



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JOÃO CARLOS DE GUSMÃO CAVALCANTE JÚNIOR

**Purificação parcial e caracterização de uma TAG- lipase do gorgulho do milho
Sitophilus zeamais.**

**MACEIÓ/AL
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JOÃO CARLOS DE GUSMÃO CAVALCANTE JÚNIOR

Purificação parcial e caracterização de uma TAG- lipase do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais*.

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Co orientador: Professor Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira.

**MACEIÓ/AL
2016**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaína Xisto Barros Lima

C376p Cavalcante Júnior, João Carlos de Gusmão.
Purificação parcial e caracterização de uma TAG -lipase do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* / João Carlos de Gusmão Cavalcante Júnior. – 2016.
56 f. : il.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 43-56.

1. Milhos – Doenças e pragas. 2. *Sitophilus zeamais*. 3. Triacilglicerol - Lipase. 4. Lipídeos. I. Título.

CDU: 615.1

JOÃO CARLOS DE GUSMÃO CAVALCANTE JÚNIOR

Purificação parcial e caracterização de uma TAG-lipase do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais*.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre, aprovada em 20 de Maio de 2016.

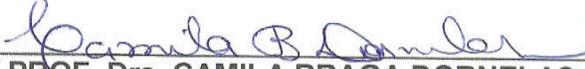


PROF. Dr. LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
ORIENTADOR



PROF. Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
CO-ORIENTADOR

Banca examinadora:



PROF. Dra. CAMILA BRAGA DORNELAS
1º EXAMINADOR (TITULAR INTERNO)



PROF. Dr. FRANCIS SOARES GOMES
2º EXAMINADOR (TITULAR EXTERNO – IQB)

PROF. Dr. TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
1º SUPLENTE (INTERNO)

Dedico esse trabalho a minha
esposa pela compreensão e
apoio que me foi dado

AGRADECIMENTOS

Primeiro lugar agradecer a Jah a quem recorremos na hora do desespero e apegamos com fé para que tudo dê certo. Agradeço a minha família que se dispôs nesses períodos de estudo, e que compreendam as ausências em algumas ocasiões, a minha esposa pela paciência e minhas filhas pela inocência, mas que saibam que vocês são prioridade na minha vida. Agradecer a minha mãe que sempre foi guerreira, e formou seus três filhos com toda dificuldade se esforçando o máximo para que chegássemos onde chegamos.

Agradeço com todo carinho a equipe de trabalho do laboratório de bioquímica e biologia molecular de insetos, que de maneira direta ou indireta fizeram com que esse trabalho fosse realizado, aos colegas de bancada Camila, Mariana, Nadiane. Agradecer aos alunos de iniciação científica Josiel, Tomaz pelos esforços e grande ajuda nos momentos de aperto, também agradeço ao Yann que durante um bom tempo foi aluno de iniciação científica e também contribuiu para realização desse trabalho. Agradeço também aos parceiros do laboratório TECnano, que contribuíram no desenvolvimento dessa pesquisa, ao professor Euzébio Goulart e ao Cristian do Laboratório de pesquisa em química de produtos naturais a turma do Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia, sob supervisão do professor Hugo, pela parceria e apoio que foi dado ao longo desses anos de luta.

Um agradecimento todo especial a meu orientador e amigo Luciano Grillo que sempre esteve presente nessa caminhada como um grande mentor, exercendo seu papel de orientador como poucos, e nunca abandonando seus orientandos que se esforçam em pró da ciência, e de maneira simples e serena conduzindo sua equipe, se preocupando com o futuro de toda sua equipe, “e vamos à luta”. Agradecer também a meu coorientador o professor Hugo Juarez, pelas inúmeras direções que me fez tomar com toda sua sapiência, e pela paciência que teve comigo nesse período, nunca me negando ajuda e com as portas abertas quando precisava de sua aptidão.

Agradecer também aos órgãos financiadores, FINEP, FAPEAL, CNPQ, CAPES e UFAL que foram responsáveis pelo custeio da pesquisa.

Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de
qualquer jeito.

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Os triacilgliceróis, incluídos na classe de lipídeos neutros, são essenciais para manutenção da vida na maioria dos vertebrados e invertebrados, uma vez que fazem parte da reserva energética e servem de substratos para síntese de metabolitos secundários. Nos insetos a mobilização e digestão desta reserva energética ocorre pela ação de triacilglicerol-lipase (TAG- lipase) que disponibiliza esses lipídeos sob a forma de diacilglicerol (DAG) e ácidos graxos livres. Substâncias que interagem e são capazes de inibir enzimas essenciais para sobrevivência dos insetos são uma alternativa promissora no controle de pragas. Sendo assim, este estudo tem como objetivo purificar parcialmente e caracterizar TAG-lipases do inseto *Sitophilus zeamais* a partir de seu extrato enzimático como possíveis alvos para o desenvolvimento de novas formas de controle. A purificação parcial da TAG-lipase foi realizada utilizando uma coluna de interação hidrofóbica, com injeção de extrato enzimático na qual quatro frações apresentaram atividade lipásica. Em seguida as frações foram imobilizada por eletroforese SDS-PAGE 10% e confirmada por zimograma. A lipase apresentou uma massa molecular de aproximadamente 50 KDa. Em seguida as quatro amostras foram unidas e foi feita a caracterização da lipase. Foi mostrado que a atividade lipásica apresenta crescente com o aumento da concentração de proteínas, também foi exposto que a força iônica não foi capaz de inibir a atividade lipásica, e que o pH ideal da lipase parcialmente purificada foi de 8,5. Por fim a lipase foi parcialmente inibida com uso de inibidor PMSF, mostrando que a enzima isolada tem característica de serinoprotease no sítio ativo.

Palavras chave: *Sitophilus zeamais*, Lipídeos e Triacilglicerol- Lipase.

ABSTRACT

The triacylglycerols, in class of neutral lipids, are essential to maintenance of life in most vertebrates and invertebrates, since part of the energy reserve and serve as substrates for the synthesis of secondary metabolites. Insects mobilization and digestion of this energy reserve is the action of triacylglycerol lipase (TAG- lipase) that provides these lipids in the form of diacylglycerol (DAG) and free fatty acids. Substances that interact and are able to inhibit enzymes essential to survival of insects are a promising alternative for the control of pests. Thus, this study aims to purify and characterize partially-TAG lipases of *Sitophilus zeamais* insect from its enzymatic extract as possible targets for the development of new forms of control. Partial purification of TAG-lipase was performed using a hydrophobic interaction column with enzymatic extract injection in which four fractions showed lipase activity. Then the fractions were immobilized by SDS-PAGE and confirmed by zymography. A lipase with a molecular mass of approximately 50 kDa. Then the four samples were bonded was taken and characterization of the lipase. It was shown that has lipase activity increasing with increasing concentration of protein, was also exposed to the ionic strength was able to inhibit the lipase activity, and that the optimum pH of the partially purified lipase was 8.5. Finally the lipase used was partially inhibited with PMSF inhibitor, showing that the isolated enzyme is serine protease characteristic of the active site.

Keywords: *Sitophilus zeamais*, fatty acids and Triacylglycerol- Lipase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Grãos contaminados por insetos do gênero <i>Sitophilus</i> (A) e inseto <i>Sitophilus zeamais</i> (B).....	18
FIGURA 2 – Ciclo biológico do <i>Sitophilus zeamais</i>	19
FIGURA 3 – Dinâmica metabólica do processo digestivo de lipídeos da dieta em insetos.....	22
FIGURA 4 – Mecanismo de ação do triacilglicerol- lipase.....	23
FIGURA 5 – Reação de hidrólise do substrato com uma enzima lipase onde há como produto a formação de fluorogênico (MUF) e ácido butírico.....	29
FIGURA 6 - Cromatografia (Fenil <i>Sepharose</i>) x (proteína 280 nm) perfil de eluição enzimática (em roxo). Atividade de lipase em Unidades (em preto). E gradiente alcóolico decrescente (em azul). A coluna foi previamente equilibrada com tampão (A) 50mM Tris HCl pH 8,0. Para dessorção das proteínas aderidas a coluna foi usado uma solução alcóolica de etanol a 50% (B). Foram coletados 4 mL em cada fração.....	32
FIGURA 7 - Eletroforese SDS- PAGE a 10% (A), e Zimograma (B) de uma TAG- lipase parcialmente purificada a partir do inseto <i>Sitophilus zeamais</i>	33
FIGURA 8 – Curva de concentração da lipase parcialmente purificada.....	36
FIGURA 9 – Efeito da força iônica na atividade lipásica.....	37
FIGURA 10 – Efeito do pH sobre a atividade de TAG- lipase de <i>Sitophilus zeamais</i> ...38	
FIGURA 11 – Efeito do PMFS na atividade de lipase das amostras parcialmente purificadas do <i>Sitophilus zeamais</i>	40

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma- 1 – Percursos seguidos no trabalho para purificação e caracterização da Lipase.....	27
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela- 1. Purificação da lipase de <i>Sitophilus zeamais</i> por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil <i>Sepharose</i>	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AKH- Hormônio adipocinético (do inglês *Adipokinetic hormone*)

Asp- Aspartato

[]- concentração

DAG- Diacilglicerol

FA- Ácidos graxos (do inglês *fatty acid*)

FATP- Proteína transportadora de ácidos graxos (do inglês *fatty acid transport protein*)

FPLC- cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *Fast Performance Liquid Chromatography*)

HCl- ácido clorídrico

His- Histidina

Gly- Glicina (do inglês *glycine*)

KDa- kilodalton

LP- Lipoproteínas

LTP- Partícula transportadora de lipídeos (do inglês *Lipid transfer protein*)

MAG- Monoacilglicerol

µg- Micrograma

µL- Microlitro

mg- miligrama

mL- mililitro

mM- Milimolar

MM- massa molecular

m/v- massa/ volume

NaCl- cloreto de sódio

nm- nanômetro

PDB- banco de dados de proteínas (do inglês *Protein Data Bank*)

PMSF- Fluoreto Fenilmetanosulfonil (do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida- dodacil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Ser- Serina

TAG- Triacilglicerol

TAG-lipase- Triacilglicerol-lipase

Tris- Trisamina

U- Unidades

URF- Unidades relativas de fluorescência

V/V- volume/ volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Ordem Coleóptera	17
2.2 <i>Sitophilus zeamais</i>	17
2.3 metabolismo de lipídeos em insetos	19
2.3.1 Triacilglicerol lipase.....	22
2.4 Importância do estudo da biologia de insetos	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivo específico	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Insetos	27
4.2 Purificação e caracterização de enzimática	27
4.2.1 Preparo do extrato enzimático.....	27
4.2.2 Dosagem de proteínas	28
4.2.3 Atividade de TAG- Lipase	28
4.2.4 Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica.....	29
4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE	29
4.2.6 Zimograma.....	30
4.2.7 Curva de concentração de TAG- Lipase.....	30
4.2.8 Efeito da força iônica sobre a atividade lipásica.....	30
4.2.9 Efeito do pH sobre a atividade lipásica.....	30
4.2.10 Efeito do Fluoreto Fenilmetanosulfonil (PMSF) sobre a atividade lipásica.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A capacidade agrária brasileira no que se refere a produção de grãos ainda é pouco explorada, contudo a cultura do milho é uma das mais distribuídas, uma vez que facilmente adapta-se aos mais variados ecossistemas. Estimasse que cerca 12 milhões de hectares da cultura seja plantada no país, com uma produção aproximada em torno de 40 milhões de toneladas por ano. Logo, a qualidade das sementes dependerá de um controle eficiente de pragas durante a armazenagem desses grãos e, em geral, pragas de armazenamento atacam grãos e sementes integras vindas do campo destruindo sua massa germinativa e reduzindo seu valor econômico e nutricional (LORINI, 2003; SANTOS, 2006; LORINI et al, 2010).

O gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*) é uma das principais pragas de grãos e cereais. Contaminam a produção muitas vezes ainda no campo, logo após a colheita, e são levados para silos de armazenagem comprometendo a qualidade dos grãos afetados e devastando toda produção (PIMENTEL et al, 2011).

