured using BApNA (Figure 1). Proteolytic activity of crude extract was detected at the range of pH 3.0–8.0 with maximal activity at pH 7.0.

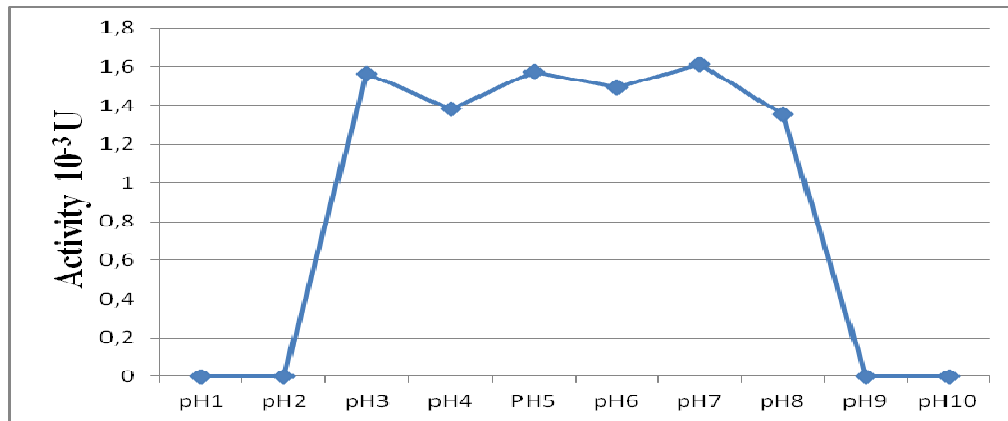


Figure 1: *Ulomoides dermestoides* crude extract pH stability test.

U. dermestoides crude extract was characterized by a combination of electrophoresis and zymography. Crude extract displayed several proteins being the main polypeptide bands those with 19.5, 22.0, 43.9, and 49.5 kDa (Figure 2, lane 2). The zymography analyses revealed two major bands of protease activity with molecular weight of 43.9 and 49.5 kDa (Figure 3A).

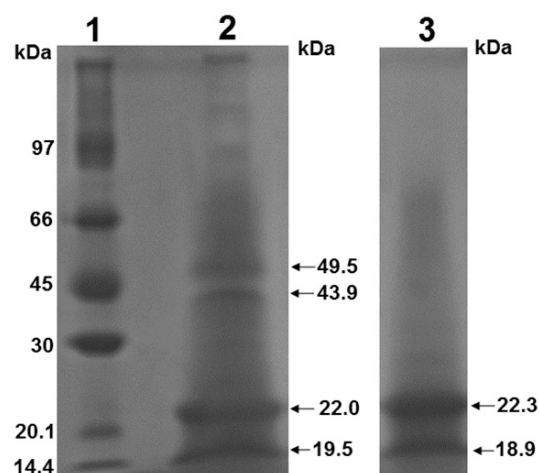


Figure 2. Electrophoretic profile of *U. dermestoides* preparations obtained during purification process. SDS-PAGE of molecular mass markers (1), *U. dermestoides* crude extract (2), extract heated at 100 °C (3).

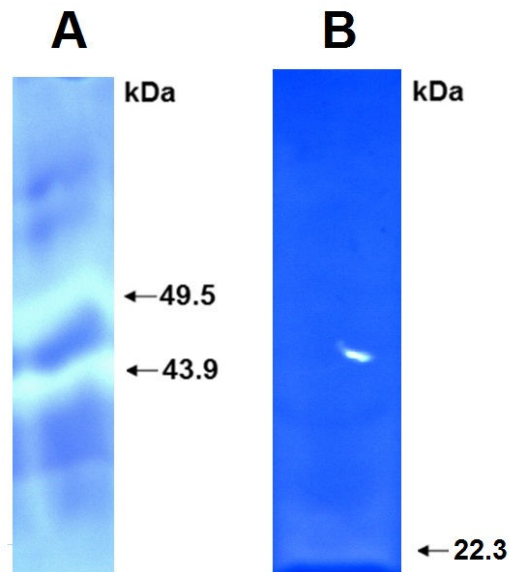


Figure 3. Zymography for proteases of *U. dermestoides* crude extract (A) and peak IV from gel filtration chromatography (B).

