

EFEITO DA ADIÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEINASES (ÁCIDO IODOACÉTICO) SOBRE A ESTABILIDADE DE AMILASES DE *Acanthoscelides obtectus*

VARÉA-PEREIRA, G.²
SOARES, M. C.¹
MIYAGUI, D.T.²

VARÉA-PEREIRA, G.; SOARES, M. C.; MIYAGUI, D.T. Efeito da adição de inibidor de proteinases (ácido iodoacético) sobre a estabilidade de amilases de *Acanthoscelides obtectus*. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 45-48, jun. 1999/2000.

RESUMO: O estudo das características estruturais e cinéticas das amilases presentes no trato digestivo de larvas de insetos que afetam a produção agrícola de alimentos deve ser realizado em enzimas purificadas. No processo de purificação das amilases, os rendimentos tem sido prejudicados por fatores como a atividade de proteinases. Para estudar o efeito da adição de inibidores de proteinases sobre a estabilidade de amilases, larvas inteiras de *Acanthoscelides obtectus* foram trituradas em solução NaCl 0,85% contendo 3, 10, e 15 mM de ácido iodoacético. Os extratos obtidos foram ensaiados quanto a atividade proteinásica e amilásica durante 48 horas a 4°C. Os resultados mostraram que a adição de 3 mM de AIA reduziu em 50% a atividade de proteinases, sem alterar significativamente a atividade de amilases durante 24 horas. O emprego de concentrações de 10 e 15 mM de ácido iodoacético reduziram a atividade proteinásica em 70%, e diminuíram também a atividade de amilases em torno de 80 e 95%, respectivamente. Os resultados sugerem que, se tais condições forem consideradas, é possível obter maior recuperação da atividade em procedimentos de purificação de amilases de insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Amilase; proteinase; *Acanthoscelides obtectus*; inibidor de proteinase.

INTRODUÇÃO

A produção agrícola de leguminosas sofre sérios prejuízos devido à infestação das sementes por *Acanthoscelides obtectus* (Ordem: COLEOPTERA, Subordem: POLIPHAGA, Família: BRUCHIDAE). Conhecidos como "carunchos de feijão", estes insetos afetam a qualidade do produto destinado ao consumo direto e à semeadura, pois durante o ataque o embrião é destruído juntamente com o endosperma da semente (Gallo *et al.*, 1988).

A capacidade de infestação e o desenvolvimento dos insetos pode ser influenciada pelos nutrientes constituintes das sementes (Parra, 1991) e pela atividade de enzimas digestivas (Terra, 1988), como as amilases responsáveis pela liberação de energia para o trabalho celular.

Amilases de larvas de *A. obtectus* apresentaram menor atividade quando comparadas com outras espécies de insetos criados em cereais (Gutierrez *et al.*, 1990) e acentuada perda de atividade amilásica

em procedimentos de purificação por cromatografia em gel Sephadex G-100 (Miyagui, 1993) e complexação com glicogênio (Varéa-Pereira, 1999). Tais perdas de atividade amilásica podem estar relacionadas com a atividade de cisteíno-proteinases (Murdok *et al.*, 1988; Lemos *et al.*, 1990; Hines *et al.*, 1992) e/ou aspartato-proteinases (Silva e Xavier-Filho, 1991) também presentes em extratos de larvas de bruquídeos. Estes fatos tem dificultado a realização de estudos sobre as características estruturais e cinéticas das amilases, e a conseqüente elaboração de propostas para redução de sua atividade "in vivo", colaborando com o controle do desenvolvimento e infestação de insetos.

Desta forma, o presente trabalho teve o objetivo de estudar a influência da adição de diferentes concentrações do inibidor ácido iodoacético (AIA) sobre a atividade de proteinases, visando a manutenção da atividade durante o isolamento e armazenamento de amilases do trato digestivo de larvas de *A. obtectus*.

¹ Aluna do Curso de Especialização em Bioquímica Aplicada

² Docentes do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina/Pr, CEP 86051-990

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de larvas de *A. obtectus*

Larvas de *A. obtectus* foram criadas em câmara sem iluminação, à temperatura $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$, empregando-se 100 insetos de mesma geração para cada 20 gramas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). As larvas foram retiradas dos feijões através da separação e quebra dos cotilédones da semente.

Extração das enzimas

Foram extraídas enzimas de 800 larvas inteiras de *A. obtectus* divididas em quatro grupos através de trituração em solução de NaCl 0,85% contendo 3, 10 e 15 mM de ácido iodoacético – AIA (Fluka). O volume dos sobrenadantes obtidos da centrifugação a $3.530 \times g$ durante 15 minutos foram completados para 10 mL e armazenados a 4°C durante 48 horas. Um dos grupos de larvas foi triturado sem adição de AIA e considerado grupo padrão.