O *S. zeamais* tem um ciclo de desenvolvimento que dura em média 36 dias ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $69 \pm 3\%$ umidade relativa). Uma única fêmea do *S. zeamais* é capaz de ovipor entre 150 e 300 ovos, no interior dos grãos, durante toda vida. Após o período de incubação ocorre a eclosão dos ovos, dando origem às larvas que têm um ciclo de quatro instares todos ocorrendo dentro do grão ao fim do quarto instar, assume uma forma de pré pupa até assumir forma de pupa, que em seguida tornam-se adultos e permanecem no grão por alguns dias para amadurecerem e endurecerem a cutícula. Um pó fino é formado decorrente dos danos causados na massa germinativa, misturada com excrementos do inseto, diminuindo o seu valor econômico e nutricional levando à perda parcial ou total da produção (SHARIFI e MILLS, 1971; LONGSTAFF, 1981; HALSTEAD, 1986; PEREIRA & SALVADORI, 2006; SULEIMAN et al., 2015).

A qualidade dos grãos armazenados aflige os produtores, uma vez que o *S. zeamais* é uma das maiores pragas dentro da cultura de grãos especialmente em climas tropicais. O controle da praga hoje é feito basicamente com uso de defensivos agrícolas e fumigação com fosfina, que, quando manejado de forma inadequada, pode levar a seleção dos insetos mais resistentes ao veneno e ainda causar graves danos à saúde e ao ecossistema (PAES et al. 2012).

Uma das inquietações de órgãos governamentais e entidades ambientais é como controlar o uso indiscriminado de agrotóxicos, a fim de evitar uma possível contaminação do solo, alimentos, lençóis freáticos, mananciais e agricultores que manuseiam esses defensivos.

Por isso a busca de alternativas para o combate a pragas vem chamando a atenção (CARLI, 2006).

A investigação da biologia de pragas segue como uma das alternativas para o controle através do estudo de seu metabolismo. Substâncias que interagem e são capazes de inibir enzimas essenciais para sobrevivência do inseto são uma alternativa promissora no controle de pragas. Alterações no processo metabólico leva a um desequilíbrio fisiológico nos insetos, levando-o à morte (SANTANA, 2014). Desta forma, conhecer mais sobre o metabolismo energético de *S. zeamais* pode constituir em um novo alvo para controle da praga. Como são exíguas informações a respeito do seu metabolismo lipídico, este estudo traz como objetivo purificar parcialmente e caracterizar TAG- lipases como possíveis alvos para o desenvolvimento de novas formas de controle da praga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem Coleóptera

Coleóptera é a mais diversificada ordem da qual se tem conhecimento, dentre todas da classe Insecta. Ela compreende mais de 300 mil espécies descritas abrangendo fartamente diversos nichos ecológicos (WOODCOCK et al., 2013).

Apresentam tamanho variado entre as espécies, com exemplares com menos de 1mm de comprimento até aqueles que medem cerca de 200mm. Apresentam uma dieta variada, todavia espécies fitófagas predominam, não se conhecendo ainda nenhum representante hematófago nesta ordem. Sua grande maioria é de interesse agrícola onde parte das espécies são consideradas praga agrícolas, devastando plantações. Por outro lado, existem diversas espécies que são predadores e úteis no combate a outras pragas agrícolas.

De todas as famílias pertencentes à ordem Coleóptera, a mais populosa é a família *Curculionidae* apresentando cerca de 50.000 espécies relatadas São popularmente conhecidas como gorgulhos em geral são pragas primárias, ou seja, atacam grãos e sementes integros, porém, dentre as espécies de coleópteros, somente a família *Sitophilus* tem importância no que se refere a praga de armazenamento (LONGSTAFF, 1981; REFAEL et al., 2012).

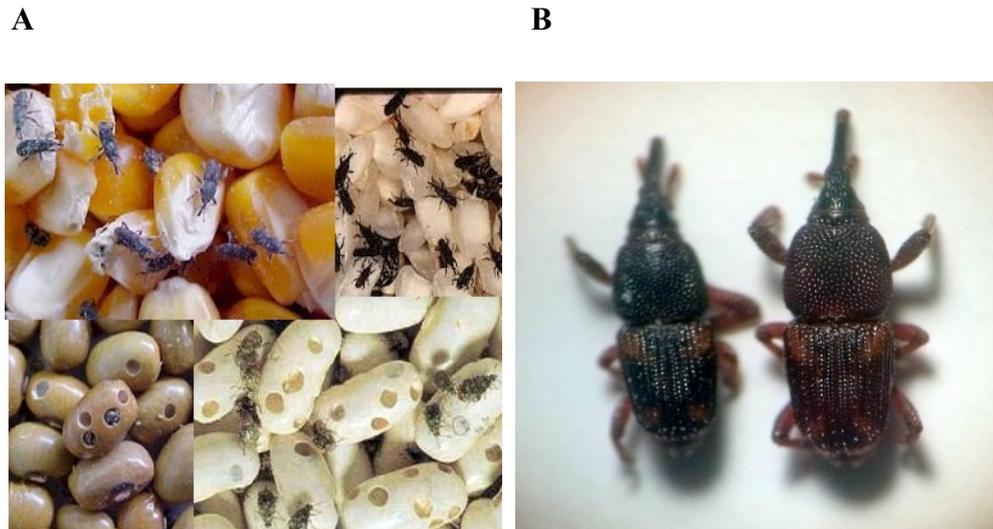
A compreensão de fatores ecológicos que interfiram na evolução dessas pragas é de grande importância para que se aplique medidas de controle com baixo impacto ao meio ambiente. Estudos com coleópteros com finalidade de conhecer seus aspectos metabólicos vêm sendo desenvolvidos para descobrir novas maneiras eficazes no controle dessas pragas. Um exemplo que pode ser tomado é o do *Tribolium castaneum* (besouro castanho) que apresenta um mecanismo biológico bem definido e tem sido usado como segunda escolha como modelo experimental, atrás da *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) (FANCELLI, 2004; DÖNITZ et al., 2013).

2.2 *Sitophilus zeamais*

Uma das grandes dificuldades na armazenagem em silos e galpões é a infestação por espécies de pragas primárias que acometem à produção, depreciando a qualidade e a quantidade dos grãos e sementes, além de comprometer seu valor nutricional (Figura 1A). O *S. zeamais* (Figura 1B) pertence à ordem Coleóptera, da família *Curculionidae*, popularmente conhecido como gorgulho do milho. É uma das pragas de armazenamento mais destrutivas, principalmente em países de clima tropical, sendo conhecidos por perfurar o grão para ovipor e após a eclosão

suas larvas e pupas alimentam-se da massa do grão, diminuindo seu peso, causando perdas significativas tanto econômica como nutricional (ADANE et al., 1996; NOOMHORM et al., 2013; SULEIMAN et al, 2015).

Figura– 1. Grãos contaminados por insetos do gênero *Sitophilus* (A) e inseto *Sitophilus zeamais* (B).

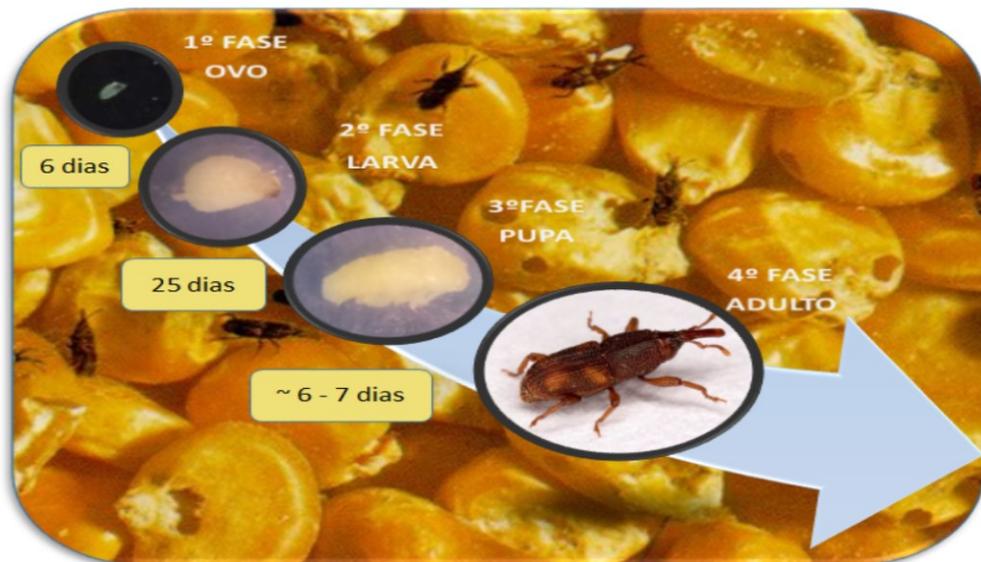


Fonte: AUTOR, 2015.

O *S. zeamais* são holometábolos, uma vez que passam por um processo de metamorfose completa, com mudanças físicas radicais, passando do estado de larva para pupa e inseto adulto. A fêmea, após a postura de seus ovos, fecha as cavidades com um muco seroso produzido pela sua saliva. O ciclo completo de ovos até inseto adulto dura em torno de 36 dias até a saída do inseto do grão (Figura 2). Seus ovos são delicados e apresentam uma coloração esbranquiçada medindo em torno de 0,76 x 0,27 mm. A eclosão se dá 6 dias após a oviposição em uma temperatura de 25 °C. As fêmeas continuam ovipondo durante toda sua vida e nesse intervalo uma fêmea pode pôr entre 150 e 300 ovos. Após a eclosão inicia-se a fase de larva que dura em média 25 dias. As larvas são amarelo-esbranquiçadas com cabeça marrom escura, apodas, curculiformes medindo de 1,0- 2,0 mm e passam por 4 instares durante sua metamorfose. A seguir passa por um estágio de pré pupa com formação de patas até o amadurecimento completo formando o inseto adulto. É importante ressaltar que o inseto permanece no grão alguns dias até endurecimento de sua cutícula. Os insetos adultos medem entre 2,0- 3,5 mm de comprimento, apresentam coloração castanha avermelhada bem definida

nos élitros, tem cabeça projetada para frente com rosto afilado em forma de tromba (LECATO & FLAHERTY, 1974; LONGSTAFF, 1981; PEREIRA e SALVADORI, 2006; BLACKISTON et al., 2008; ANTUNES e DIONELLO, 2010).

Figura- 2. Ciclo biológico do *Sitophilus zeamais*.



Fonte: Autor 2015.

2.3 Metabolismo de lipídeos em insetos

A maioria dos insetos produzem uma enorme quantidade de ovos a cada ciclo de postura. Para que haja o desenvolvimento de ovócitos são necessárias grandes quantidades de reservas energéticas, como carboidratos, lipídeos e proteínas, que serão úteis durante o desenvolvimento embrionário dos insetos (ARRESE e SOULAGES, 2010; ATELLA et al., 2012).

Os lipídeos são macromoléculas essenciais para diversas formas de vida, uma vez que são responsáveis pela homeostase energética. Nos insetos, assim como na maioria dos vertebrados, os lipídeos são a principal forma de armazenamento energético, é o componente de membranas mais abundante e ainda serve como material de partida para síntese de metabolitos secundários tais como esteroides, hormônios e feromônios. De maneira geral existem limitações biológicas na utilização dessa forma energética. O sucesso evolutivo dos insetos se deu graças a sua capacidade de armazenar lipídeos para uso posterior, mobiliza-los para manutenção do crescimento, reprodução, voo ou metabolismo celular (CAREY et al., 1983; GRILLO, 2005; HORNE et al., 2009; JOHNSON et al., 2014).

Apesar das semelhanças no metabolismo lipídico entre insetos e vertebrados, os processos evolutivos em milhões de anos levaram ao desenvolvimento de particularidades na mobilização, transporte e reaproveitamento de lipídeos pelos insetos, e esses desvios continuam sendo enigmáticos, acredita-se que são formas de adaptação ao meio, porém eficácia dessas adaptações e seu funcionamento são inestimáveis (BEENAKKER et al., 1985).