In an attempt to purify *U. dermestoides* trypsin-like proteases, the crude extract was submitted to gel-filtration and ion exchange chromatographies. The first one displayed a protein separation pattern consisting in four main peaks, called I, II, III and IV (Figure 4A). Protease activity toward BApNA was detected only in the peak IV (fractions 27-30), corresponding to proteins with molecular mass around 18 and 25 kDa. SDS-PAGE profile of peak IV (Figure 4, lane 2 revealed a main polypeptide band with molecular mass 22.3 kDa. It can also be observed at least three other polypeptide bands. Zymography for proteases revealed that only the band with 22.3 kDa showed protease activity.

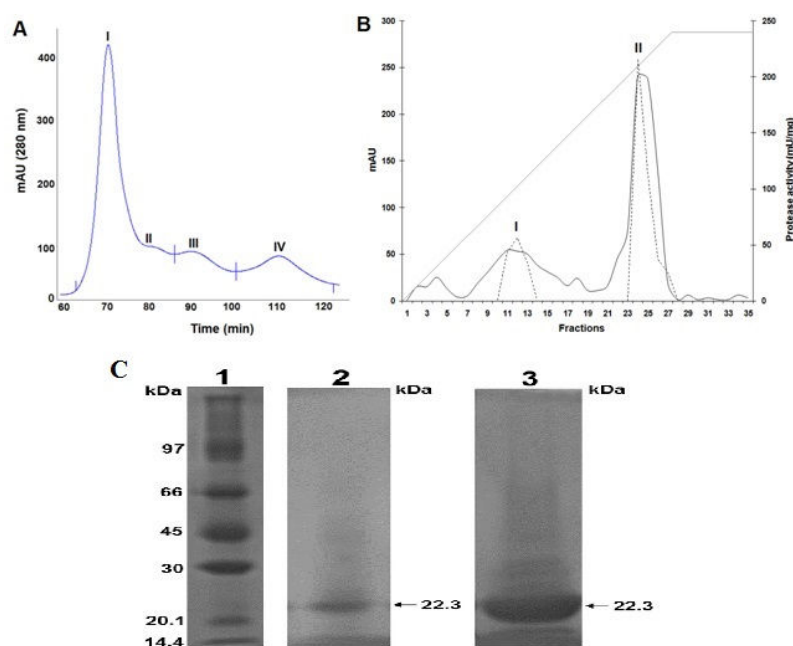


Figure 4. Purification of *U. dermestoides* trypsin-like protease and electrophoretic profile of *U. dermestoides* preparations obtained during purification process. (A) Gel filtration chromatography of crude extract on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 column coupled to ÄKTA Prime system. Fractions of 2.0 mL were collected. Chromatography was performed using 0.15 M NaCl. (B). Ion exchange chromatography of peak IV from gel filtration step on a Hiprep DEAE FF 16/10 column previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, also coupled to the ÄKTA Prime system. Absorbance 280 nm (back solid line) and trypsin-like activity (dotted line) are represented. Elution was performed using a 0-100% gradient of 1.0 M NaCl (grey solid line). Fractions of 2.0 mL were collected. SDS-PAGE of molecular mass markers (1). Peak IV from gel filtration chromatography (2) and peak II from ion exchange chromatography (3), all stained with Coomassie Brilliant Blue (Figure 4C).

The peak IV was the chromatographed on an ion exchange column containing a cationic matrix for binding of anionic proteins. Two main peaks containing protease activity were detected (Figure 3B). The peak II showed the highest specific trypsin-like activity and was evaluated by SDS-PAGE and the profile (Figure 2, lane 5) was similar to gel filtration chromatography revealing intensely stained polypeptide band with molecular mass 22.3 kDa and other bands that were not removed by this second chromatography step. Kinetic study using the peak II from ion exchange chromatography revealed a K_m of 0.62 mM and a V_{max} of $0.33 \times 10^{-3} \mu\text{mol BApNA}/\text{min}$.