Determinação da atividade amilásica

A atividade das amilases de larvas de *A. obtectus* foi determinada conforme descrito por Bemfeld (1955) com modificações sugeridas por Miyagui (1993). Aliquotas de 50 mL de amostra adequadamente diluídas, foram adicionadas a 450 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,4 contendo 38 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 500 mL de solução de amido a 1% reduzido com borohidreto de sódio como substrato (Strumeyer, 1967), à temperatura de 37°C . Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e aquecida em banho-maria fervente por 10 minutos. Após completar o volume da reação para 5 ml, os açúcares redutores formados pela ação das amilases foram quantificados através da leitura da absorbância em 540 nm (espectrofotômetro Femto 482 UV/VIS) utilizando solução padrão de maltose 1 mg/mL. Os resultados foram expressos em Unidades de Amilase (AU). Uma AU foi definida como a quantidade de enzimas que produz 1 mg de maltose por mL de extrato por minuto nas condições da reação.

Determinação da atividade proteinásica

A atividade proteinásica foi determinada de acordo com Lemos *et al.* (1990), pelo emprego de azocaseína como substrato. A reação foi iniciada pela adição de aliquotas de 500 mL de extrato

enzimático a 500 mL de solução de azocaseína 5 mg/mL preparada em tampão acetato 100 mM pH 5,4 a 37°C por 45 minutos, e interrompida pela adição de 500 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e centrifugada a $1.100 \times g$ por 15 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se igual volume de KOH 5 N. A absorbância foi obtida em 428 nm empregando como branco uma reação na qual o TCA 10% foi adicionado ao meio antes da adição do substrato.

Determinação de proteínas

O teor de proteínas dos extratos enzimáticos foi determinado logo após a centrifugação pelo método descrito por Hartree (1972), utilizando solução padrão de albumina de soro bovino 1 mg/mL.

Efeito do AIA sobre a atividade das enzimas

O efeito da adição de 3, 10 e 15 mM de AIA sobre a estabilidade de enzimas de extratos de larvas de *A. obtectus* mantidos a 4°C , foi obtido através da determinação das atividades amilásica e proteinásica em diferentes tempos durante um período de 48 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de larvas de *A. obtectus*

As criações de *A. obtectus* forneceram grande número de larvas após 23 dias de desenvolvimento, demonstrando boa adaptação às condições experimentais como temperatura e umidade empregadas. Miyagui (1993) e Varéa-Pereira (1999) também obtiveram tempos de desenvolvimento de larvas de *A. obtectus* igual a 23 dias.

Durante a retirada das larvas dos cotilédones das sementes de feijão, observou-se variabilidade dos graus de infestação e maior preferência pelos grãos dispostos no fundo do recipiente de criação.

Determinação de proteínas

A adição de AIA não interferiu no teor de proteínas durante a obtenção dos extratos enzimáticos, cujos valores foram semelhantes entre si e iguais a 0,726, 0,782, 0,704 e 0,714 mg/mL, para o extrato padrão e para os extratos com 3, 10 e 15 mM de AIA, respectivamente.

Efeito do AIA sobre a atividade das enzimas

A Figura 1 mostra o efeito de diferentes concentrações de AIA sobre as atividades

proteínásica e amilásica de extratos de larvas de *A.obtectus* mantidos a 4°C durante 48 horas. A adição de 3, 10 e 15 mM de AIA reduziu significativamente a atividade de proteinases nos extratos de larvas de *A. obtectus* quando comparados com o extrato padrão obtido sem adição de inibidor (Figura 1A). As porcentagens de redução média foram estimadas em 50% para adição de 3 mM de AIA e 70% para adição de 10 e 15 mM de AIA. Estes resultados foram comparáveis aos obtidos por Silva & Xavier-Filho (1991), que obtiveram 58,2% de inibição de proteinases de larvas de *Callosobruchus maculatus* através da adição de 3 mM de ácido iodoacético. Tanto a atividade proteinásica remanescente apresentada pelos extratos contendo AIA, como a elevação desta atividade no extrato padrão verificada após 24 horas a 4°C, podem estar relacionadas com a ativação de diferentes espécies de endo e exoproteinases, pois,

segundo Silva & Xavier-Filho (1991), AIA inibiu caracteristicamente aspartato-proteinases de tratos digestivos de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. A Figura 1B mostra que os extratos padrão e com 3 mM de AIA apresentaram pequena variação da atividade amilásica até 24 horas. Entretanto, após este período, o extrato padrão sofreu acentuada redução da atividade amilásica, provavelmente relacionada com a elevação da atividade proteinásica verificada após este mesmo tempo (Figura 1A). Os extratos padrão e com 3mM de AIA apresentaram atividade amilásica semelhantes entre si demonstrando que nesta concentração, o inibidor não interferiu na atividade das amilases. Por outro lado, a adição de 10 mM e 15 mM de AIA interferiu significativamente sobre a atividade das amilases ocasionando uma redução média de 80% e 95% da atividade amilásica, respectivamente.