A quantidade de lipídeo pode variar em cada classe de inseto, isso dependerá entre vários fatores, dentre eles condições ambientais, fase de desenvolvimento, estado nutricional, tempo de voo migratório e temperatura ambiental. Muitas variedades de lipídeos são formadas com a adição de diferentes ácidos graxos e insaturações, levando a formação de novos lipídeos. Como essa gama de variações lipídicas ocorre no organismo dos insetos, e de que maneira fatores externos podem influenciar sem que ocorra modificações na homeostase lipídica ainda é indeterminado, porém grandes esforços estão sendo lançados a fim de melhorar estudos acerca do metabolismo lipídico em insetos (BEENAKKER et al., 1985; SHEVCHENKO e SIMONS et al., 2010; TZOMPA-SOSA et al., 2014; LAIANO et al., 2015).

Em experimentos realizados por Gilby (1965) foi realizada a extração de lipídeos com uso de solventes orgânicos de insetos inteiros ou ceras produzidas por eles. O autor mostrou que a composição lipídica do substrato é constituída de várias classes de lipídeos, tais como os fosfolipídios, glicolipídeos, esteróis e triacilglicerol (TAG). Apesar da grande variedade de lipídeos presentes no extrato, cerca de 80% dele está sob a forma de TAG, e ácidos graxos livres causados pela hidrólise dos gliceróis, embora possam ocorrer variações entre as espécies, a elevada a quantidade de TAG é mantida.

Insetos, assim como a maioria dos animais, armazenam grandes quantidades de energia na forma de TAG (ARRESE e SOULAGES, 2010; SOULAGES et al., 2015). O principal órgão de armazenamento de lipídeos em insetos é o corpo gorduroso. Ele é formado por agregados celulares que se espalham pelo corpo do inseto, e está intimamente ligado ao intestino dos insetos, o que facilita a absorção de nutrientes da dieta. O corpo gorduroso tem função metabólica equivalente ao fígado e tecido adiposo em vertebrados, já que ele não se restringe apenas a estocar lipídeos e carboidratos, mas também é responsável por uma série de reações metabólicas intermediárias, fornecimento de proteínas e metabolitos (GILBERT e CHINO, 1971; BEENAKKERS et al., 1985; CANAVOSO et al., 2001; ARRESE e SOULAGES, 2010).

Kawooya e Law (1988) mostraram que em ovos de *M. sexta* mais de metade dos lipídeos estava sob a forma de TAG, em ovo *H. cecropia* cerca de 60% dos lipídeos eram armazenados principalmente sob a forma de TAG com discretas gotículas lipídica em seu

interior e os 40% restantes constituíam lipídeos associados a lipoproteínas, mostrando que assim como no corpo gorduroso, os ovários podem armazenar lipídeos e predominando o TAG, possivelmente esses lipídeos são incorporados a partir da hemolinfa.

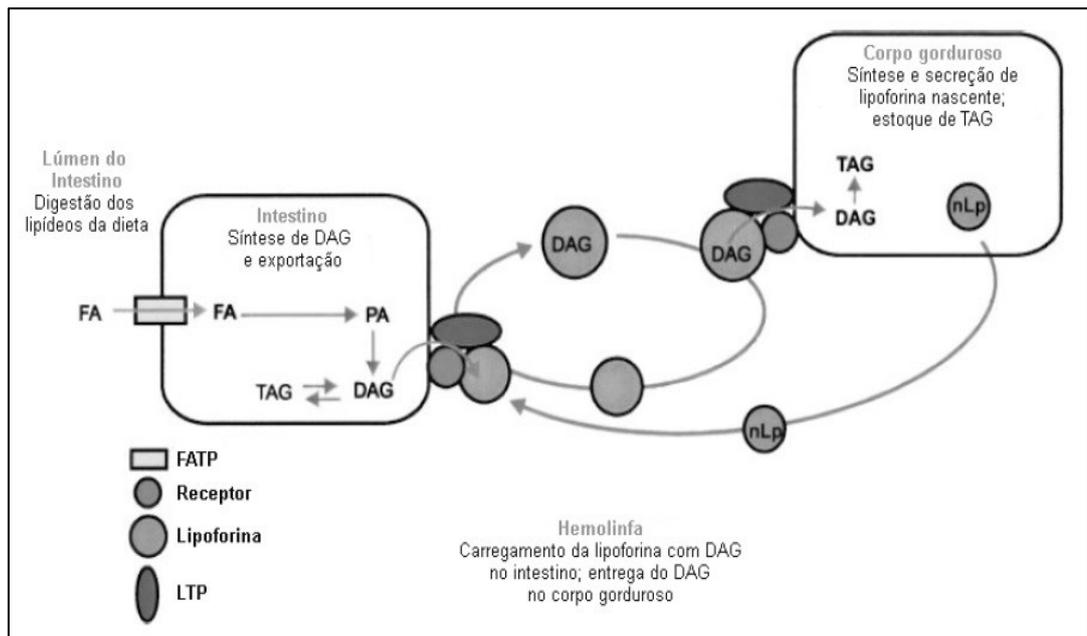
Até o momento, dois modelos acerca da mobilização de lipídeos da dieta em insetos foram propostos:

- ✓ O primeiro mostra a completa hidrólise de TAG a ácidos graxos e glicerol. Os experimentos foram realizados marcando radioativamente a dieta do inseto e posteriormente observou-se o produto final da hidrólise (WEINTRAUB e TIETZ, 1973).
- ✓ O segundo propõe que a hidrólise de TAG gera monoacilgliceróis e ácidos graxos. Esse modelo foi sugerido após experimentos realizados com TAG marcado radioativamente incubado com homogenato de intestino médio de barata americana (*Periplaneta americana*) após a análise do produto da lipólise (HOFFMAN e DOWNER, 1979).

Canavoso e Wells (2000) em experimentos com insetos de diversas ordens usando trioleína marcada radioativamente, demonstraram que, após serem digeridos no lúmen intestinal, os lipídios eram rapidamente absorvidos na forma de diacilglicerol (DAG) pelo enterocitos. A formação desses DAG's ocorreu, possivelmente, pela acilação de moléculas de 2-monoacilglicerol (MAG) ou ainda através da glicerol 3-fosfato formando DAG pela via do ácido fosfatídico usando como substrato ácidos graxos provenientes da hidrólise de TAG (CANAVOSO e WELLS, 2000; GRILLO, 2005).

Os resultados sugerem que ácidos graxos provenientes da hidrólise de TAG, da dieta dos insetos, independentemente da via seguida, são inicialmente convertidos em TAG pelo inseto, que então será convertido em DAG e liberado constantemente para serem então transportados pela lipoforina para hemolinfa (Figura 3).

Figura- 3. Dinâmica metabólica do processo digestivo de lipídeos da dieta em insetos.



Fonte: MAJEROWICZ, 2009.

2.3.1 TAG- lipase

Pesquisas com enzimas capazes de degradar lipídeos datam de mais de cem anos, logo, estudos sobre essas enzimas lipolíticas como lipases, esterases e fosfolipases tomaram impulso. Lipases são enzimas versáteis, capazes de interagir com uma gama de substratos e apresentam-se estáveis frente a solventes orgânicos (MACCABE e POLAINA, 2007). O TAG é a principal fonte lipídica e energética para o metabolismo em todos os animais. Durante a metamorfose o inseto acumula lipídeos para que a demanda energética seja suprida principalmente na fase de pupa. São armazenados sob formas de gotículas de lipídeos e fosfolipídeos, ficam retidos no citoplasma das células do corpo gorduroso revestidos por proteínas. Várias destas proteínas estão envolvidas na regulação e mobilização de TAG. Das proteínas envolvidas no metabolismo lipídico a TAG- lipase é a principal catalisadora de TAG oriundo da dieta e acumulado em gotículas de gordura (HORNE et al., 2009; ARRESE et al., 2010a; WU et al., 2014).

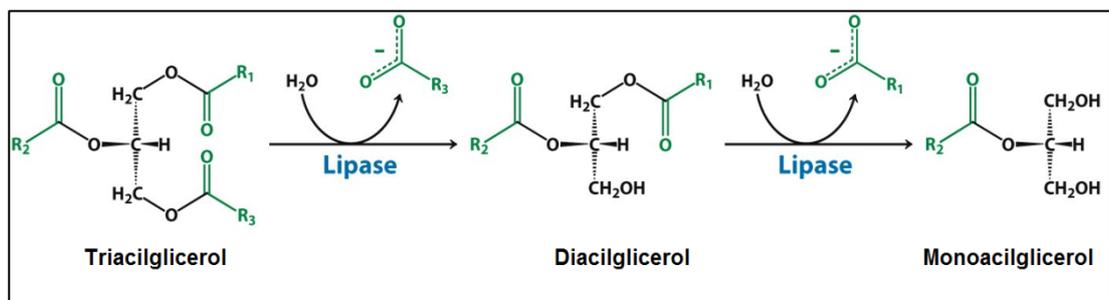
Na maioria dos seres vivos as lipases podem ser classificadas em seis famílias: as lipases neutras, lipases ácidas, lipases 2, lipases 3, GDSL e lipases sensíveis a hormônios

(HOLMQUIST, 2000; HORNE et al., 2009). Diferentes lipases entre várias espécies possuem em comum uma sequência altamente conservada de aminoácido que caracteriza sua estrutura de genes, em particular no sítio ativo de ligação enzima- substrato, o pentapeptídeo (Gly-X-Ser-X-Gly), sendo X qualquer aminoácido. Outros resíduos conservados em lipases são as tríades catalíticas de Ser-Asp-His presentes no sítio ativo de lipases (HIDE et al., 1992; BRAVO-RUIZ, et al., 2013).

Lipases neutras, também conhecidas como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3) por clivarem ligações de éster carbóxilo em triacilglicerol, estão registradas no *Protein Data Bank* (PDB), porém elas também são capazes, em algumas situações, de clivar fosfolipídeos (HORNE et al., 2009). Têm papel fundamental na mobilização energética em insetos, agindo sob processos fisiológicos básicos, tais como: reprodução, crescimento, produção e liberação de feromônios sexuais (CANAVOSO et al., 2001; HORNE et al., 2009; SANTANA, 2014). Nos insetos é no intestino onde ocorre a ação das enzimas digestivas responsáveis por hidrolisar substratos originários da dieta e a atividade de enzimas tais como fosfolipases. A TAG- lipase e a colesterol esterase são intensas no intestino médio garantindo a sobrevivência das espécies (GRILLO et al., 2007; CHRISTELLER et al., 2011).

A TAG- lipase atua na interface lipídica de substratos emulsificados. Esta lipase tem preferência por hidrolisar ácidos graxos insaturados na posição 1 e 3 das moléculas de TAG (Figura 4) e é ativada por íons Ca^{2+} , semelhante ao que ocorre em mamíferos (GRILLO et al., 2007).

Figura- 4. Mecanismo de ação do TAG- lipase



Fonte: STRYER et al., 2014.

Lipases neutras têm a capacidade de hidrolisar TAG, DAG, MAG e ainda fosfolipídeos na posição sn-1 (DEREWENDA, 1994). Nos mamíferos, existem várias lipases com funções bem definidas. As lipases pancreática e gástrica são formas ácidas que hidrolisam lipídeos

provenientes da dieta no lúmen intestinal, o produto dessa degradação é a formação de MAG e ácidos graxos livres que são rapidamente absorvidos pelas células intestinais. As lipoproteínas lipases, que fazem parte das lipases neutras, desempenham uma função de hidrólise de TAG, VLDL e quilomicrons, e são consideradas uma enzima fundamental no tecido periférico. Estão presentes na superfície de capilares sanguíneos, tecido adiposo, músculos e na glândula mamária no período de lactação (GRILLO, 2005; CHRISTIE, 2014).

Em estudos realizados por Horne et al. (2009), foi realizada análise genômica funcional entre as espécies de holometábolos *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori* e *Tribolium castaneum* e confrontado o número de lipases expressas entre as seis famílias de lipases. Os pesquisadores observaram que entre os insetos pesquisados não foram encontrados nenhuma lipase tipo 2, poucas lipases tipo 3, GDSL e sensível a hormônio. Por outro lado, as lipases ácidas e neutras foram expressas em quantidades muito superiores comparadas com as outras lipases entre os holometábolos de sua pesquisa.