4. Discussion

Insects are the largest and most diverse group of animals on Earth. Their ability of occupying almost every niche in the planet makes them targets for the search of new eligible metabolites to be used in several brunches of food, pharmaceutical and biotechnological industries (Becker-Pauly and Stocker, 2011; Mika et al., 2013;). In this study we report the partial purification

and characterization of trypsin-like proteases from the beetle *Ulomoides dermestoides* known worldwide as a medicinal resource for many popular groups and cultures.

The enzyme activity of crude extract proteases shows high total proteasen activity. It was expected high activity since crude extract is a pool of metabolites and therefore several possible proteases may be acting on the hydrolyses process. This result stimulates the isolation of *U. dermestoides* proteases and their investigation for possible technological application.

Serine proteases are the main enzymes used by several species of insects in order of hydrolysing substrate from diet and for this purpose insects use either trypsin or chymotrypsin to achieve that goal (Eguchi and Iwamoto, 1982; Terra and Cristofolletti, 1996; Thie and Houseman, 1990; Vinokurov et al., 2006b). The investigation of protease ability using specific substrates presented an unusual result since *U. dermestoides* crude extract presented positive reaction only toward BApNA, which specific for trypsin-like proteases, but there was no reaction toward SucPheNan which is specific for chymotrypsin-like proteases. A possible inhibitor for chymotrypsin-like proteases may be present in the food source or this insect does not express significant amounts of this enzyme (Ahmad et al., 1980).

Every enzyme possess the so called “optimum pH and temperature” which are parameters where its activity is maximal. *U. dermestoides* trypsin proteases presented optimum temperature and pH of 40 °C and 7.0, respectively, when present in the extract. This temperature is expected for digestive proteases such as trypsin-like enzymes but pH assay presents an odd behavior. Trypsin proteases usually act at alkaline range from 8.0 to 10.0 and exhibit one peak of maximal activity (Johnston et al., 1991; Vinokurov et al., 2006a). In this study the serine proteases showed maximal activity at neutral pH and were active at acidic range. These results could be related to the presence of different types of proteases occurring in the crude extract.

The eletrophoretic and zymography characterization followed by the purification process shows a rich protein crude extract. Insects are known as protein-rich animals and there are studies pointing them out as alternative food source in the early future or as alternative for world starvation problem control (Zhang et al., 2008). After gel-filtration process the crude extract was fractionated into four fractions and only the last (peak IV) exhibited proteolytic activity toward BApNA. This result corroborates with reports stating that serine proteases are low weight enzymes (Hivrale et al., 2005; Hivrale et al., 2011; Wada et al., 2011). Later application onto ion exchange chromatography confirmed this result revealing that even using two purification methodologies it was not possible to obtain a homogeneous preparation being necessary further purification steps. Interestingly, zymography revealed that only the 22.3 kDa band showed protease activity which indicate that at least there are no other proteases in the preparation. The partially purified trypsin-like enzyme did

not show heat stability revealing that they are not among the enzymes in extract that remained active after heating at 100 °C.

Regarding to the zymography assays crude extract exhibited two major active bands with molecular mass distinct from the partially purified trypsin-like enzymes. However, the peak IV from gel filtration chromatography showed a 22.3-kDa band with protease activity in zymography. A possible explanation is the presence of a self-inhibitor in the crude extract.

Michaelis constant (K_m) indicates the affinity of the enzyme to the substrate. The serine protease purified from *U. dermestoides* a K_m value by 0,62mM. *U. dermestoides* K_m result is higher when compared to *Helicoverpa armigera* (Johnston et al., 1991) and *Bombix mori* (Eguchi and Iwamoto, 1982) serine proteases represented by 0,254 and 0,33, respectively. These effects could be assigned to a partial purified protease submitted to the reaction.

In conclusion, *U. dermestoides* crude extract is rich in proteins, serine proteases and presents caseinolytic activity seen through zimography. These serine proteases show activity among a acidic range of pH and endures heating treatment up to 40°C. It was possible to visualize one thermal stable proteases activity up to 100°C against azocasein although it has not been possible to identify the same result after purification. The serine protease assay against BApNA shows a small affinity from the enzyme to this substrate since the sample is not completely purified. Additional study is required in order to fully purify *U. dermestoides* to completely understand this beetle enzymes properties.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) for financial support and PhD Agda Regina Yatsuda Ikuta for insects donation and CAPES agency for financial support.