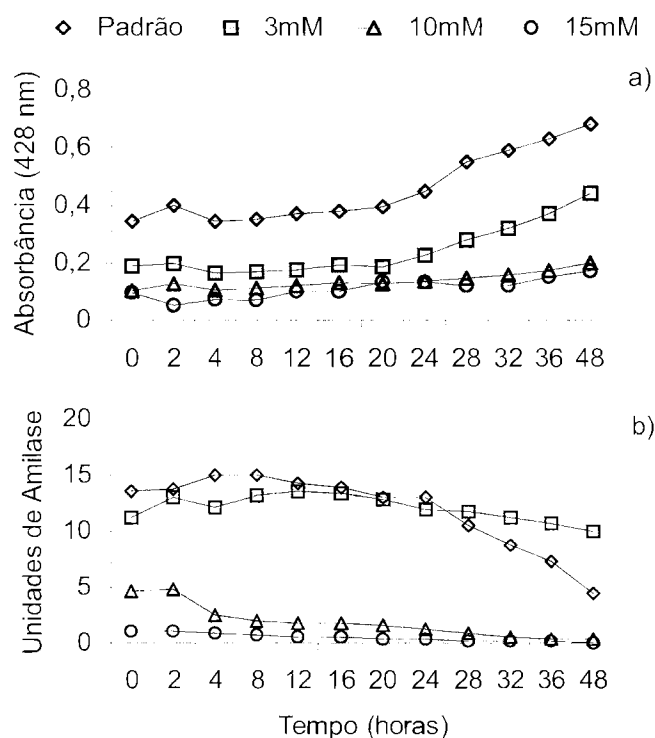


Figura 1 – Efeito do tempo e da adição de 3, 10 e 15 mM de ácido iodoacético sobre as atividades proteinásica (A) e amilásica (B) de extratos enzimáticos de larvas de *A. obtectus*. Extrato padrão sem adição de AIA.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a adição de 3 mM de AIA foi suficiente para inibir em torno de 50% da atividade de proteinases sem afetar significativamente a atividade amilásica,

promovendo desta forma, a proteção das amilases presentes nos extratos mantidos a 4°C durante 24 horas. Isto sugere que, nestas condições, métodos de purificação de amilases de trato digestivo de larvas de *A. obtectus* poderão ser realizados com boa recuperação da atividade amilásica.

ABSTRACT: Research on the amylases from the gut of the insect pest *Acanthoscelides obtectus* was studied using purified enzymes. The purification procedures resulted in low recoveries of enzyme because of the degradative action of insect-gut proteinases. To study the inhibition effects of proteinases on amylase stability, enzymes of whole larvae homogenates of *Acanthoscelides obtectus* were extracted with 0.85 % NaCl solution containing 3, 10 and 15 mM of iodoacetic acid. The extracts were assayed for proteinase and amylase activity against the substrates, azocasein and starch, respectively, in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5,4) containing 0,1 mM CaCl₂ and 38 mM NaCl over a 48 h-period at 4 °C. The result showed that iodoacetic acid at a concentration of 3 mM did not interfere with the amylase activity. However, the proteinase activity was reduced by some 50% at the same concentration during 24 h. When 10 and 15 mM iodoacetic acid were used, the proteinase activity decreased by 70 %, while the amylase activity was reduced by 80 and 95 %, respectively.

KEY WORDS: Amylase; proteinase; *Acanthoscelides obtectus*; proteinase inhibitor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNFELD, P. Amylase alpha and beta. *Meth. Enzimol.*, v.1, p. 149-154, 1955.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. *Manual de Entomologia Agrícola*. São Paulo: Agronômica "CERES", 1988. 649p.
- GUTIERREZ, C.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; RUIZ-TAPIADOR, M.; CASTAÑERA, P.; SALCEDO, G. α -Amylase activities of agricultural insect pests are specifically affected by different inhibitor preparations from wheat and barley endosperms. *Plant Science*, v.72, p.37-44, 1990.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, n. 48, p. 422-427, 1972.
- HINES, M. E.; OSUALA, C. I.; NIELSEN, S. S. Screening for cysteine proteinase inhibitor activity in legume seeds. *J. Sci. Food Agric.*, v. 59, p. 555-557, 1992.
- LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 56, p. 219-227, 1990.
- MIYAGUI, D. T. *Efeito dos inibidores de amilases do feijão e do alpiste sobre os bruquídeos*. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado) – FCF-USP. 89 p.
- MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E.; POMEROY, M. A. Effects of E-64, a cysteine proteinase inhibitor, on cowpea weevil growth, development, and fecundity. *Environmental Entomology*, v. 17, n. 3, p. 467-469, 1988.
- PARRA, I. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. p.9-66. In: PANIZZI, A. R. E.; PARRA, I. R. P. *Ecologia Nutricional de Insetos e Suas Aplicações no Manejo de Pragas*. [S.l.] Manole, 1991. 359p.
- SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (COLEOPTERA BRUCHIDAE). *Comp. Biochem. Physiol.* v. 99B, n. 3 p. 529-533, 1991.
- STRUMEYER, D. H. A modified starch for use in amylase assays. *Analytical Biochemistry*, v. 19, p. 61-71, 1967.
- TERRA, E. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v.21, p.675-734, 1988.
- VARÉA-PEREIRA, G. *Atividade de inibidores de α -amilases do triticale parcialmente purificados sobre amilases de *Acanthoscelides obtectus* e *Tenebrio molitor**. São Paulo, 1999. Tese (Doutorado) – FCF-USP. 147 fls.