Outro dado relevante destes estudos realizados por Horne et al. (2009) é que foi verificado que muitas das lipases ácidas e neutras não apresentavam a tríade catalítica, o que provavelmente pode explicar uma ausência da atividade lipolítica, e que essas proteínas apresentam outras funções fisiológicas em holometábolos tais como transporte e armazenamento de lipídeos durante a fase de desenvolvimento. Eles também observaram diferenças estruturais entre as lipases neutras dos holometábolos e lipases neutras em mamíferos pelas análises de expressão e filogenética. No entanto há uma escassez de dados enzimológicos em insetos, e não existem dados sobre a especificidade de substratos, nem preferência estereo específica ou cinética nas diversas famílias de lipases em insetos.

2.4 Importância do estudo da biologia de insetos

Em razão das poucas informações a respeito da biologia e metabolismo dos insetos, o controle de diversas pragas em pequenas plantações é realizado de forma precária e ineficaz, na maioria das vezes. O controle ineficaz de pragas e o aumento da resistência das pragas a inseticidas agrícolas têm levado a um maior interesse dos pesquisadores em desenvolver bioinseticidas que tragam maior custo-benefício e que sejam eficazes no controle, além de serem biocompatíveis. Dessa forma, o número de estudos sobre a biologia dos insetos e principalmente sobre o sistema digestivo e suas enzimas tem aumentado nas últimas décadas, com o propósito de identificar novos alvos potenciais para controle. Esses meios de controle de

pragas de insetos baseados em sua biologia são também chamados de meios de controle biorracionais (SILVA et al., 2012).

Atualmente, algumas técnicas tentam desenvolver um controle de pragas baseado na inibição seletiva de enzimas do inseto, provocando efeitos prejudiciais no crescimento das larvas, por evitarem a digestão e assimilação de nutrientes, causando retardo do desenvolvimento e conseqüente morte (ALARCÓN et al., 2002). É conhecido que as próprias plantas possuem mecanismos de defesa contra fitófagos baseados na inibição de proteases do inseto-praga (RYAN, 1981).

O motivo para o sistema digestivo de insetos ser o grande foco das pesquisas é a sua potencialidade como alvo para controle. As funções digestivas representam um modelo riquíssimo de informações sobre seu metabolismo, já que os insetos fornecem excelente modelo para estudar enzimas digestivas, especialmente porque existem espécies adaptadas a quase todos os tipos de clima e hábitos alimentares variados (BÉDIKOU et al., 2010).

Com os avanços das técnicas de proteômica, genômica e metabolômica, motivadas pelo número crescente de genomas completos de plantas e insetos, há uma grande expectativa de que mais detalhes sejam revelados sobre a fisiologia da digestão em insetos, favorecendo novas perspectivas para técnicas de controle (SILVA et al., 2012).

O epitélio intestinal é a maior interface entre um inseto e o meio ambiente. Neste conceito, é razoável se pensar que a interferência no processo digestivo dos insetos deva culminar em comprometimento da sua sobrevivência. Hoje, a procura por novos métodos de controle, que agem através do intestino, vem crescendo. Estratégias baseadas em biomoléculas (inibidores de enzimas, lectinas, quitinases, etc.) já vêm sendo testadas. Porém, antes de se pensar em métodos de controle, tem-se que, primeiramente, ter um conhecimento sólido sobre a fisiologia do inseto a ser combatido. Assim, estudos sobre morfologia e processos digestivos se tornam essenciais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar uma TAG- lipase no inseto *Sitophilus zeamais*.

3.2 Objetivos específicos

Obtenção de extrato enzimático do *S. zeamais*;

Purificar uma TAG- lipase através de processos cromatográficos;

Caracterizar a TAG- lipase quanto ao perfil proteico por SDS-PAGE e zimografia;

Avaliar atividade lipásica com o substrato MUF- butirato;

Avaliar curva de concentração sobre a atividade lipásica;

Avaliar o efeito do (a): força iônica, pH e PMSF sobre a atividade lipásica.

4 METODOLOGIA

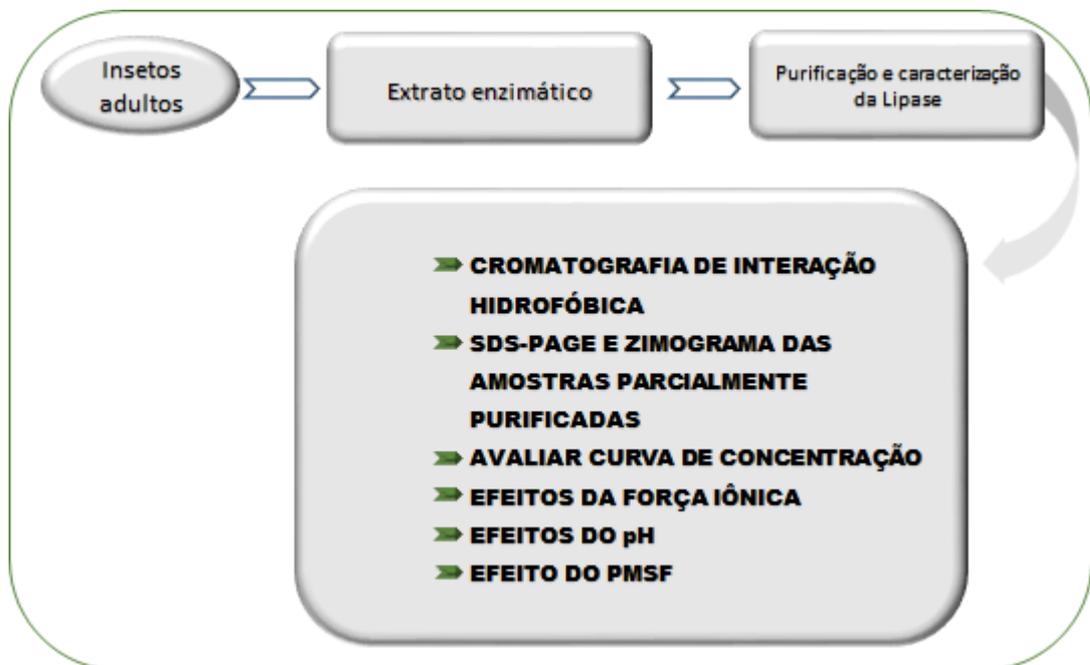
4.1 Insetos

Os insetos (*S. zeamais*) foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas. Foram mantidos a uma temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa de $70 \pm 5\%$, alimentando-se com grãos de milho como descrito por SHARIFI e MILLS, 1971 e ANTUNES et al., 2011.

4.2 Purificação e caracterização enzimática

A purificação e caracterização enzimática do extrato bruto do *S. zeamais* foi realizada seguindo o fluxograma 1 apresentado abaixo.

Fluxograma- 1. Percursos seguidos no trabalho para purificação e caracterização da TAG- lipase.



Fonte: Autor 2015.

4.2.1 Preparo do extrato enzimático

Para o preparo do extrato foram utilizados aproximadamente 1000 insetos adultos machos e fêmeas, que foram imobilizados sob refrigeração, em seguida foi adicionado 6 mL de

tampão Tris HCl 50mM pH 8,0 os insetos foram triturados em um homogenizador de Potter-Elvehjem com pistilo de vidro, mantendo sempre em banho de gelo. Em seguida foi sonificado por 10 minutos em banho no sonicador (Ultra Cleaner 700, Unique[®], São Paulo, Brasil). Logo após o homogenato foi centrifugado a 6000 G por 15 minutos numa temperatura de 4 °C, em ultra-centrífuga (HITACHI micro ultracentrifuge CS150NX). A gordura flutuante foi removida e o sobrenadante transferido para tubos tipo eppendorf e mantidos refrigerados para uso posterior (Adaptado de BRABCOVA et al., 2013).

4.2.2 Dosagem de proteínas

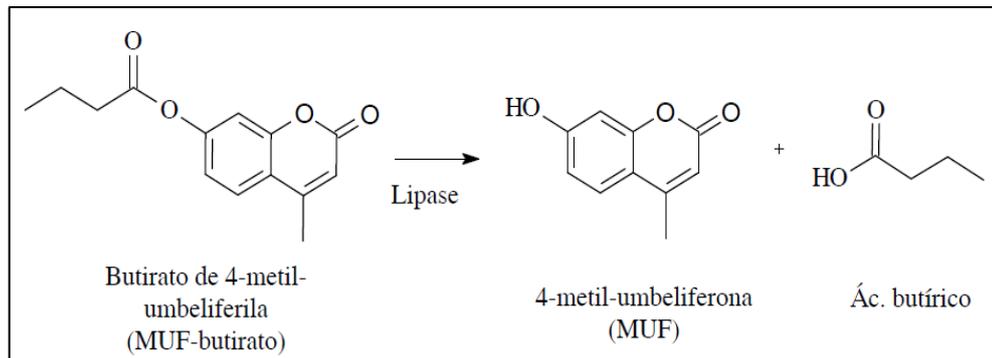
Os níveis de proteínas solúveis do extrato enzimático dos tecidos dos insetos foram mensurados pela metodologia de Bradford (1976), através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 595 nm, empregando albumina do soro bovino como padrão.

4.2.3 Atividade de TAG- Lipase

A atividade enzimática foi realizada utilizando o substrato butirato de 4-metilumbeliferila (MUF-butirato), fabricado pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) como descrito por Prim et al. (2003). Um esboço da degradação do substrato em reação com a enzima é mostrada na figura 5. Na reação, é formada metil-umbeliferona (fluorogênico) como produto de degradação que é um indício de reação enzimática. No preparo do reagente de trabalho, o substrato foi solubilizado em monometiléter etilenoglicol, fabricado pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA), na concentração de 25 mmol.L⁻¹. O substrato acima solubilizado foi diluído em tampão Tris- HCl (50mM.L⁻¹, pH 8,0), numa concentração de 100 µmol.L⁻¹.

Em cada poço da microplaca onde ocorreu a reação, foi adicionado 30 µL de amostra contendo enzimas, 20 µL de Tris- HCl 50mM, pH 8,0 e 150 µL substrato pronto para uso. Em seguida a microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Terminada a incubação, a leitura foi realizada em fluorescência no leitor de microplacas (*FlexStation 3 Molecular devices*), com excitação em 340 nm e emissão de 450nm. Os valores foram dados em unidades relativas de fluorescência (URF), que posteriormente foi convertido em unidades.

Figura- 5. Reação de hidrólise do substrato com uma enzima lipase onde há como produto a formação de fluorogênico (MUF) e ácido butírico.



Fonte: (SANTOS, 2005).

4.2.4 Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica

O método para purificação da TAG- lipase do *S. zeamais* foi realizado em um sistema de cromatografia líquida FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography- ÄKTA pure 150 Protein Purification System*). A coluna utilizada foi *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* com volume de 20 mL. Inicialmente a coluna foi lavada com água de miliQ. O sobrenadante da amostra (5mL) e aplicados na coluna previamente equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8,0 (tampão A), nestas condições há a adsorção das proteínas ao suporte hidrofóbico, em seguida foi realizada a dessorção com o gradiente decrescente de uma solução hidroalcolica contendo etanol 50% (solução B). A corrida durou aproximadamente 4,5 horas e foram coletadas frações de 4 mL.

4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas com poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970). O extrato bruto e as frações que apresentaram atividade lipásica foram diluídos em tampão de amostra que continha: 1,25 mL Tris- HCl 0,5 M pH 6,8; 10 % (m/v) de SDS, 10 % (v/v) de glicerol, 5 % (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,005 % (m/v) de azul de bromofenol e 10 mL de água deionizada. O gel foi preparado a 10% (m/v) de poliacrilamida. As amostras preparadas para o SDS-PAGE foram inativadas com aquecimento a 90 °C por 5 minutos. Foi utilizado um marcador de massa molecular (Promega Corporation USA) que continha padrões

de proteínas que variavam de (10- 225 KDa). As amostras foram reveladas nitrato de prata Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

4.2.6 Zimograma

Para zimografia foi utilizado um gel de poliacrilamida em condições nativa, ou seja, o gel não continha os agentes desnaturantes, dodecil sulfato de sódio (SDS) e beta mercaptanol, e as amostras não foram fervidas antes de injeta-las na eletroforese. Após o término da eletroforese, o gel foi retirado e lavado por 30 minutos em solução que continha Triton X-100 em uma concentração de 2,5 % (v/v) diluído em tampão Tris- HCl 50 mM, pH 8,0, como proposto por Diaz et al. (1999). Em seguida foi imerso no mesmo tampão Tris- HCl 50 mM, pH 8,0 por 5 minutos, e por fim, colocado para revelar em substrato de MUF- butirato por 15 minutos para captura da imagem no transiluminador (gel logic 200 imaging system kodak).