5. References

- Ahmad, Z et al., (1980). Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of army worm, *Spodoptera litura* Insect Biochem., Vol. 10, pp. 667 to 673
- Alves, R.R.N; Dias, T.L.P., (2009). Usos de invertebrados na medicina popular no Brasil e suas implicações para conservação - Tropical Conservation Science Vol.3 (2):159-174, 2010
- Azeez, A., et al., (2007). Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. Phytochemistry, 68, 1352–1357
- Becker-Pauly, C; Stocker, W., (2011). Insect Cells for Heterologous Production of Recombinant Proteins Insect Biotechnology Biologically-Inspired Systems Volume 2, pp 197-209

Cao, X et al., (2010). Purification and characterization of a new D-galactose-specific lectin from the housefly, *Musca domestica*, and its antiproliferative effect on human K562 and CF-7 tumor cells *Journal of Insect Science*: Vol. 10 | Article 79

Costa Neto, E.M; Pacheco. J.M., (2005) Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, Bahia, Brasil - *Biotemas*, 18 (1): 113 – 133

Costa-Neto, E.M., (1999). Recursos animais utilizados na medicina tradicional dos índios Pankararé que habitam o nordeste do estado da Bahia, Brasil – *Actual Biol* 21 (70): 69-79

Crespo, R. et al., (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells *Journal of Ethnopharmacology* 136 204–209

Dettner, K., (2011) Potential Pharmaceuticals from Insects and Their Co-Occurring Microorganisms **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, pp 95-119

Eguchi, M.; Iwamoto, A., (1982). Comparison of three alkaline proteases from digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 71B, No. 4, pp. 663 to 668

FENG, Y. *et al.* Research and utilization of medicinal insects in China. **Entomological Research** 39, 2009, 313–316

Hivrale, V.K et al., (2005). Unrevealing biochemical properties of cockroach (*Periplaneta americana*) proteinases with gel-X-ray film contact print method. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 141, 261 – 266.

Hivrale, V.K et al., (2011). *Periplaneta americana* midgut proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds *Physiological Entomology* 36, 180 – 186

Iwanaga, S.; Lee, B. L., (2005) Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate animals *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, N° 2, March pp. 128-150

Johnston, K. A. et al., (1991). The partial purification and characterisation of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera* *Insect Biochem.* Vol. 21, No. 4, pp. 389—397

Li, Q. et al., (2011). Insect Fat, a Promising Resource for Biodiesel **J Pet Environ Biotechnol**, S2:001

Lopes, A. R et al., (2009). Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants *Archives of insect biochemistry and physiology*, vol. 70, no. 3, 188–203 2009

Lowry, O. H., et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

Mika, N; Zorn, H; Rhul, M., (2013). Insect-Derived Enzymes: A Treasure for Industrial Biotechnology and Food Biotechnology *Yellow Biotechnology II Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* Volume 136, 2013, pp 1-17

- MENDOZA, D. L. M.; SAAVEDRA, S. A. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). **VITAE** Volumen 20 número 1, año 2013 Medellín, Colombia. págs. 41-48
- Sanatan, P. T. et al., (2013). Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta Americana* *BMC Biochemistry*,14:32
- Santos, R. C. V. et al., (2010). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *In Vitro Inflammation*, Vol. 33, No. 3, June
- Sudha, V. T. et al., (2008). Identification of a serine protease as a major allergen (Per a 10) of *Periplaneta americana* **Allergy** 63: 768–776
- Terra, W. R.; Cristofolletti, P. T., (1996). Midgut Proteinases in Three Divergent Species of Coleoptera *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113B, No. 4, pp. 725-730
- Thie, N. M. R.; Houseman, J. G., (1990). Cysteine and serine proteolytic activities in larval midgut of yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *Insect Biochem.* Vol. 20, No. 7, pp. 741-744
- Vilcinskis, A., (2011) From Traditional Maggot Therapy to Modern Biosurgery **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, pp 67-75
- Villaverde, M. L. et al., (2009). Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle
- Vinokurov, K. S. et al., (2006b). Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 145 126–137
- Vinokurov, K.S et al., (2006a). Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 145 126–137
- Wada et al., (2011). Cockroach Induces Inflammatory Responses through Protease-Dependent Pathways *Int Arch Allergy Immunol*;155(suppl 1):135–141
- Zhang, C.X; Tang, X.D.; Cheng, J.A., (2008). The utilization and industrialization of insect resources in China *Entomological Research* 38 S38–S47