4.2.7 Curva de concentração de TAG- lipase

A avaliação de TAG- lipase foi realizada em função da variação na quantidade de enzima adicionada [3, 6, 9, 12, 15, 18] µg. As análises foram realizadas conforme o item 4.2.3. usando frações proteicas após a cromatografia.

4.2.8 Efeito da força iônica sobre a atividade lipásica

O comportamento da TAG- lipase frente aos efeitos da força iônica foi analisado acrescentando concentrações progressivas [0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0] M de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil), que foi adicionado à mistura de reação e analisado conforme o item 4.2.3, após a purificação.

4.2.9 Efeito do pH sobre a atividade lipásica

A atividade enzimática foi medida em diferentes valores de pH. Foram utilizados tampão acetato de sódio 1 M em pH de 5,5 a 6,5; tampão Tris-HCl 1M em pH de 7,0 a 9,0. O pH das soluções tampão foram ajustados com ácido acético e ácido clorídrico, respectivamente, em pHmetro (HANNA[®] instruments Romênia) devidamente calibrado. As análises foram realizadas conforme o item 4.2.3, após a purificação.

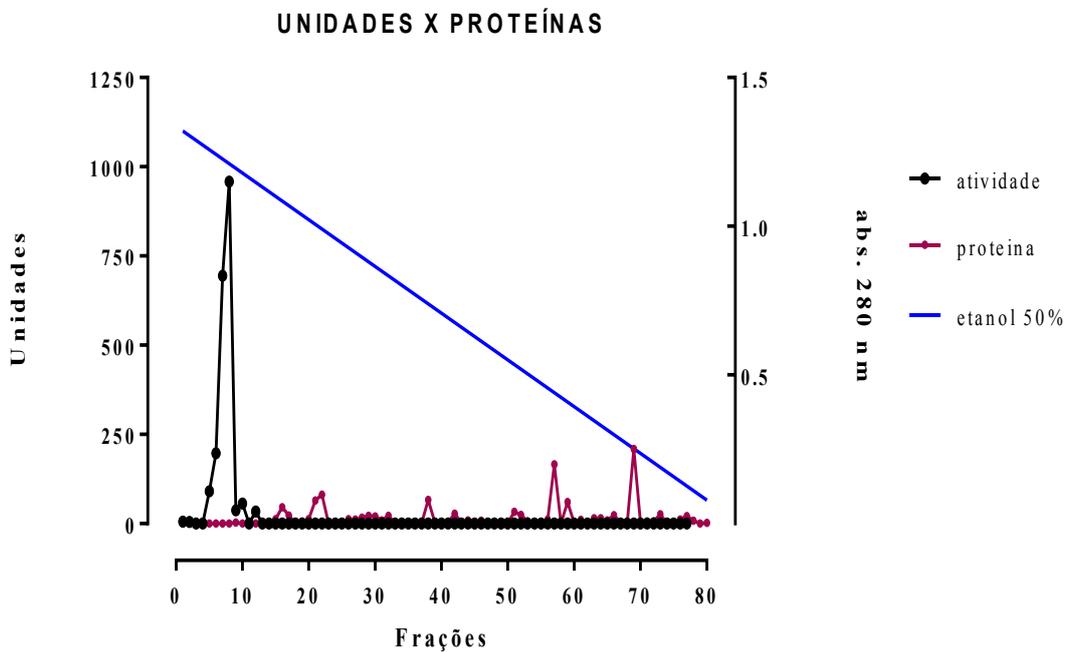
4.2.10 Efeito do fluoreto fenilmetanosulfonil (PMSF) sobre a atividade lipásica

Os efeitos do PMSF (Sigma Aldrich[®], St. Louis, EUA) na atividade de TAG- lipase foram avaliados usando concentrações progressivas [0; 2,5; 3,5; 5,0] mM da substância, que foi adicionada à mistura de reação e analisados conforme o item 4.2.3, após a purificação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O extrato proteico foi aplicado na coluna de interação hidrofóbica e ao fim da corrida foram coletados 77 tubos de amostras. O perfil cromatográfico correspondente as amostras parcialmente purificadas do extrato enzimático estão representadas na Figura 6.

Figura 6 Cromatografia (Fenil *Sepharose*) x (proteína 280 nm) perfil de eluição enzimática (em roxo). Atividade de lipase em Unidades (em preto). E gradiente alcóolico decrescente (em azul). A coluna foi previamente equilibrada com tampão (A) 50mM Tris HCl pH 8,0. Para dessorção das proteínas aderidas a coluna foi usado uma solução hidro alcóolica de etanol a 50% (B). Foram coletados 4 mL em cada fração.



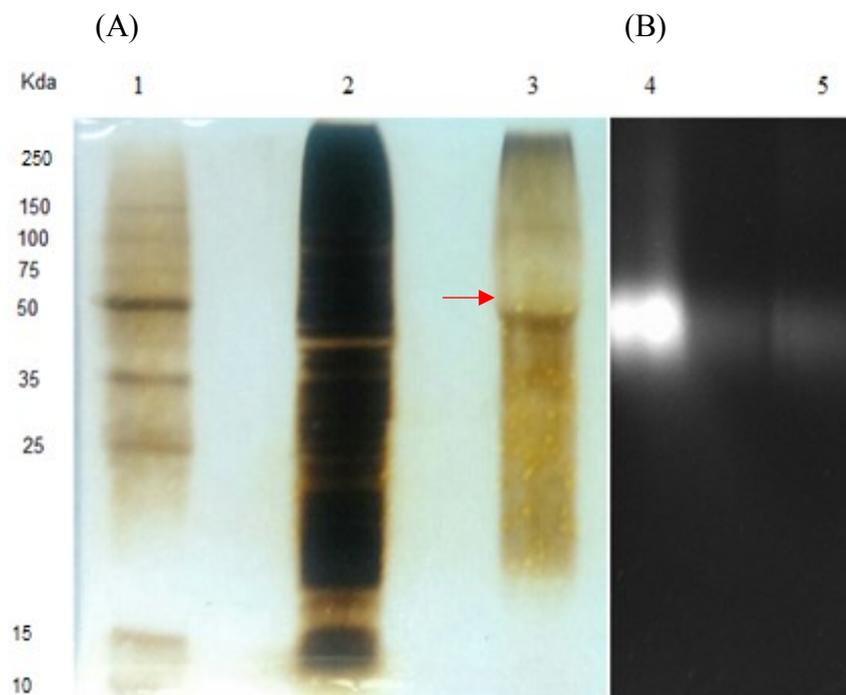
Fonte: AUTOR, 2015.

As frações 5, 6, 7 e 8 apresentaram atividade elevada frente ao substrato MUF butirato em uma faixa de baixa quantidade de proteínas. A purificação parcial foi realizada utilizando somente uma coluna de interação hidrofóbica, e a amostra não passou por fracionamento salino. O número de etapas empregados na estratégia de purificação de proteínas dependerá da purificação desejada e a empregabilidade do produto final adquirido. Em cada processo de

purificação há uma perda de atividade da enzima, logo, para se ter um bom rendimento é desejável o menor número possível de etapas (LIMA et al., 2010).

As frações parcialmente purificadas foram unidas e concentradas para os ensaios posteriores. Essas amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e apresentaram uma massa molar numa região aproximada de 50 KDa (Figura 7A). A fim de confirmar a capacidade hidrolítica destas frações foi realizado teste de atividade lipásica em gel de poliacrilamida em condições nativas utilizando MUF butirato como substrato (zimograma), este experimento mostrou que as frações coletadas têm alta atividade de hidrólise deste substrato (Figura 7B), o que reforça os dados cromatográficos apresentados acima.

Figura- 7. Eletroforese SDS- PAGE a 10% (A), e Zimograma (B) de uma TAG- lipase parcialmente purificada a partir do inseto *Sitophilus zeamais*. 1: marcador de massa molecular; 2: extrato bruto; 3: enzimas parcialmente purificadas correspondente aos tubos de amostras 5-8 reunidos; 4: zimografia do extrato bruto; 5: zimografia das amostras 5-8 reunidas. A eletroforese ocorreu a uma voltagem constante (110 mV). O SDS-PAGE reveladas nitrato de prata e o zimograma revelado com MUF- butirato.



Fonte: AUTOR, 2015.

A purificação do extrato proteico em suportes de interação hidrofóbica tem se mostrado um eficiente método na purificação TAG- lipase, vários autores vêm reportando a utilização dessa ferramenta na purificação da proteína em questão. Em experimentos realizados por Brabcová et al. (2013), a purificação do extrato proteico da glândula labial de *Bombus terrestris* foi realizada com auxílio de um suporte de interação hidrofóbica Octil agarose em um único passo cromatográfico. Outro experimento de purificação e caracterização de uma TAG- lipase onde a fonte de enzimas foi o extrato de *Litopenaeus vannamei* foi utilizado um suporte de interação hidrofóbica também com um único passo onde autor foi capaz de purificar sua enzima, a dessorção da coluna foi realizada com frações crescentes de propanol (Rivera-Pérez et al., 2011). Por outro lado, Arrese et al. (2006) utilizaram vários passos cromatográficos para purificar uma TAG- lipase do corpo gorduroso de *Manduca sexta*. Primeiro usaram uma coluna de troca iônica DEAE o que não foi suficiente para purificar, logo usaram uma coluna de troca aniônica Q- *sepharose*, e por fim uma coluna de interação hidrofóbica fenil *sepharose*, sua enzima apresentou massa molecular próximo de 66 KDa.

Em outro experimento com *Cephaloleia presignis* uma TAG- lipase foi isolada em usando mais de uma etapa cromatográfica, na primeira utilizou-se uma coluna de troca iônica DEAE-5PW e na segunda etapa uma coluna de interação hidrofóbica fenil 5PW, a enzima apresentou uma massa molecular próximo de 31 KDa (Arreguín-Espinosa et al. 2000). Logo tanto nos resultados apresentados por Arrese e colaboradores (2006) e Arreguín-Espinosa e colaboradores (2000) houve uma diminuição no rendimento final de suas enzimas recuperadas, uma vez que quanto mais etapas cromatográficas forem realizadas menor a quantidade de enzimas é recuperada no final do processo de purificação.

A purificação de TAG- lipase em micro-organismos é realizada de maneira semelhante a que é feito em extrato proteico de insetos. Fernández-Lorente et al. (2005) purificaram diferentes lipases em extrato de *Aspergillus niger* utilizando suporte hidrofóbico na ocasião duas TAG- lipase foram isoladas uma com massa molecular próximo a 43 KDa e outra com 65 KDa.

Em nossos experimentos a massa molecular da enzima parcialmente purificada ficou em uma região de proteínas de aproximadamente 50 kDa semelhante aquelas apresentadas (Figura 7B). Em experimentos realizados a fim de isolar uma TAG-lipase das larvas de *Pieris brassicae* (Lepdoptera), foi reportado que a enzima isolada apresentou uma massa molecular de aproximadamente 72,3 KDa, já em outros experimentos realizados com *Gryllus campestris* (Orthoptera: Gryllidae), uma TAG-lipase foi purificada a partir de homogenato do corpo total do inseto, purificada em coluna de gel filtração que apresentava uma massa molecular de 76,5

KDa. (Zibae 2012; Örsçelik et al. 2007). Horne et al. (2009) em uma revisão sistemática realizou experimentos comparativos entre lipase em holometábolos e mamíferos, reportou que a massa molecular das lipases em insetos pode variar de 20- 100 KDa.