5. CONCLUSÕES

- *Ulomoides dermeistoides* é rico em proteínas;
- *U. dermeistoides* possui serino protease do tipo tripsina, mas não do tipo quimiotripsina;
- Extrato bruto de *U. dermeistoides* apresenta elevada atividade hidrolítica (Azocaseína);
- Extrato bruto de *U. dermeistoides* apresenta atividade após aquecido a 100°C por 30 minutos, embora não tenha sido possível identificar a enzima responsável;
- Serino protease de *U. dermeistoides* tem peso molecular aproximado de 22,3 KDa de acordo com a SDS-PAGE;
- Serino protease de *U. dermeistoides* apresenta atividade quando aquecido até 40°C e na faixa de pH entre 3 e 8, com atividade máxima em pH7.
- Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da serino protease de *U. dermeistoides* correspondem por 0,62mM e $V_{max} = 0,33 \times 10^{-3} \mu\text{mol BApNA}/\text{min}$, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS

- 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 Biochem.**, Vol. 10, p. 667 to 673.
- ALMONTE, A. G; SWEATT, J. D. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. **Brain Research**. Volume 1407, 17 August 2011, p. 107–122
- ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 2011, 7:9
- ALVES, R. R. N.; DIAS, T. L. P. Usos de invertebrados na medicina popular no Brasil e suas implicações para conservação. **Tropical Conservation Science** Vol.3 (2):159-174, 2010
- ANDRADE, O. M. S. **Morfologia e biologia de *Palembus dermestoides* (Fairm., 1893) (Coleoptera, Tenebrionidae)**. 1982. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- AZEEZ, A., et al. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. **Phytochemistry**, 68, p. 1352–1357. 2007
- BECKER-PAULY, C.; STOCKER, W. Insect Cells for Heterologous Production of Recombinant Proteins. **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, 2011, p. 197-209
- BODE, H. B. Insect-Associated Microorganisms as a Source for Novel Secondary Metabolites with Therapeutic Potential. **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, 2011, p. 77-93
- CERA, E. D. Serine Proteases. **IUBMB Life**. 61(5): p. 510–515. 2009
- CHAPMAN, H. A.; RIESE, R. J.; SHI, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. **Annu. Rev. Physiol.** 1997. 59:63–88
- CHENG, J. D. et al. Promotion of Tumor Growth by Murine Fibroblast Activation Protein, a Serine Protease, in an Animal Model. **Cancer Res**. August 15, 2002 62; 4767
- CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, Vol. 61, No. 4, p. 395±418, 1998
- CHOO, Y. M. et al. Dual Function of a Bee Venom Serine Protease: Prophenoloxidase-Activating Factor in Arthropods and Fibrin(ogen)olytic Enzyme in Mammals. 2010. **PLoS ONE** 5(5): e10393. doi:10.1371/journal.pone.0010393
- CHU G. S.; PALMIERI J. R.; SULLIVAN J. T. Beetle-eating: a Malaysia folk medical practice and its public health implications. **Trop Geogr Med**. 1977 Dec;29(4):422-7
- CHUA, T. H; CHANDRAPAL, R. The influence of restricted food supplies on the development of larvae and on the fecundity of *Palembus dermestoides* fairn. (Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research** Volume 14, Issues 2–3, June 1978, Pages 81–86

- COSTA NETO, E. M. Recursos animais utilizados na medicina tradicional dos índios Pankararé que habitam o nordeste do estado da Bahia, Brasil. **Actual Biol**, 21 (70): 69-79, 1999
- COSTA NETO, E. M.; PACHECO, J. M. Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. **Biotemas**, 18 (1): 113 - 133, 2005
- COSTA NETO, E. M.; RESENDE, J. J. A percepção de animais como “insetos” e sua utilização como recursos medicinais na cidade de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** Maringá, v. 26, no. 2, p. 143-149, 2004
- CRESPO, R. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Uromyces* dermatoides on A549 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 136, 2011, 204–209
- CUNNINGHAM, C. T. et al. Sensitizing and Th2 Adjuvant Activity of Cysteine Protease Allergens. **Int Arch Allergy Immunol** 2012; 158:347–358
- DETTNER, K. Potential Pharmaceuticals from Insects and Their Co-Occurring Microorganisms. **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, 2011, p. 95-119
- DEVARAJ, K. B.; GOWDA, L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). **Phytochemistry** 69, 2008, 647–655
- DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry** 62, 2003, 1057–1071
- EGUCHI, M.; IWAMOTO, A. Comparison of three alkaline proteases from digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 71B, No. 4, p. 663 to 668, 1982
- ENGEL, J. C et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **JEM**. 1998. vol. 188 no. 4 p. 725-734
- FAHMY, A. S.; ALI, A. A.; MOHAMED, S. A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). **Bioresource Technology**. 91 (2004) 297–304
- FENG, Y. et al. Research and utilization of medicinal insects in China. **Entomological Research** 39, 2009, 313–316
- GIRI, A. P. et al. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. **Phytochemistry**. 63, 2003, 523–532
- GIRARD, C et al. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee **Transgenic Research** 7, 239-246, 1998
- GRANADOS, R. R.; LI, G.; BLISSARD, G. W. Insect Cell Culture and Biotechnology. **Virologica Sinica**, April. 2007, 22 (2):83-93
- GUO, Z. P. et al. Expression of aspartic protease from *Neurospora crassa* in industrial ethanol-producing yeast and its application in ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology** 48 2011, p.148–154
- HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chem. Rev.** 2002, 102, p.4501–4523

- HIVRALE, V.K et al. *Periplaneta americanamidgut* proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds. **Physiological Entomology**, 2011, 36, 180 – 186
- HIVRALE, V.K et al Unrevealing biochemical properties of coakroach (*Periplaneta americana*) proteinases with gel-X-ray film contact print method.Comparative **Biochemistry and Physiology B**, 2005. 141, 261 – 266.
- HULL, R.; KATETE, R.; NTWASA, M. Therapeutic Potential of Anti-Microbial Peptides from Insects. **Insect Biotechnology** Biologically-Inspired Systems Volume 2, 2011, pp 29-65
- JEONG, K. Y.; KIM, C.; YONG, T. S.Enzymatic Activities of Allergen Extracts from Three Species of Dust Mites and Cockroaches Commonly Found in Korean Home **Korean J Parasitol**.Vol. 48, No. 2: 151-155, June 2010
- JOHNSTON, K. A. et al - The partial purification and characterisation of serine protease activity in midgut of larval *helicoverpa armigera* **Insect Biochem.** Vol. 21, No. 4, pp. 389--397, 1991
- KARAKELIDES, M et al. Airway Exposure to Papain, a Cysteine Protease, Induces Allergic Inflammation. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, 2009, Vol.123(2), pp.S49-S49
- KHAN, A. R.; JAMES, M.N. G. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Science** (1998), 75315-836.
- LEV, E. Traditional healing with animals (zootherapy): medieval to present-day Levantine practice. **Journal of Ethnopharmacology** 85 (2003) 107–118
- LI, K et al. - Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF 2992–2997 **PNAS** February 22, 2005 vol. 102 no. 8
- LI, Q. et al. Insect Fat, a Promising Resource for Biodiesel **J Pet Environ Biotechnol** 2011, S2:001
- LI, X. D. et al. Hepatitis C virus protease NS34A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **PNAS**. December 6, 2005. vol. 102 no. 49 17717–17722
- LOO, G. V. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell Death and Differentiation**. 2002, 9, p. 20-26
- LOPES, A. R.; SATO, P. M.; TERRA, W. R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. **Archives of insect biochemistry and physiology**. Vol. 70, No. 3, p. 188–203. 2009
- MARINONI, R. C.; RIBEIRO-COSTA, C. S. Influence of Temperature and Diet on the Development of *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperinae). **Brazilian archives of biology and technology** Vol. 44, N. 2 : p. 129 – 134, June, 2001
- MARQUES, J. G. W. A fauna medicinal dos índios Kuna de San Blás (Panamá) e a hipótese de universalidade zooterápica In: **Anais da 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Vitória, 1994. Vitória, UFES