Após purificação parcial da TAG-lipase e determinação de sua massa molecular aproximada as amostras com alta atividade lipásica reunidas foram usadas para realizar os testes de caracterização enzimática. O processo de purificação é mostrado na (tabela 1). Após a purificação parcial da enzima observou-se que houve um enriquecimento de aproximadamente 2,16 vezes das frações em relação ao extrato enzimático, e a atividade específica passou para aproximadamente 1995,07 U.mg⁻¹ após purificada usando MUF butirato como substrato. Utilizando 3,46 mg de proteínas a partir do extrato enzimático, ao final da purificação parcial foram recuperados 1,02 mg de proteínas após a coluna Fenil *sepharose*.

A tabela de purificação é um importante instrumento onde observa-se a dinâmica de purificação da proteína, um dos parâmetros mais importante disposto na tabela, é o percentual de recuperação de proteínas. Quando a recuperação é menor que 100% é um sinal que houve perda proteica durante o processo de purificação, por outro lado quando a recuperação é maior que 100%, sugerisse que houve ativação de uma enzima pela remoção de um inibidor que inicialmente estaria presente no extrato enzimático (Scopes, 2002).

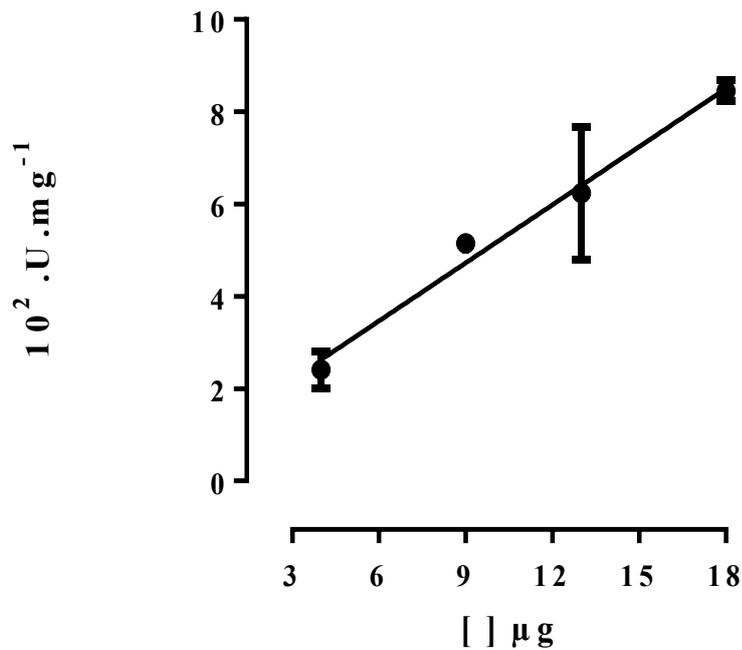
Tabela- 1. Purificação da lipase de *Sitophilus zeamais* por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil *Sepharose*.

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U.mg⁻¹)	Fator de Purificação	%
Extrato enzimático	3189,69	3,46	921,88	1,00	100
Fenil <i>sepharose</i>	2034,97	1,02	1995,07	2,16	63,79

Fonte: AUTOR, 2015.

Uma curva de concentração de proteínas foi realizada para observarmos qual seria a faixa ideal de proteínas para realizarmos os demais testes. As amostras apresentaram um aumento de linear na a atividade de lipásica frente ao aumento na concentração de proteínas.

Figura- 8. Curva de concentração da TAG- lipase parcialmente purificada

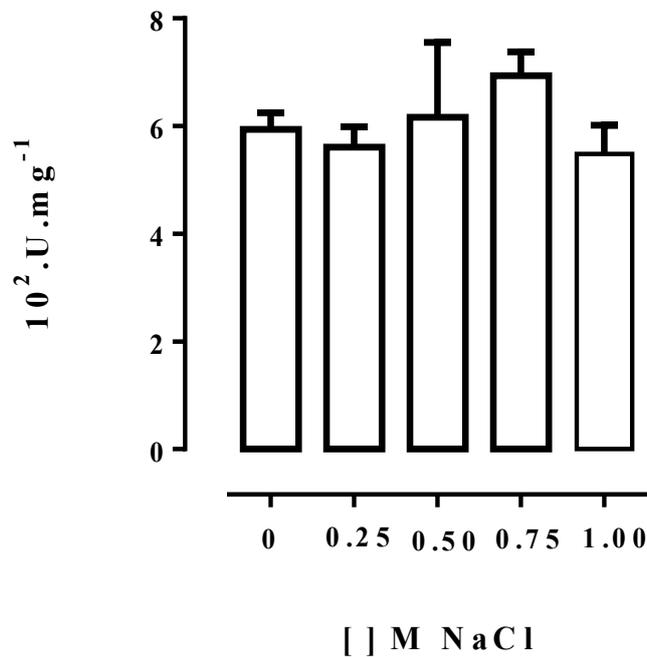


Fonte: AUTOR, 2015

A partir destes dados passamos a executar os experimentos com 13 µg de proteínas. Em experimentos realizados com larvas de *Rhynchophorus palmarum* e no inseto *Rhodnius prolixus* apontou que o aumento da atividade lipásica foi proporcional ao aumento da concentração de proteínas usadas para realizar o experimento, corroborando com nossos resultados e mostrando que aumento na taxa de hidrólise pela TAG- lipase é proporcional a concentração de enzimas utilizadas (SANTANA, 2014; GRILLO et al., 2007). Hirayama e Chino (1987) reportaram que o aumento da atividade de TAG- lipase ocorreu com o aumento da concentração de enzimas em experimentos com *Locusta migratoria* que foi um ponto chave no desenvolvimento de um novo método para determinar TAG- lipase. Por outro lado, Lima (2004) em experimentos com TAG- lipase de *B. megaterium* mostrou uma relação incomum da atividade de TAG- lipase com concentrações crescentes de enzima na reação, em seus ensaios não houve um aumento linear monomérico, e segundo reportado pela autora houve pelo menos duas faixas lineares, que foi justificado pelas características estruturais da lipase, concentração do substrato na atividade de lipase, mecanismo cinético da enzima e propriedades do substrato em meio aquoso.

O efeito da força iônica na atividade lipásica foi realizada com concentrações crescentes de NaCl (0, 0.25, 0.50, 0.75 e 1 M NaCl). Observamos que o aumento da força iônica do meio não foi capaz de inibir a atividade enzimática, se mantendo constante (Figura 9).

Figura- 9 Efeito da força iônica na atividade lipásica



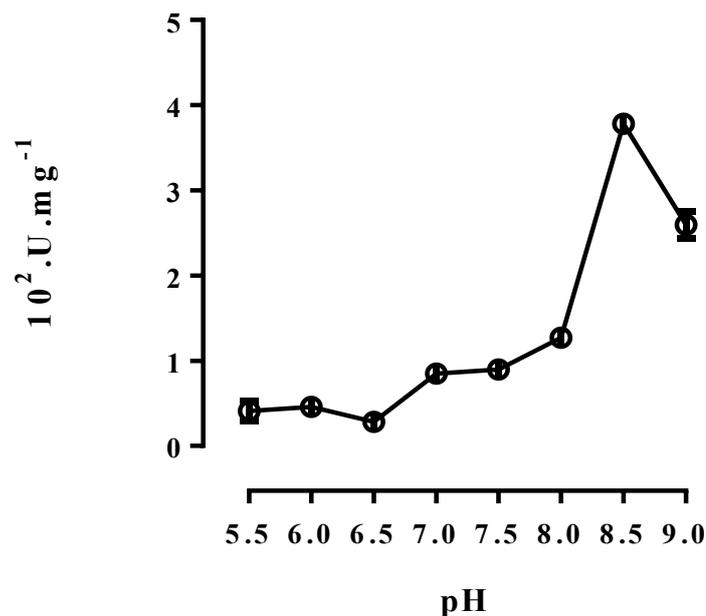
Fonte: AUTOR, 2015

Experimentos realizados com *R. prolixus* mostraram que concentrações crescentes de NaCl não foram capazes de inibir a atividade lipásica, assim como ocorreu em nossos experimentos, todavia em seus experimentos a partir 0,5 M apresentaram um aumento na atividade enzimática de TAG- lipase, diferente do nosso que se manteve constante durante todo o experimento (Grillo et al. 2007). Resultados obtidos por Hirayama e Chino (1987) com ensaios realizados com *L. migratória*, tiveram um comportamento semelhante onde a atividade mostrou também uma dependência da força eletrostática pela enzima no sitio ativo do substrato sem alteração na atividade enzimática. Já em experimentos realizados com a larva de *L. dispar* onde na ocasião testou-se vários íons metálicos frente a reação enzimática a fim de verificar a estabilidade da TAG-lipase nessas condições, foi observado que o NaCl não inibiu a atividade de TAG-lipase mostrando também uma dependência eletrostática de sua enzima

(MRDAKOVIC et al., 2008). Por outro lado, Heusden (1993), testou a capacidade inibitória do NaCl, em lipoproteína lipase de *M. sexta*, em seus experimentos a capacidade inibitória do NaCl não ocorreu em concentrações de até 0,5 M., todavia com o aumento da concentração no valor máximo houve uma ligeira inibição na atividade de TAG-lipase, de maneira semelhante ocorreu em experimentos com membrana do folículo de *M. sexta*, onde foi realizada atividade lipásica e a possível inibição com várias concentrações de NaCl, observou-se que em concentrações de até 0,5 M, não houve inibição enzimática, porém quando testada a estabilidade da lipase em concentrações de até 2 M de NaCl houve uma inibição parcial da lipase (ANTWERPEN et al. 1998).

Na análise do pH da TAG- lipase em nossos experimentos o pH variou de 5.5 até 9.0. Logo ficou explícito que o pH ótimo da TAG- lipase após a purificação parcial foi em torno de 8.5 (Figura 10).

Figura- 10 Efeito do pH sobre a atividade de TAG- lipase de *Sitophilus zeamais*.



Fonte: Autor, 2015

Mrdakovic et al. (2008) em seus experimentos reportaram que o pH alcalino foi o ideal para atividade da TAG-lipase por eles caracterizada, o pH ideal 8,2. Quando observada a faixa ácida de pH a estabilidade relativa da enzima é muito baixa. Experimentos com *R. palmarum*, evidenciaram em suas análises que o pH ideal para atividade enzimática TAG- lipase foi de 8,5

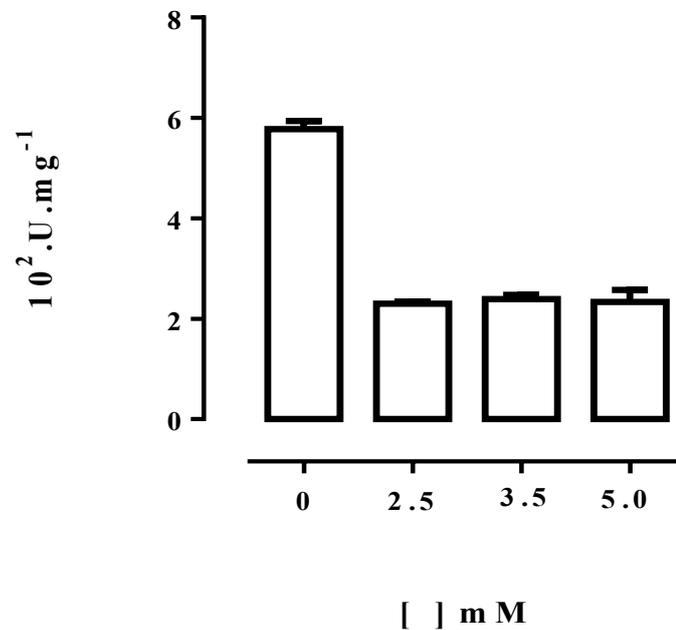
(SANTANA, 2014) corroborando com os resultados exposto neste trabalho, já em experimentos realizados por Antwerpen e Law (1992) com ovócitos de *M. sexta*, determinou-se que o pH ideal para atividade da lipoproteína lipase caracterizada está em torno de 9,0 - 9,5. Diante do exposto, a faixa ideal para uma atividade ótima da TAG- lipase é alcalina.

Por outro lado, a faixa de pH dependerá do tipo e função da TAG-lipase isolada. Outras publicações mostram variadas faixas de pH em diferentes tecidos, como os representados por Grillo et al. (2007), onde o pH ideal variou entre 7,0 - 7,5 com experimentos com intestino médio posterior de *R. prolixus*. Assim como ocorreu com experimentos de Arreguín-Espinosa et al. (2000) com *Cephaloleia presignis* (Coleóptera) onde a faixa de pH ideal ficou em pH neutro. Já experimentos realizados por Delkash-Roudsar et al. (2014) usando larvas no terceiro instar de *B. oleae* (Diptera), o pH encontrado foi na faixa de 4,0 - 6,0. Mostrando assim que a TAG-lipase pode ser ativa desde faixas de pH ligeiramente ácidas até faixas alcalinas.

Contudo, a variação de pH pode alterar a função enzimática, já que as elas podem possuir aminoácidos com grupos ionizáveis em seus sítios ativos, que podem se alterar durante as variações de pH. Além disso, outros aminoácidos que não pertencem ao sítio ativo também podem conter grupos ionizáveis e essas variações podem ocasionar mudanças na conformação da proteína e consequentemente na sua função (ARREGUÍN-ESPINOSA et al., 2000).

O efeito do PMSF, um inibidor de serino proteases, comumente utilizado em teste de estabilidade enzimática, sobre a atividade TAG- lipase foi avaliado em concentrações crescentes (0; 2.5; 3.5; 5.0 mM) da substância (Figura 11).

Figura- 11 Efeito do PMSF na atividade de TAG- lipase das amostras parcialmente purificadas do *Sitophilus zeamais*.



Fonte: Autor, 2015

Os resultados dos testes demonstraram diminuição da atividade enzimática com a adição de PMSF na mistura de reação. A incubação com 2,5mM de PMSF resultou em diminuição expressiva da atividade enzimática, cerca de 75%. Esses resultados sugerem que a TAG- lipase de *S. zeamais* possui, provavelmente, resíduo de serina em seu sítio ativo. O PMSF que é uma substância capaz de modificar as ligações de serina no sítio ativo, logo, foi capaz de inibir a TAG- lipase parcialmente purificada em nossos experimentos. A inibição quase que total da atividade enzimática por esse reagente pode retratar a presença de Serina ativa na enzima como descrito por Mrdakovic et al. (2008) em experimentos com intestino médio da larva de *Lymantria dispar* onde eles relatam que a inibição com PMSF foi quase que total com atividade relativa de apenas (9,10%) quando comparado com a atividade sem adição de inibidores, o autor sugere que pode haver uma serina no sítio ativo da enzima. Heusden (1993), em experimentos realizados com lipoproteína lipase da musculatura de voo de *M. sexta*, o PMSF, também inibiu fortemente a lipoproteína lipase em diferentes concentrações presente no músculo de voo do inseto, corroborando com os dados de nossos experimentos. Zibae (2012) realizou experimentos onde as larvas de *P. brassicae* eram alimentadas com folhas contendo vários inibidores enzimáticos, entre eles o PMSF. Em seus ensaios 10 mM de PMSF foi

acrescentado nas folhas que alimentaram o inseto, posteriormente o intestino foi analisado por zimografia, porém o PMSF não foi capaz de inibir a TAG- lipase presente no intestino da larva de *P. brassicae*, assim como também não foi capaz de inibir a amostra após a purificação incubada com PMSF nas concentrações de (1,0; 5,0 e 10,0 mM de PMSF).

6 CONCLUSÃO

A purificação parcial de TAG- lipase em coluna de interação hidrofobia fenil *sepharose* foi realizada com sucesso com TAG-lipase isolada na faixa de 50 KDa. A TAG-lipase isolada foi caracterizada neste trabalho e mostrou que com aumento da concentração de enzimas, há um aumento da atividade de TAG- lipase, isso ocorreu tanto com o extrato de enzimas como com as frações após a cromatografia, também ficou evidenciado que o PMSF levou a uma inibição da enzima, que é uma característica de enzimas que possuem uma serina no sítio ativo da tríade catalítica. O Na⁺ não foi capaz de inibir a enzima, logo acreditamos que há uma forte dependência eletrostática da enzima ligada ao substrato no sítio ativo, importante também foi a determinação da faixa de pH ideal da enzima que ficou na casa de 8,5. Esses dados são de fundamental importância para uma melhor compreensão sobre o metabolismo e a fisiologia do *S. zeamais* em estudos mais aprofundados posteriormente.

REFERÊNCIAS

ADANE, K.; MOORE D.; ARCHER, A. Preliminary Studies on the Use of *Beauveria pabassiana* to Control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the Laboratory. **J. stored Prod. Res.** v. 32, n. 2, p. 105-113, 1996.

ALARCÓN, F. J.; MARTÍNEZ, T. F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p. 265–274, 2002.

ALVES-BEZERRA, M.; DE PAULA, I. F.; MEDINA, J. M.; SILVA-OLIVEIRA, G.; MEDEIROS, J. S.; GÉADE, G.; GONDIM, K. C. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. xxx, p. 1-10, 2015.

ANTUNES, L. E. G.; DIONELLO, R. G. Bioecologia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae). 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/index.htm>. Acesso em: 05/08/2015.

ANTWERPEN, R; LAW, J. H. Lipophorin lipase from the yolk of *Manduca sexta* eggs: identification and partial characterization. **Arch Insect Biochem Physiol**. v. 20 n, 1, p. 1-12, 1992.

ANTWERPEN, R.; SALVADOR, K.; TOLMAN, K.; GENTRY C. Uptake of lipids by developing oocytes of the hawkmoth *Manduca sexta*. The possible role of lipoprotein lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 28, p. 399–408, 1998.

ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.31, p.1-7, 2001.

ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; ARREGUÍN, B.; GONZÁLEZ, C. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, chrysomelidae). **Biotechnol Appl Biochem.** v.31, n, 3, p. 239-44, 2001.

ARRESE, E. L.; HOWARD, A. D.; PATEL, R. T.; RIMOLDI, O. J.; SOULAGES J. L. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. 40, p. 91-99, 2010a.

ARRESE, E. L.; PATEL, R. T.; SOULAGES, J. L., The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A(1): identification and characterization. **J. Lipid Res.** v. 47, p. 2656-2667, 2006.

ARRESE, E. L., SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.** v. 55, p. 207- 225, 2010.

ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research.** v. 35, 1994.

ATELLA, G. C., MAJEROWICZ, D., GONDIM, K. C. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT-Em.** 2012.

AUERSWALD, L.; SIEGERT, K. J.; GADE, S.G. Activation of triacylglycerol lipase in the fat body of a beetle by adipokinetic hormone. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 35, n, 5, p. 461-470 2005.

BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falsiparum* ookinete invasion. **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 96, p. 244-254, 2007.

BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. **Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes.** Progress in Lipid Research. v.24, 1985, p.19-67.

BEZERRA, M. A., DE PAULA I. F., MEDINA J. M., SILVA-OLIVEIRA G., MEDEIROS J. S., GEADE, G., GONDIM, K. C. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. xxx, p. 1e10, 2015.

BLACKISTON, D. J.; CASEY E. S., WEISS, M. R. Retention of Memory through Metamorphosis: Can a Moth Remember What It Learned As a Caterpillar? **PLOS ONE.** v. 3, n, 3, p. 1736, 2008.

BOUSQUET, Y. Beetles: An identification guide. **Minister of Supply and Services Canada.** ISBN 0-660-13266-4, 1990.

BRABCOVÁ, J., PRCHALOVÁ, D., DEMIANOVÁ, Z., BUČÁNKOVÁ, A., VOGEL, H., VALTEROVÁ, I., PICOVÁ, I., ZAREVÚCKA M. Characterization of Neutral Lipase BT-1 Isolated from the Labial Gland of *Bombus terrestris* Males. **PLOS ONE.** v. 8, p. 1-11, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v.72, p.248-254, 1976.

BRAVO-RUIZ, G., RUIZ-ROLDÁN, C., RONCERO M. I. G. Lipolytic system of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **MPMI.** v. 26, n. 9, p. 1054–1067, 2013.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat Metabolism in Insects. **Annual Review of Nutrition.** v.21, p.23–46, 2001.

CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** v. 30, p.1173-1180, 2000.

CAREY, M. C.; SMALL, D. M.; BLISS, C. M. Lipid digestion and absorption. **Annu Physiol.** v.45, p. 651-77, 1983.

CARLI, M., Análise do desenvolvimento de infestações de *sitophilus spp.* em milho orgânico embalado em atmosfera modificada (AM) **dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2007.

CHINO, H., DOWNER, R.G.H., WYATT, G.R., GILBERT, L.I. Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. **Insect Biochem.** v.11, p. 491, 1981.

CHINO, H.; GILBERT, L. I. The uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. 1, p. 337-347, 1971.

CHINO, H., MURAKAMI, S., HARASHIMA, K. Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph isolation, purification and properties. **Biochimica et biophysica acta (bba) - lipids and lipid metabolism.** v.176, P. 1 26, 1969.

CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. **Oxford: Pergamon Press.** v.10, p. 115–135, 1985.

CHRISTELLER, J. T.; AMARA, S.; CARRIÈRE, F. Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets. **Journal of Insect Physiology.** v.57, p.1232-1239, 2001.

CHRISTIE W. W. Plasma lipoproteins: composition, structure and biochemistry. Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), **Scotland Last updated: lipid library.aocs.org March 6th, 2014.**

DELKASH-ROUDSARI, S; ZIBAE, A; ABBACIMOZHDEHI, MR. Determination of lipase activity in the larval midgut of *Bacterocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). **ISJ.** v. 11, p. 66-72, 2014.

DELKASH-ROUDSARI, S., ZIBAE, A., ABBACIMOZHDEHI M. R. Digestive proteolytic activity in larvae and adults of *Bacterocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology.** v.17, p. 483–491, 2014.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. **Adv. Protein Chem.** v.45, p. 1–52, 1994.

DE SOUSA, G., H. CONTE. Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae). **Micron** v.51, p. 1-8, 2013.

DIAZ, P., PRIM, N., PASTOR, F.I.J. Direct fluorescence-based lipase activity. **assay. Biotechniques**, v. 27, p. 696-700, 1999.

ELMER, A. C. The Role of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*, as a Vector of Red Ring Disease of Coconuts. Results of Preliminary Investigations **journal of economic entomology**. v. 56, n, 3, 1962.

FANCELLI, M. Pragas e seu controle. **EMBRAPA mandioca e fruticultura tropical**. Cruz das almas- BA, c, XI, p. 195- 208, 2004.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., SEGURA, R. L., FERNÁNDEZ LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., PALOMO J. M. Purification of Different Lipases from *Aspergillus niger* by Using a Highly Selective Adsorption on Hydrophobic Supports. **Biotechnology and bioengineering**. v. 92, n, 6, p. 20, 2005.

FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**. v.18, p.211–214, 1988.

FILIETAZ, C. F. T. Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases. **Dissertação (mestrado em ciências biomédicas)** – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

GALLO, D.; NAKANO O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINE, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Editora FEALQ. v. 10, 2002.

GEERING, K.; FREYVOGEL, T. A. Lipase activity and stimulation mechanism of esterase in midgut of female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**. v. 21, p. 1251-1256, 1975.

GILBERT, L. I., CHINO, H. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**. v. 15, 1974.

GILBY, A. R. Lipids and their metabolism in insects. **Annual Review of Entomology**. v.10, p. 141, 1965.

GONZÁLEZ, M. S., RIMOLDI, O. J., BRENNER, R. R. Studies on very-high-density lipoprotein of *Triatoma infestans* hemolymph in relation to its function as free fatty acid carrier. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 110b, n, 4, p. 767-775, 1995.

GRILLO, L. A. M. Metabolismo de lipídios no intestino do inseto *Rhodnius prolixus*. **Tese (Doutorado em Química Biológica)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.37, p.579–588, 2007.

GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. The insects: An outline of entomology. 3ª edição, Ed. **Blackwell publishing Ltd. Oxford** 2005.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.64, p. 763 781, 2004.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**. v. 55, p. 593- 608, 2010.

HALSTEAD, D.G.H. Keys for the identification of beetles associated with stored products. i- introduction and key to families. **Pergamon Journals Ltd.** v.22, n, 4, p. 163-203, 1986.

HAUNERLAND, N. H., BOWERS, W.S. Lipoproteins in the hemolymph of the tarantula, EURYPELMA CALIFORNICUM. **Department of Entomology**, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA 1986.

HIDE, W. A.; CHAN, L.; LI, W. H. Structure and evolution of the lipase superfamily. **Journal of Lipid Research**. v.33, p.167-178 1992.

HIRAYAMA, Y; CHINO, H. A new method for determining lipase activity in locust fat body. **Insect Biochem**. v. 17, n, 1, p. 85-88, 1987.

HIRAYAMA, Y; CHINO, H. Lipid transfer particle in locust haemolymph, purification and characterization. **J. Lipid. Res**. v. 31, p. 793-799, 1990.

HOFFMAN, A. G. D., DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta Americana*. **Lipids**. v. 14, p. 893-899, 1979.

HOLMQUIST, M. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: structures, functions and Mechanisms. **Curr. Protein Peptide Science** v.1, p. 209–235, 2000.

HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.39, p.547–567, 2009.

JOHNSON, I. E. C.; BRACO, J. T.; WHITMILL, M. A. Connecting nutrient sensing and the endocrine control of metabolic allocation in insects. **Current Opinion in Insect Science**. v.1 p. 66–72, 2014.

KAWOOYA, J. K., LAW, J. H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. **J. Biol. Chem**. v.263, p. 8748-8753, 1988.

KEDIA, A., PRAKASH, B., MISHRA, P. K., DWIVEDY, A. K., DUBEY, N. K. Biological activities of Cuminum cyminum seed oil and its major components against *Callosobruchus chinensis* and *Sitophilus oryzae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.18, p. 383–388, 2015.

KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications. Curr. Opin. Biotechnol.** v.13, p. 345–351, 2002.

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

LECATO, G. L.; FLAHERTY, B. R. Description of eggs of selected species of stored-product insects. **Journal of the Kansas Entomological Society.** v. 47, p. 308-317, 1974.

LIMA, U. A. Biotecnologia industrial. São Paulo, **Edgard Blucher Ltda.** v. 3, 2001.

LIMA, V. M. G. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. **Tese (doutorado em bioquímica) curso de pós-Graduação em Bioquímica.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LONGSTAFF, B.C., Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): A critical review. **Protection Ecology.** v. 2, p. 83-130, 1981.

LORINI, I. Aplicação do manejo integrado de pragas em grãos armazenados. Manual técnico, 1º ed., Passo Fundo, RS, **Embrapa – CNPT** p.12- 68, 2003.

LORINI, I., KRZYZANOWSKI, F. C., FRANÇA-NETO, J. B., HENNING, A. S. Principais Pragas e Métodos de Controle em Sementes durante o Armazenamento – Série sementes. **Circular técnica 73**, ISSN p. 1516-7860, 2010.

MACCABE, A. P., POLAINA J. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. ISBN 978-1-4020-5377-1 (e-book) **Published by Springer**, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. 2007.

MAJEROWICZ, D. Estudo da expressão gênica da Proteína Ligadora de Acil-Coenzima A 1 de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) e sua inibição por RNA de interferência. **Dissertação (Mestrado em Química Biológica)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MARTINS, T. Z. Controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) no Milho Pipoca (*Zea mays* L.) Tratado com Terra de Diatomácea. **Campo Digital**. v.1, n, 2, p.79-85, 2008.

HEUSDEN, M. C. V. Characterization and identification of a lipoprotein lipase from *Manduca sexta* flight muscle. **Insect Biochem. Molec. Biol.** v. 23, n, 7, p. 785-792, 1993.

MRDAKOVIC, M; LAZAREVC, J; PERIC-MATARUGA, V; ILIJIN, L; VLAHOVIC, M. Partial characterization of a lipase from *Gypsy Moth* (*Lymantria dispar* L.) Larval midgut. **Folia biologica (Kraków)**. v. 56, n, 1-2, p.103-110, 2008.

NOOMHORM, A.; SIRISOONTARALAK, P.; URAICHUEN, J., AHMAD I. Efficacy of atmospheric and pressurized carbon dioxide or air against *Sitophilus zeamais* Motchulsky (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) in milled rice. **Journal of Stored Products Research**. v. 54, p. 48-53. 2013.

ÖRSÇELİK, O., AKPINAR, M. A., GORGUN, S. Partial purification of total body lipase from *Gryllus campestris* L. (Orthoptera: Gryllidae). **Fen Bilimleri Dergisi**. v. 27 p. 1–10, 2007.

PAES, J. L.; FARONI, L. R. D .A.; DHINGRA, O. D.; CECON, P. R.; SILVA, T. A. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains. **Crop Protection**. v. 34, p. 56-58, 2012.

PEREIRA, P. R. V. S., SALVADORI, J. R. Identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados a produtos armazenados **EMBRAPA Trigo**, ISSN 1518-6512, dezembro 2006. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do75.pdf acesso: 04 de agosto de 2015.

PIMENTEL, M. A. G.; SANTOS, J. P.; LORINE, I. Sistema de Produção 1, Cultivo do milho. **EMBRAPA milho e sorgo**. ISSN 1679-012X Versão Eletrônica. 7^a edição Setembro 2011. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/colpragas.htm acesso: 04 de agosto de 2015.

PRIM, N., SÁNCHEZ, M., RUIZ, C., PASTOR, F.I. J., DIAZ, P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.22, p. 339–346, 2003.

RADCLIFFE, E.B., HUTCHISON, W.D., CANCELADO, R.E. Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies. **Cambridge University Press**, 2008.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. São Paulo: **Holos**, 2012.

RATHNAYAKE, S. S., MIRHEYDARI, M., SCHULTE, A., GILLAHAN, J. E., GENTIT, T., PHILLIPS, A. N., OKONKWO, R. K., BURGER, K. N. J., MANN, E. K., VAKNIN, D., BU, W., AGRA-KOOIJMAN, D. M., KOOIJMAN, E. E. Insertion of apoLp-III into a lipid monolayer is more favorable for saturated, more ordered, acyl-chains. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1838, p. 482–492, 2014.

RIBEIRO, B.M., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, E.E., SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. v.39, p.21–31, 2003.

RIVERA-PÉREZ, C., DEL TORO, M.L.A.N., GARCÍA-CARREÑO, F. purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparitive Biochemistry and physiology, Part B**. v. 158 p. 99-105, 2011.

RUBIO, G. J. D.; BUSTILLO, P. A. E.; VALLEJO, E. L. F.; ACUÑA, Z. J. R.; BENAVIDES M. P. Alimentary Canal and Reproductive Tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). **Neotropical Entomology**. v.37, p. 143-151, 2008.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors. In: MARCUS, A. (Ed.). **Biochemistry of Plants. Academic Press**. v.16, p.351-370, 1981.

RYAN, R. O., PRASAD, S. V., HENRIKSEN E. J., WELLS M. A., LAW J. H. Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*. Evidence for a lipid transfer factor in the hemolymph. **J. biol. Chem**. v.261, p. 563-568, 1986.

SANTANA C.C. Fisiologia do inseto *Rhynchophorus Palmarum*: Avaliação das reservas energéticas e caracterização da atividade TAG-lipase **dissertação (mestrado ciências farmacêuticas)** Universidade Federal de Alagoas, 2014.

SANTOS, J.P. Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho. **Circular técnica 84**. Embrapa Sete Lagoas, dezembro de 2006.

SANTOS, M. M. Utilização de mutagênese aleatória para obtenção da lipase de *burkholderia cepacia* com variação nas propriedades catalíticas. **Dissertação (mestrado em ciências-Bioquímica)**, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SCOPE, R. K. Enzyme Activity and Assays. Encyclopedia of life sciences. **Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group**, 2002.

SCOTT, J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (Eds.), Pesticide Resistance in Arthropods. **Chapman & Hall**, p. 39–57, 1990.

SHARIFI, S., MILLS, R.B. Radiographic studies of *Sitophilus zeamais* Mots. In wheat kernels. **Journal of Stored Products Research**. v.7, p. 95-206, 1971.

SHEVCHENKO, A., SIMONS, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 11, p. 593–598, 2010.

SMITH, G. M., ROTHWELL, K., WOOD, S. L., YEAMAN, S. J., BOWNES, M. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Journal**. v. 304, p. 775-779, 1994.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. Digestão em insetos. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; SILVA-NETO, M. A. C.; VAZ-JUNIOR, I. S.(Eds.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: INCT-EM, p. 582, 2012.

SIVAKUMAR, C., CHANDRASEKARAN, S., VIJAYARAGHAVAN, C., SELVARAJ, S. Fumigant toxicity of essential oils against pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **J. Biopesticides**. p. 317–319, 2010

SMITH, G.M., ROTHWELL, K., WOOD, S.L., YEAMAN, S.J., BOWNES, M. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J.** v. 304, p. 775–779, 1994.

SOULAGES, J. L.; VAN ANTWERPEN, R.; WELLS, M. A. Role of diacylglycerol and apolipoprotein-III in regulation of the physicochemical properties of the lipoprotein surface: metabolic implications. **Biochemistry** v.35, n, 16, p. 5191-5198, 1996.

SOULAGES, J. L., WU. Z., FIRDAUS, S. J., MAHALINGAM, R., ARRESE, E. L. Monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases and the synthesis of neutral glycerides in *Manduca sexta* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.62, p. 194-210, 2015.

SORENSEN, J. G., ADDISON M. F., TERBLANCHE J. S. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection** v. 38, p. 87- 94, 2012.

STRYER, L., J. L. TYMOCZKO, J. L., BERG, J. M. Bioquímica. 7ª edição, **Guanabara koogan**, 2014.

SUAREZ, R. K.; DARVEAU, C. A.; WELCH, K.C.; O'BRIEN, D. M.; ROUBIK, D. W.; HOCHACHKA, P. W. Energy metabolism in orchid bee flight muscles: **carbohydrate fuels all**. **Journal of Experimental Biology**. v.208, p.3573–3579, 2005.

SULEIMAN, R.; WILLIAMS, D.; NISSEN, A.; BERN, C. J.; ROSENTRATER, K. A. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation? **Journal of Stored Products Research**. v. 60, p. 19-24, 2015.

TSUSHIDA, K., WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipoprotein in the delivery of dietary lipids to the fat body. **Insect Biochemistry**. v. 18, p. 263-268, 1998.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, M. J. & BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). *Biology of insect midgut*. Londres: **Chapman & Hall**. p. 293-320, 1996.

TZOMPA-SOSA, D. A., YI, L., VAN VALENBERG, H. J. F. Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction method **Food Research International**. v. 62, p. 1087–1094, 2014.

Villeneuve, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances** v.25 p. 515–536, 2007.

WEINTRAUB, H., TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 306, p. 31-41, 1973.

WELLS, M. A.; RYAN, R.; KAWOOYA, J. K.; LAW, J. H. The role of apolipoprotein III in in vivo lipoprotein interconversions in adult *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 4172-4176, 1987.

WOODCOCK, T. S.; BOYLE, E. E.; ROUGHLEY, R. E.; KEVAN, P. G.; LABBEE, R. N.; SMITH, A. B. T.; GOULET, H.; STEINKE, D.; ADAMOWICZ, S. J. The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: insights from DNA barcoding. **Biomed Central Ecology**. v. 13, p.1-15, 2013.

WU, Z.; SOULAGES, J. L.; JOSHI, B. D.; DANIEL, S. M.; HAGER, Z. J.; ARRESE, E. L. TGL mediated lipolysis in *Manduca sexta* fat body: Possible roles for lipoamide dehydrogenase (LipDH) and high-density lipoprotein (L). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 45, p. 58-68, 2014.

ZIEGLER, Z., ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, p.264–272, 2006.

ZIBAEE, A. A digestive lipase of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae): purification, characterization, and host plants effects. **Arch Insect Biochem Physiol.** v. 81, n, 1, p.1-19, 2012.