- MARTINS, L. M. et al. Neuroprotective Role of the Reaper-Related Serine Protease HtrA2/Omi Revealed by Targeted Deletion in Mice. **Mol. Cell. Biol.** November 2004 vol. 24 no. 22 9848-9862
- MATSUOKA, T. et al. - Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera* **Apidologie** (2012) 43:685–697
- MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the Soybean (Kunitz) Trypsin Inhibitor on Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura* - **J. insect Physiol.** Vol. 41, No. 9, 731-738, 1995
- MENDOZA, D. L. M.; SAAVEDRA, S. A. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). **VITAE** Volumen 20 número 1, año 2013 Medellín, Colombia. págs. 41-48
- MERHEB-DINI et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry.** 120 (2010) 87–93
- MIKA, N; ZORN, H; RHUL, M. Insect-Derived Enzymes: A Treasure for Industrial Biotechnology and Food Biotechnology. **Yellow Biotechnology II** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Volume 136, 2013, pp 1-17
- MOCHIZUKI, A. Characteristics of digestive proteases in the gut of some insect orders **Appl. Entomol. Zool.** 1998. 33 (3): 401-407
- MUELLER, C et al. A high proportion of t lymphocytes that infiltrate h-2-incompatible heart allografts in vivo express genes encoding cytotoxic cell-specific serine proteases, but do not express the mel-14-defined lymph node homing receptor. **J. Exp. Med.** Volume 167. March 1988. 1124-1136
- MUÑOZ-GARCÍA et al., E. Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*Lactuca sativa*). **Mol Nutr Food Res.** 2013 Dec; 57(12):2245-52
- NAKAZAWA , H et al. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus **Virology** 321 (2004) 154–162
- NELSON, D. L.; Cox, M. M. **Principios de bioquímica de Lehninger.** Artmed. 5. ed. Porto Alegre. 2011
- OPPERT, B.; WALTERS, P.; ZUECHER, M. Digestive proteinases of the larger black flour beetle, *Cynaues angustus* (Coleoptera: Tenebrionidae) **Bulletin of Entomological Research** (2006) 96, 167–172
- OTTO, H. H; SCHIRMEISTER, T. - Cysteine Proteases and Their Inhibitors **Chem. Rev.** 1997, 97, 133–171
- PATANKAR, A. G. et al. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** 31 (2001) 453–464

- PATTANAIK, P. et al. Stage-specific profiling of *Plasmodium falciparum* proteases using an internally quenched multispecificity protease substrate. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 309 (2003) 974–979
- PERNG, D. W. et al. Matrix metalloprotease-9 induces transforming growth factor- β 1 production in airway epithelium via activation of epidermal growth factor receptors. **Life Sciences** 89 (2011) 204–212
- PERNI, R. B et al. Preclinical Profile of VX-950, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3-4A Serine protease. **Antimicrob. Agents Chemother.** March 2006 vol. 50 no. 3 899-909
- POLGÁR, L. The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis. **FEB** Volume 219, number 1, 1-4 . July 1987
- SAGHATELIAN, A. et al. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. **PNAS** July 6, 2004, vol. 101, no. 27
- SAJID, M; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology** Volume 120, Issue 1, March 2002, Pages 1–21
- SANATAN, P. T. et al. - Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta Americana* **BMC Biochemistry** 2013,14:32
- SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review **Clinical Autonomic Research** 2001, 11:303-307
- SANTANA, G. M. S et al. Eletrochemical potencial of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioeletrochemistry**, v.85, p. 56-60, 2012
- SANTOS, R. C. V. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *In Vitro*. **Inflammation**, Vol. 33, No. 3, June 2010
- SCHARF, M. E.; BOUCIAS, D. G. Potential of termite-based biomass pre-treatment strategies for use in bioethanol production. **Insect Science**, 2010, 17, p. 166–174,
- SINGH, A. N. et al. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain Process. **Biochemistry** 45, 2010, p. 399–406
- SINGH, A. N.; DUBEY, V. K. Exploring Applications of Procerain B, a Novel Protease from *Calotropis procera*, and Characterization by N-Terminal Sequencing as well as Peptide Mass Fingerprinting. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Part A 2011
- SOLOMON, M et al. The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell**. Vol. 11, 431–443, March 1999
- STECK, N. et al. Enterococcus faecalis Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. **Gastroenterology** 2011; 141:959 –971
- SUÁEZ, M. B. et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. **Fungal Genetics and Biology** 42 2005, p. 924–934

- SUDHA, V. T. et al. Identification of a serine protease as a major allergen (Per a 10) of *Periplaneta americana* **Allergy** 2008; 63: 768–776
- TELANG, M. et al. - Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* **Phytochemistry** 63 (2003) 643–652
- TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut Proteinases in Three Divergent Species of Coleoptera **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 113B, No. 4, pp. 725–730, 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 Biochem.** Vol. 20, No. 7, pp. 741–744, 1990
- THYS, R. C. S; BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. **Journal of Applied Microbiology** 101(2006) 1259–1268
- TRIVEDI, V. et al. Platelet Matrix Metalloprotease-1 Mediates Thrombogenesis by Activating PAR1 at a Cryptic Ligand. **Site Cell** 137, 332–343, April 17, 2009
- TURK, V.; TURK, B.; TURK, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. **The EMBO Journal**. Vol. 20 No. 17 pp. 4629–4633, 2001
- VILCINSKAS, A. From Traditional Maggot Therapy to Modern Biosurgery. **Insect Biotechnology Biologically-Inspired Systems Volume 2**, 2011, pp 67–75
- VILLAYERDE, M. L. et al. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 154 (2009) 381–386
- VINOKUROV, K. S. 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**. Vol. 70, No. 4, 254–279 2009
- VINOKUROV, K. S. et al. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 145 (2006a) 126–137
- VINOKUROV, K. S. et al. Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 145 (2006b) 126–137
- WADA, K. et al. Cockroach Induces Inflammatory Responses through Protease-Dependent Pathways. **Int Arch Allergy Immunol** 2011;155(suppl 1):135–141
- WELTER, S. et al. Identification of putative new tomato allergens and differential interaction with IgEs of tomato allergic subjects. **Clinical & Experimental Allergy**. 2013. 43. 1419–1427
- WU, W. B. et al. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J.** 2001, 357, p.719–728
- YANG, C. et al. Identification of a proteolytic bacterium, HW08, and characterization of its extracellular cold-active alkaline metalloprotease Ps5. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 74(6), 1220–1225, 2010

YEGIN, S et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Appl Microbiol Biotechnol.** (2011) 89:949–960

ANEXO I

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO “Insect Biochemistry and Molecular Biology”.

ARTICLE STRUCTURE

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do

not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Chemicals

Chemicals used or discussed in the paper should be clearly identified by approved common names. When in doubt, provide CAS registry number. Use the approved ISO common name for agricultural chemicals or the INN common name for drugs, rather than the trademarked name.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and viceversa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

ANEXO II

Zooterapia: Utilização de animais na prática médica popular (O que a fauna tem a nos oferecer)

Cadernos de Extensão. 23ª edição Recife: Editora Universitária, 2014, v. Único, p. 170-174

CAPÍTULO PUBLICADO COMO PARTE DO PROGRAMA UFPE & VALORIZAÇÃO DA EXTENSÃO

REFERÊNCIA: Edital 09/2013 - PARA PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULOS DE LIVROS

AUTORES: ¹Felipe Rocha da Costa, ²Cláudia Sampaio de Andrade Lima, ³Ricardo Yara, Maria ⁴Teresa dos Santos Correia

¹Discente de pós-graduação, Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

²Docente, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco

³Docente, Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco

⁴Docente, Coordenadora, Programa de Pós-graduação em Ciência Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco