



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação de atividades ATPásica e
Amilásica em larvas de *Pachymerus
nucleorum* (Fabricius, 1792) (Coleoptera:
Chrysomelidae: Bruchinae)**

Aluno: Rogério de Freitas Lacerda

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA - MG
Março – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação de atividades ATPásica e
Amilásica em larvas de *Pachymerus
nucleorum* (Fabricius, 1792) (Coleoptera:
Chrysomelidae: Bruchinae)**

Aluno: Rogério de Freitas Lacerda

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG
Março – 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Identificação de atividades ATPásica e Amilásica em larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

Rogério de Freitas Lacerda

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Cameron

Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales

Data da Defesa: 28 / 02 / 2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

Uberlândia, _____ / _____ / _____

“A leitura torna o homem completo; a conversação torna-o ágil; e o escrever dá-lhe precisão”

Francis Bacon

*A minha esposa Suzana Cássia
Cândida Vitorino*

*Aos meus pais, Joaquim Pedro
Ribeiro Lacerda e Maria Carmem de
Freitas Lacerda*

Aos meus irmãos, Ricardo e Thaís

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pelo seu apoio e orientação.

Aos amigos de laboratório: Hugo, Vinícius (vivi), Gabriel (docinho), Decivaldo (Vicentin – Parrudo) e Dona Maura.

A secretária e amiga do instituto: Marlene.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola por apoio, esclarecimento de dúvidas e por ceder gentilmente os kits de dosagem de atividade amilásica.

Aos professores do instituto, Amélia, Bonetti, Kerr, Luis Ricardo, Malcon, Maria Inês, Nilson e Veridiana.

A todos os amigos do instituto que compartilharam dessa trajetória de vida.

A todos aqueles, muito obrigado, por terem me ensinado, me confortado, me feito companhia, enfim participado da minha história de vida, cada com o seu papel e função. Apesar de não citado o nome de todos podem ter certeza que não são palavras que irão expressar a minha maior gratidão e satisfação de ter convivido com todos vocês . . .

ÍNDICE

1. RESUMO GERAL.....	12
2. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2.1. PALMEIRA.....	15
2.2. SUB-FAMÍLIA BRUCHINAE.....	18
2.3. AMILASE.....	22
2.4. ATPase.....	25
2.5. Objetivo Geral.....	28
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
4. CAPITULO I : Caracterização parcial de ATPase de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius, 1792)	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E METODOS.....	41
RESULTADOS.....	43
Precipitação de ATPase de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i>	43
Efeito de cátions sobre a Atividade ATPásica da Fração P4.....	46
DISCUSSÃO.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
5. CAPITULO II : Caracterização parcial de Amilase de intestino de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius, 1792)	58
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAL E METODOS.....	62
RESULTADOS.....	65

Perfil eletroforético da fração S1 e P1.....	65
Análise da atividade amilásica das frações S1 e P1.....	66
Efeito de Sacarose e EDTA na preparação da fração S1.....	69
Caracterização da atividade amilásica da fração S1	
Efeito de Temperatura.....	73
Efeito de Cálcio.....	74
Efeito de NaCl.....	75
DISCUSSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
6. CONCLUSÃO GERAL.....	83
7. ANEXO.....	85

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução Geral

Figura 1: Distribuição de babaçais no Brasil

Figura 2: Esquema do fruto de babaçu

Figura 3: Exemplar adulto da espécie *Pachymerus nucleorum*

Figura 4: Exemplar de larva da espécie *Pachymerus nucleorum*

Figura 5: Exemplar de fruto de babaçu (*Orbignya* sp.)

Figura 6: Estrutura de $(\alpha/\beta)_8$ -Barril

Figura 7: Três tipos de motores moleculares

2. Capítulo I

Tabela 1: Tabela de purificação parcial de ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 1: Perfil de polipeptídios das frações S1, S2, P2 S3, P3, S4 e P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 2: Atividade K-EDTA da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 3: Atividade ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 4: Efeito de cátions na atividade ATPásica de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 5: Efeito de cátions sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 6: Efeito da concentração de magnésio na atividade ATPásica de P4

Figura 7: Efeito de ion calcio sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 8: Efeito de ion cobalto sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 9: Especificidade de substrato da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 10: Efeito do vanadato de sódio sobre a atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*

3. Capítulo II

Figura 1: Perfil de polipeptídios das frações S1 e P1 de intestino de larva de *Pachymerus nucleorum*

Figura 2: Atividade amilásica das frações S1 e P1 de intestino de larva de *P. nucleorum*

Figura 3: Concentração de amido nas frações S1 e P1

Figura 4: Efeito da fração P1 sobre a atividade amilásica da fração S1

Figura 5: Efeito da fração P1 sobre a da atividade amilásica de amilase salivar

Figura 6: Atividade amilásica das frações obtidas com e sem sacarose e EDTA

Figura 7: Efeito de sacarose e EDTA sobre a atividade amilásica de S1

Figura 8: Estimulação da atividade amilásica das frações S1 com ou sem sacarose/EDTA após 48 horas

Figura 9: Concentração de cálcio nas frações S1 extraídas com ou sem sacarose/EDTA

Figura 10: Zimograma da fração S1 de intestino de larva de *P. nucleorum*

Figura 11: Efeito de temperatura sobre a atividade amilásica da fração S1

Figura 12: Efeito do íon cálcio sobre a atividade amilásica da fração S1

Figura 13: Efeito de cloreto de sódio sobre a da atividade amilásica da fração S1

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Albumina bovina sérica
CaM	Calmodulina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Etileno Glicol-bis (β -aminoetil éter) N, N, N',N'- ácido tetracético
Imidazol	1,3-Diaza-2,4-ciclopendatieno
kDa	Kilodaltons
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

- RESUMO GERAL -

Atividades enzimáticas do tipo ATPásica e Amilásica foram detectadas em larvas do coleóptero *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792), uma espécie de besouro incluída na sub-família Bruchinae, da família Chrysomelidae e praga do coco babaçu (*Orbinya spp*). A atividade ATPásica foi isolada por fracionamento com sulfato de amônio, de extratos do corpo gorduroso e atividade amilásica foi extraída por solubilidade em tampão de intestino das larvas. Essas atividades foram parcialmente caracterizadas por SDS-PAGE, zimograma, e por parâmetros cinéticos como temperatura, efeitos de íons metálicos, efeitos de ativadores. Os resultados mostraram uma atividade ATPásica mais ativa na presença de íons Mg^{2+} e Co^{2+} . Observou-se maior atividade na presença de ATP e leve inibição por vanadato. A atividade amilásica foi levemente ativada por sacarose, apresentou temperatura ótima a 50°C e foi ativada em torno de 20% por íons cálcio e por NaCl a concentrações 0,5 e 14 mM, respectivamente. As atividades caracterizadas podem ser importantes para determinar estratégias para o controle dessa praga do coco da palmeira do babaçu.

Palavras-Chave: *Pachimerus nucleorum*, larva, amilase, ATPase

- INTRODUÇÃO GERAL -

Palmeira do Babaçu

As palmeiras de babaçu (*Orbinya spp*) são plantas de ocorrência no Brasil, Bolívia, Colômbia, México e outras partes da América Latina. No Brasil é típica da região de transição entre o cerrado, a mata amazônica e o semi-árido nordestino, se concentrando no Maranhão em zonas de várzea e vales de rios (Figura 1) (May et al.,1985a; May et al.,1985b; Bezerra, 1999).



Figura 1: Distribuição de babaçais no Brasil. Fonte: Mendes A.M. e Carioca J.O.B, “Babaçais”, in Estudo integrado do uso potencial de biomassas para fins energéticos no Brasil, vol.3. Fortaleza.

Dessa planta podem-se obter industrialmente até 64 produtos que vão desde óleo, carvão, alimentos até confecção de redes, cestos e cordas (May et al.,1985a; Anderson et al.,1985; Bezerra, 1999). Contudo a maior parte utilizada consiste das amêndoas que corresponde apenas 6 % do peso do fruto, o restante composto de epicarpo (15 %), mesocarpo (20 %) e endocarpo (59 %) acabam sendo descartados ou utilizados em menor proporção (Figura 2). Estudos mostraram que existe um potencial muito grande de utilização desses compostos

(Pinheiro & Frazão, 1994). Na indústria de painéis à base de madeira, por exemplo, utilizam-se espécies reflorestáveis como *Pinus sp.*, *Eucalyptus sp.* e *Acácia mearnsii*, contudo tem-se mostrado que a mistura de partículas da casca do coco de babaçu (epicarpo) juntamente com o cimento Portland produzem painéis com qualidade (Rocha Almeida et al.,2002).

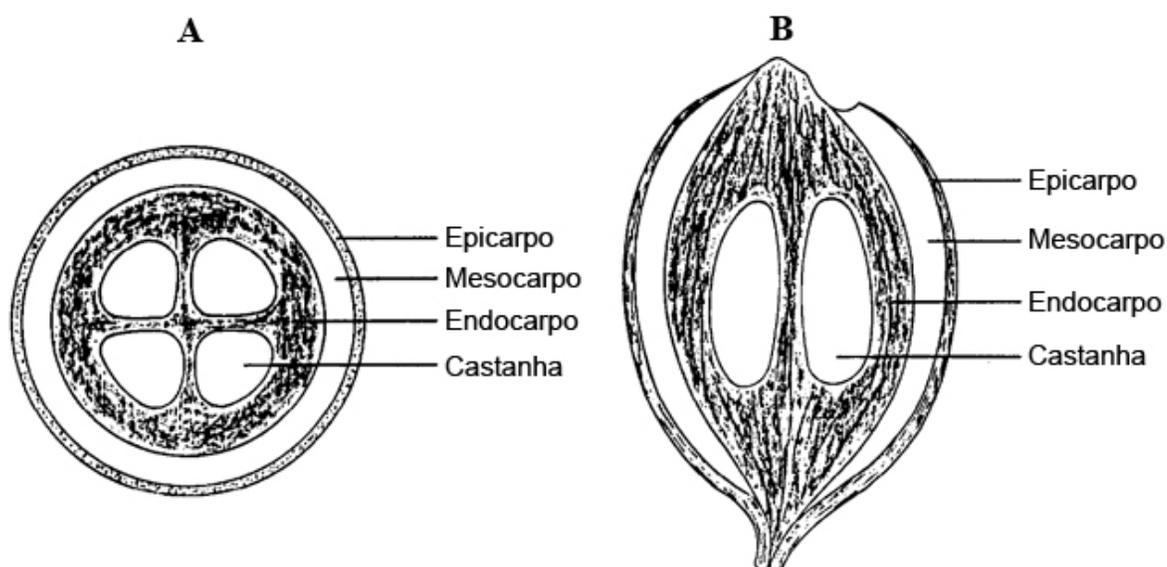


Figura 2: Esquema do fruto de babaçu. Estão representados o epicarpo, mesocarpo, endocarpo e castanhas, conforme indicado. **(A)** Secção transversal do fruto. **(B)** Secção longitudinal do fruto. Figura modificada de Emmerich & Luengo (1996).

Do endocarpo produz-se carvão com características similares ao de eucalipto com temperatura de carbonização de 600 ° C, baixo conteúdo volátil e de monóxido de carbono e outros subprodutos da carbonização, além de produzir 2 vezes mais energia com o mesmo volume de outros carvões. Outras vantagens do carvão de babaçu é sua baixa composição de enxofre (diminui a emissão de SO₂) e a baixa composição de fósforo. Dessa maneira, o carvão produzido do endocarpo de babaçu quando empregado na indústria produz aço de alta qualidade (Emmerich & Luengo, 1996).

O amido, o mais importante polissacarídeo de reserva energética vegetal, representa 50 a 68 % do mesocarpo. Um dos problemas enfrentados na sua utilização é o elevado índice de fibras, entre 10 e 30 % que podem dificultar o acesso de enzimas às moléculas de amido durante o processo de industrialização. Em contrapartida, processos industriais de gelatinização causam uma redução de 10 para 2 % de fibras. Sendo assim, a produção de etanol a partir de coco de babaçu da espécie *Orbignya phalerata* é tecnicamente e economicamente viável (Pinheiro & Frazão, 1995, Baruque Filho et al.,2000).

O mesocarpo de *Orbignya phalerata* contém 99 % de carboidratos e 1 % de proteína. A partir dos carboidratos obtém-se uma fração contendo glicose e outros monossacarídeos que possuem efeito sobre o sistema reticuloendotelial, aumentando a atividade fagocitária, sugerindo uma propriedade imunomodulatória. Esta fração também inibe o aumento na permeabilidade vascular que é o primeiro estágio da reação antiinflamatória (Silva & Parente, 2001). Outras plantas desse gênero também apresentam, aparentemente, propriedades médicas. Extratos alcoólicos de *O. phalerata*, por exemplo, possivelmente podem inibir carcinoma de Ehrlich (Moraes et al 1997).

Os óleos extraídos das amêndoas são utilizados como uma fonte barata de carbono para uma alta produção de biosurfactantes extracelulares com atividade de emulsificação, componentes que exibem alta superfície ativa e atividades emulsificantes (domínios hidrofílicos e hidrofóbicos), a partir de *Cândida lipolytica*, (Vance-Harrop et al.,2003). Como fonte barata também para sistemas de fermentação “solid-state” (SSF). Esse tipo de fermentação utilizando *Penicillium restrictum* e palmeira da espécie *Orbynya oleifera* possibilitaram a produção de diferentes enzimas através de suplementação adequada, como as lípases que podem ser utilizadas na biodegradação de plásticos (Gombert et al.,1999).

Como marcador taxonômico tem-se um éter (Triterpene metil) que comumente extraído de gramíneas foi observado em espécies de *Orbignya phalerata*, *O. speciosa*, *O. cohune*, em porcentagem que ultrapassam os 50 %, com exceção da espécie *O. phalerata*, que apresenta apenas 34 % de Triterpene metil (García et al.,1995).

Insetos da Sub-Família Bruchinae

Bruchinae é uma sub-família de coleópteros incluída na família Chrysomelidae. Até recentemente esta sub-família era conhecida como família Bruchidae. Os insetos da sub-família Bruchinae são predadores de sementes de leguminosas (Carvalho et al 1968; Meik & Dobie, 1968), e outras espécies da família Chrysomelidae atacam copas de plantas tropicais como *Acácia farnesiana* (Janzen, 1971), *Erythrina abyssinica* (Ernst, 1993) e *Attalea phalerata* (Santos et al.,2003).

Os membros dessa família caracterizam-se por apresentarem um élitro encurtado deixando desprotegida a extremidade do abdome (pigídio). Seus corpos são ovais, cabeça livre, rostró curto e achatado e antenas com 11 segmentos (Gallo, 1988). O coleóptero *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792), um membro dessa família, é um inseto bastante comum em todo norte do Brasil. Mede de 12 a 15 mm de comprimento, por 5 a 7 mm de largura. Possuem coloração cinzenta, élitros estriados, coxas posteriores ovóides e denteadas, sendo um dos bruquídeos de maior tamanho conhecido (Figura 3). De cada 5 a 10 ovos colocados por fruto, apenas 1 ou 2 das larvas que eclodem conseguem entrar através dos canais de seiva ou hilo. A larva *P. nucleorum* (Figura 4) parasita as palmeiras babaçu (*Orbinya spp*) crescendo e desenvolvendo através da assimilação de óleo e proteínas da castanha (Forline, 2000). Após completo desenvolvimento, medindo 20 mm de comprimento, tecem um casulo (Figura 5). Depois de emergirem, os adultos permanecem no interior dos cocos por duas semanas saindo através da abertura de orifício de 5 mm de diâmetro na parte posterior à inserção do fruto. Como atacam a polpa dos frutos, acabam inutilizando-os para o comércio (Gallo, 1988).

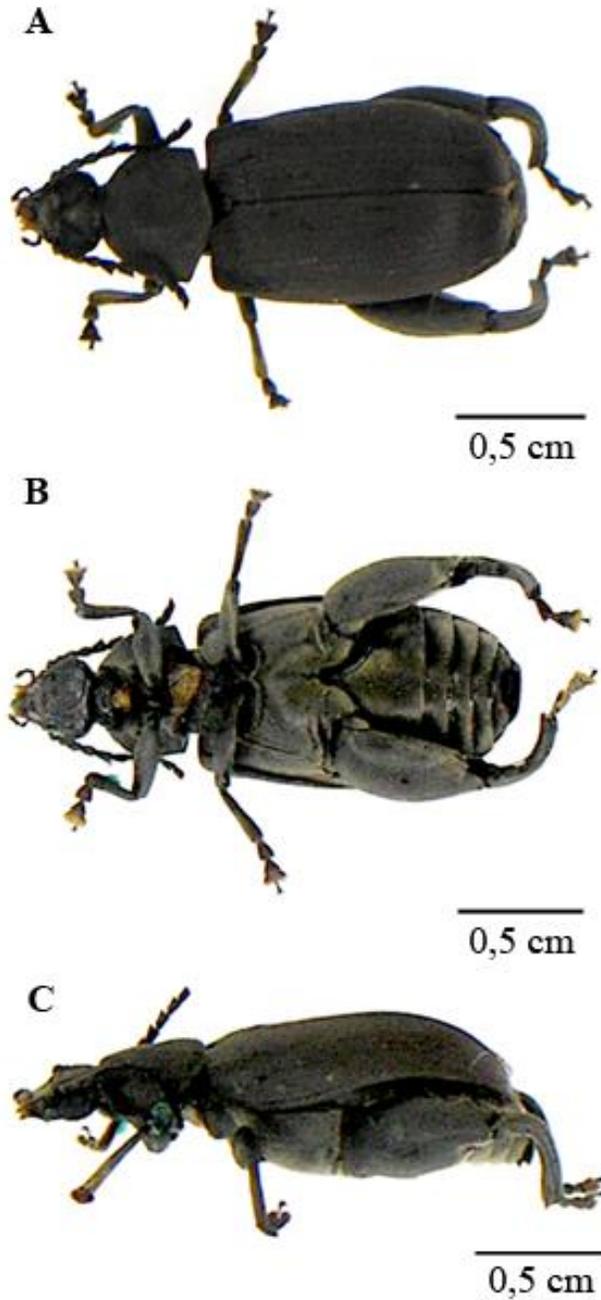


Figura 3: Exemplar adulto da espécie *Pachymerus nucleorum*. Bruquíneos de maior tamanho conhecido, com comprimento de 15 mm e 7 mm de largura, Possui coloração cinzenta, élitros estriados, coxas posteriores ovóides e denteadas. **(A)** Vista dorsal. **(B)** Vista ventral. **(C)** Vista lateral.

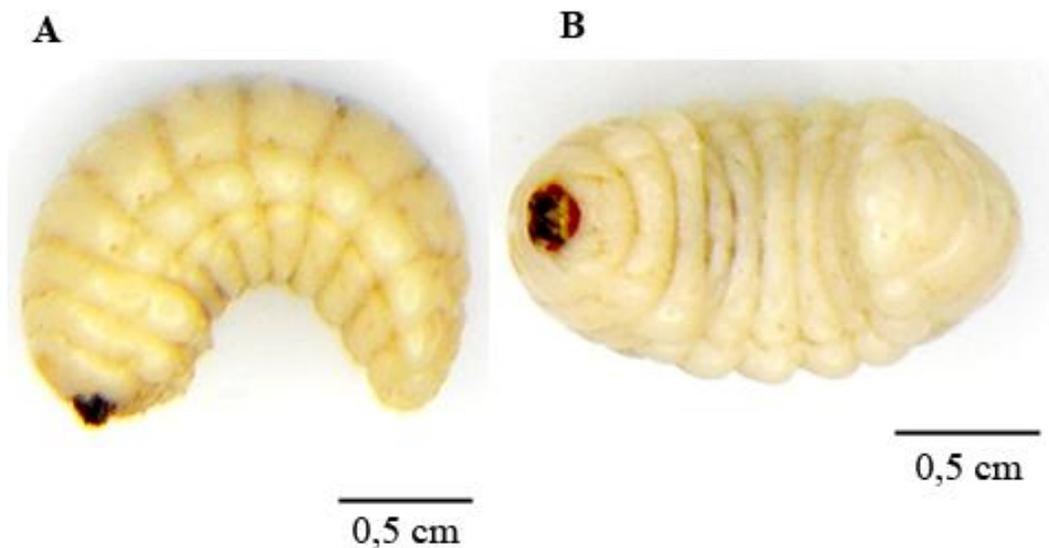


Figura 4: Exemplar de larva da espécie *Pachymerus nucleorum*. Larva utilizada neste trabalho. (A) Vista lateral. (B) Vista ventral.

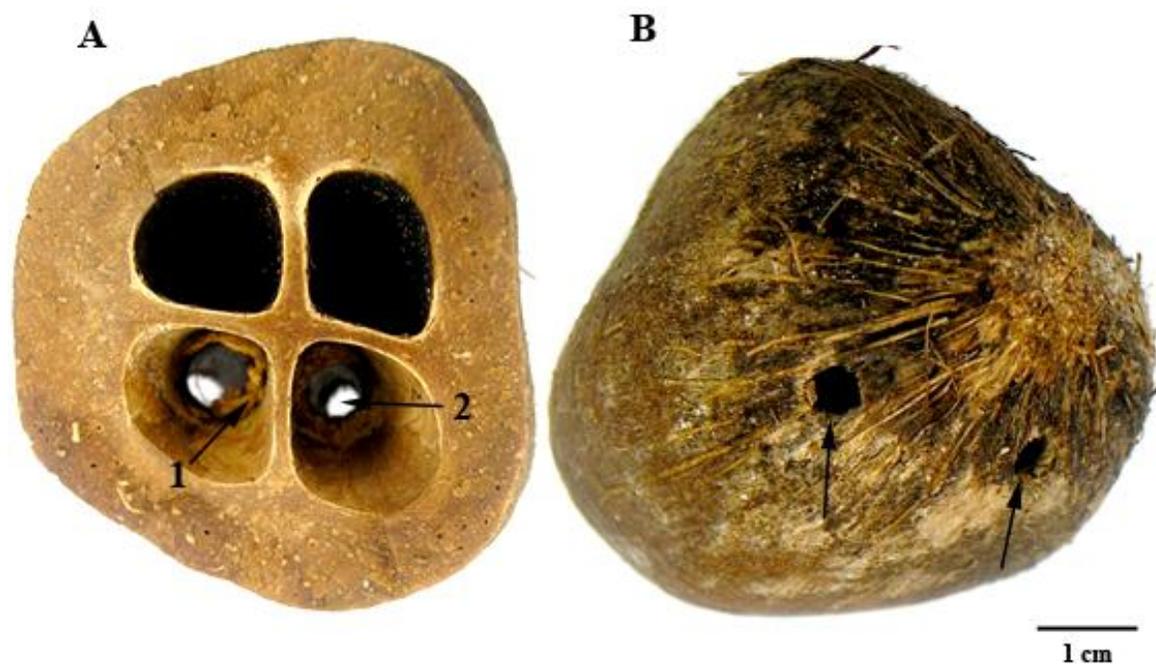


Figura 5: Exemplar de fruto de babaçu (*Orbignya* sp.). O fruto foi seccionado e as castanhas não estão presentes. (A) Secção transversal. 1. Parte do casulo que a larva tece após se alimentar da castanha. 2. Orifício feito pelo besouro adulto para sair do fruto. (B) Vista da parte anterior do fruto, que se liga ao cacho. As setas indicam os orifícios feitos pelos besouros.

Devido à natureza das espécies atacadas por esse tipo de coleóptero, que possuem altos níveis de inibidores de serina proteinases, os bruquídeos desenvolveram habilidades especiais de ataque, como resistência a alcalóides tóxicos e aminoácidos livres, bem como a natureza de suas enzimas digestivas (Janzen, 1971; Jongsma & Bolter, 1997).

Os *Zabrotes subfasciatus*, outra espécie de bruquídeo, possuem pouca capacidade de dispersão atacando grãos armazenados. O sucesso da espécie *Z. subfasciatus* no ataque ao feijão comum também depende de fatores como temperatura, umidade, local de estocagem e competição com outros bruquídeos (Meik & Dobie, 1986). Proteinases encontradas em *Z. subfasciatus* possuem resistência à inibidores de tripsina e quimotripsina, sendo sensíveis a inibidores de cisteína proteinase como o E-64 (Lemos et al., 1990).

O controle desses bruquídeos normalmente é realizado através do uso de inseticidas tóxicos para animais e para o homem. Contudo tem se observado que certas plantas possuem resistências naturais a esse tipo de praga, mecanismos adquiridos durante a evolução. Arcabose, isoarcabose, ciclodextrina são exemplos de inibidores não protéicos de α -amilase encontrados em plantas. Devido a sua semelhança com o substrato dessa enzima, ligam ao sitio catalítico, inibindo a atividade amilásica (Franco et al., 2002). Inibidores protéicos estão presentes em cereais tais como trigo. Extrato de trigo (*Triticum aestivum*) possui polipeptídios em torno de 14 kDa que inibem amilases de alguns insetos como *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Franco et al., 2000; Franco et al., 2002).

A faseolamina, uma glicoproteína de 49 kDa encontrada em espécies de *Phaseolus vulgaris*, comumente é utilizada na inibição de amilases tanto de insetos como humanos. Essa proteína age reversivelmente, não possuindo ação quelante sobre cálcio (Marshall & Lauda, 1975). Outros gêneros da espécie *Phaseolus* também possuem componentes com natureza inibitória sobre a atividade amilásica de insetos. Frações extraídas de espécies de *Phaseolus acutifolius* apresentam polipeptídios de aproximadamente 14-18, 28, 35 e 40 kDa que inibiram amilases de *Callosobruchus chinensis*, *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

(Yamada et al., 2001). Algumas lectinas afetam significativamente a atividade amilásica de *Z. subfasciatus*, mas não apresentam qualquer efeito sobre a atividade amilásica de *Acanthoscelides obtectus* (Guzmán-Maldonado et al., 1995). Além de lectinas encontradas em *P. vulgaris*, uma lectina isolada de *Talisia esculenta*, espécie de Sapindaceae, causa a redução do peso e aumenta a mortalidade de larvas de *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* (Macedo et al., 2002)

Outro meio de resistência da planta é através do crescimento desordenado e fora de regiões meristemáticas, fenômeno neoplástico, impedindo a entrada da larva. Em vagem de ervilha da espécie *Pisum sativum* L., por exemplo, existe um gene *Np* (gene Neoplástico) que é induzido pela presença de ésteres liberados pela oviposição de fêmeas de *Bruchus pisorum* L. (Doss et al., 2000).

Amilases

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva energética vegetal e está presente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca, etc. A sua degradação tem sido amplamente estudada e caracterizada e é utilizada principalmente pelas indústrias alimentícias, de papel, têxtil, produtos químicos e controle biológico (Said & Pietro, 2004).

As amilases são enzimas que degradam o amido, hidrolisando suas ligações glicosídicas. Estas são classificadas em endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases dependendo do tipo de ligação clivada (Said & Pietro, 2004).

As α -amilases (EC 3.2.1.1), classificadas como endoamilase, são enzimas que hidrolisam as ligações α -1,4-glicosídicas do amido. Seu sítio catalítico é composto de 3 domínios (A, B e C). O domínio A possui os resíduos Asp, Glu e Asp que estão dispostos em uma estrutura de barril $(\beta/\alpha)_8$ ou barril TIM (triose isomerase) (Figura 6). Nas α -amilases de *Aspergillus oryzae* (Taka-amilases)

esses correspondem a Asp-206, Glu-230 e Asp-270. Os outros domínios (B e C) possuem também esses resíduos em regiões conservadas, e diferentemente do domínio A não estão diretamente envolvidos com a catálise do substrato (Janecek, 1997, MacGregor et al.,2001). Na interface do domínio A e B, região conservada na estrutura de α -amilases, Taka-amilases, *Bacillus amyloliquefaciens* e CGTases, existe a presença do íon cálcio, promovendo uma maior estabilidade e integridade do sítio ativo (Machius et al.,1995; Janecek, 1997).

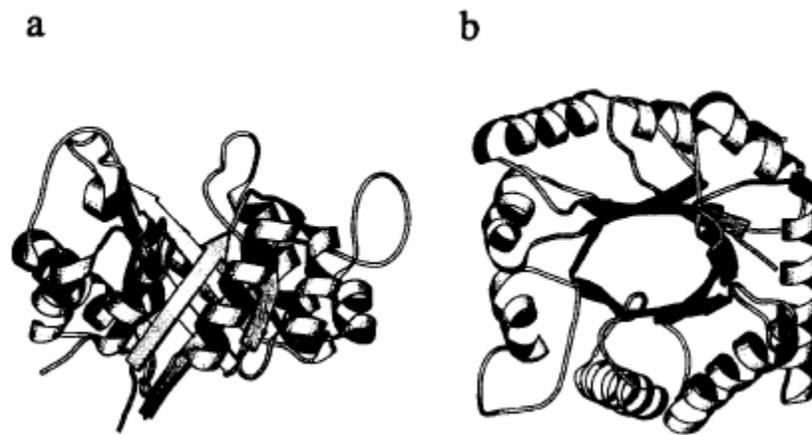


Figura 6: Estrutura de $(\alpha/\beta)_8$ -Barril. Domínio catalítico presente em estrutura de enzimas pertencentes à família das α -amilases. **(A)** Vista lateral. Extremidade C-terminal voltado para o todo da pagina. **(B)** Vista de baixo. Extremidade C-terminal saindo do plano do papel (Extraído de Janecek, 1997).

O papel do cálcio nas Taka-amilases está relacionado à reativação de enzimas reduzidas. Em α -amilases nativas de *Aspergillus oryzae* existem 4 pontes dissulfeto e um grupo sulfidril livre. Em algumas situações, as pontes dissulfeto são reduzidas e re-pareamento pode ocorrer de forma incorreto. Em concentrações de 5 mM de cálcio, um excesso de 5 vezes a concentração de EDTA, ocorre uma ótima renaturação, recuperando praticamente toda a atividade. Contudo em altas concentrações (100 mM), o cálcio pode agir de maneira inibitória, ligando ao

segundo sítio de ligação do cálcio presente nas Taka-amilases (Friedmann & Epstein, 1967; Janecek, 1997).

α -Amilases de *Bacillus amyloliquefaciens*, em presença de cálcio apresentam maior temperatura desnaturante. Em concentrações de 6 mM do cátion, ocorre um aumento de 4° C na temperatura de desnaturação, variando de 72 para 76 ° C (Saboury & Karbassi, 2000). Por outro lado, o cálcio não apresenta efeito sobre a atividade e estabilidade de α -amilases de *Bacillus sp* em temperaturas altas (Sajedi et al.,2005). Em uma amilase de 75 kDa de leveduras (*Cryptococcus flavus*), a presença de cálcio não produz efeito nem na atividade e nem na estabilidade da enzima (Wanderley et al.,2004).

As α -amilases hipertermofílicas de *Pyrococcus furiosus* não requerem íons metálicos e apresentam atividade e estabilidade em torno de 100 °C. Esta, diferentemente de algumas amilases bacterianas, de plantas e de muitas outras arqueobactérias, apresenta sítios ligantes de cálcio e zinco próximos do sítio ativo, na interface do domínio B e A. Zinco, em concentrações maiores que 3 mM, inibe mais de 90 % a atividade dessa enzima, não sendo afetada pelo cálcio (Linden et al.,2003).

Diferentemente, as α -amilases de *Bacillus sp* (AmyK38) adaptadas às condições alcalinas e resistentes a reagentes oxidantes, não ligam cálcio e dessa forma não são inibidas por reagentes quelantes. Ao contrário, no sítio 1, região altamente conservada e ligante de cálcio, existe a presença de sódio (Na⁺), atuando da mesma forma na manutenção da estrutura funcional da molécula de AmyK38 (Nonaka et al.,2003).

Em *Callosobruchus maculatus*, isoformas de α -amilase com 56, 45, e 35 kDa apresentaram perfis de inativação diferentes em relação à temperatura. A amilase de 35 kDa mostrou maior sensibilidade ao calor, enquanto que a de 56 kDa apresentou maior termostabilidade, mas todas foram completamente inativadas a 65 °C por um período menor que 10 minutos (Silva, 1999). Dessas, nenhuma foi inibida pelo inibidor de α -amilase (α AI-1), extraído de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), mas foram inibidas por inibidores extraídos de trigo (Campos et al.,1989).

Amilases isoladas de *Zabrotes subfasciatus* foram sensíveis ao calor, sendo levemente inibidas após 20 minutos a 60 °C, mas a atividade foi reestabelecida após a adição de NaCl 20 mM ou CaCl₂ 1,0 mM (Lemos et al.,1990). Em 1999, Silva e colaboradores identificaram 3 isoformas de α -amilase (95, 85 e 65 kDa) em *Z. subfasciatus*. A isoforma com 85 kDa possui sensibilidade ao calor, sendo completamente inativada após 30 minutos de incubação a 65 °C, enquanto que a de 65 kDa se mostrou mais termoestável, permanecendo ativa depois de 2 horas. A isoforma 95 kDa mostrou termoestabilidade intermediária inativando-se entre 90 a 120 minutos.

ATPases

As ATPases hidrolisam o ATP em ADP e fosfato inorgânico utilizando a energia liberada em diferentes processos celulares como a contração muscular, o transporte de íons através de membranas, o batimento de cílios e flagelos e o próprio movimento das vesículas celulares (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996; VALE & GOLDSTEIN, 1990; SCHLIWA & WOEHLKE, 2003). Algumas ATPases são proteínas integrais de membrana como Ca-ATPases e Na/K-ATPase, enquanto outras encontram-se no citoplasma, como as miosinas, dineínas e cinesinas participando de movimentos ao longo do citoesqueleto (MERMALL et al., 1998; HIROKAWA, 1998).

Essas últimas, denominados motores moleculares (Figura 7), realizam transporte ao longo de filamentos de F-actina no caso das miosinas e de microtubulos, formados por heterodímeros de α,β tubulina, no caso das dineínas e cinesinas. As “cargas transportadas” pelos motores moleculares incluem organelas membranosas, complexos de proteínas, de ácidos nucléicos e uma variedade de outras estruturas presentes no interior da célula (KARCHER et al., 2002).

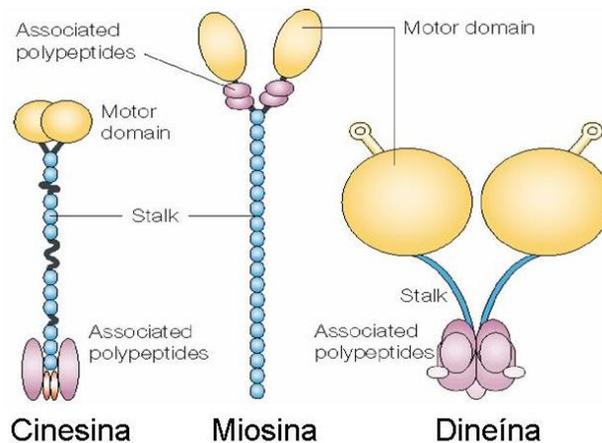


Figura 7: Três tipos de motores moleculares, evidenciando a similaridades das estruturas dos domínios. (Extraído KENT L. HILL)

Existem 10 classes de cinesinas, 2 de dineínas e 20 de miosinas diferentes em alguns aspectos. Todos possuem uma divisão estrutural em 2 domínios, o domínio motor, que hidrolisa ATP e liga ao citoesqueleto e o domínio cauda que é uma estrutura molecular que se liga à “carga transportada” e que pode desempenhar algum papel regulador no motor (KARCHER et al., 2002; SCHLIWA & WOEHLKE, 2003; Krendel & Moosoker, 2005).

As cinesinas são os motores mais abundantes em diferentes tipos de células sendo compostas por 144 domínios motores em 31 espécies. As cargas transportadas pelas cinesinas incluem vesículas, organelas, fuso mitótico e cromossomos (KIM & ENDOW, 2004). O sentido de movimento realizado pelas cinesinas pode ser tanto para a extremidade (-) como para a extremidade (+) dos microtúbulos (REDDY, V. S. & REDDY, A. S. N.; 2002).

As dineínas são divididas em 2 grupos, axonemal e citoplasmática, com movimentação para a extremidade (-) de microtúbulos (HIROKAWA, 1998). Esses motores moleculares estão envolvidos no transporte de vesículas do complexo de golgi para o retículo endoplasmático, auxílio ao fuso mitótico e assim potencialmente à citocinese, no caso das dineínas citoplasmáticas; e batimentos de cílios e flagelos em se tratando das dineínas axonemais (Gibbons & Rowe, 1965; Karki & Holzbaaur, 1999).

As miosinas são enzimas que se caracterizam por apresentarem três subdomínios funcionais: um domínio N-terminal globular (denominado cabeça, ou domínio motor), que pode ligar-se a actina, hidrolisar o ATP e translocar-se ao longo de filamentos de actina; um domínio pescoço (ou regulatório), que se constitui de uma seqüência ligante de calmodulina e/ou cadeias leves, formando os motivos IQ, esses podem variar de zero a seis nas diferentes classes de miosinas. Por último, uma região C-terminal (domínio cauda) disposto em α -hélice com capacidade de interagir com caudas de outras moléculas de miosinas para formar filamentos bipolares (HASSON & MOOSEKER, 1996; SELLERS, 2000).

A região C-terminal, que é específica para cada classe de miosina (MERMALL et al.,1998), pode atuar como “âncora” para o posicionamento do domínio cabeça na interação com actina. Essa região também parece ter função regulatória e/ou de direcionamento da miosina com sua carga (HASSON & MOSSEKER, 1996; MERMALL et al., 1998).

As miosinas estão relacionadas a diversas funções celulares tais como transporte de vesículas de melanossomas ou RNA no caso das miosina V, endo ou exocitose ou fagocitose se tratando das miosina I (HASSON & MOSSEKER, 1996; MERMALL et al., 1998).

Nos insetos há inúmeras funções celulares, responsáveis pela manutenção e desenvolvimento da vida que são desempenhadas por ATPases tanto integrais de membranas, como as solúveis (Cunha et al.,1988; Al-Fifi et al.,1998). Em intestinos de gafanhotos foram detectadas atividades Na/K-ATPásica que apresentaram pH ótimo de 7,5 e cujo pico de atividade ocorre em concentrações equimolares de Mg e ATP. Em *imunoblot*, essa ATPase apresentou subunidades similares a ATPase da família V-ATPases (Al-Fifi et al.,1998). *Manduca sexta*, larva de chifre do tabaco, possui um polipeptídeo de 40 kDa que através de *imunoblot* e expressões de cDNA, mostrou alta similaridade com subunidades de ATPase pertencentes à família V-ATPase (Merzendorfer et al.,1997). Em *Manduca sexta* também pode se encontrar membros das ATPases associadas com diversas atividades celulares (AAA Famílias) que possuem um ou dois domínios de ligação ao ATP. MsNSF (*Manduca sexta* proteína de fusão

sensível a N-etilmaleimida) é uma ATPase homo-oligomérica, classificada como tipo II, pois possui dois domínios de ligação e hidrólise do ATP, o primeiro domínio altamente relacionado à função de transporte, enquanto o domínio 2 é requerido para hexamerização de NSF, holoenzima funcional no transporte (Pullikuth & Gill, 1999). As ATPases ainda podem agir como ferramentas de controle biológico, pois existe inseticidas naturais que provocam inibições de ATPases específicas e, em consequência causa a morte do inseto. Compostos como o 1,5-difenil-2-penten-1-one (dp-B), primeiramente isolados de *Stellera chamaejasme* (planta típica da China), agem no sistema nervoso de gafanhotos inibindo sua atividade Ca-Mg-ATPásica em detrimento de outras ATPases (Ping et al.,2004).

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho será a identificação de atividades ATPásicas e amilásicas em larvas do besouro *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792), caracterizando atividades importantes para o metabolismo larval, com o propósito de determinar estratégias para o controle dessa praga do coco da palmeira de babaçu.

- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -

Al-Fifi, Z.I.A., Marshall, S.L., Hyde, D. Anstee, J.H., Boweler, K., 1998. Characterization of ATPases of apical membrane fractions from *Locusta migratoria* Malpighian tubules. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 201-211.

Anderson, A., May, P.H., 1985b. As palmeiras de muitas vidas. *Rev. Ciência Hoje.* 4, 58-63.

Baruque Filho, E.A., Baruque, M.G.A., Sant'Anna Jr., G.L., 2000. Babassu coconut starch liquefaction: na industrial scale approach to improve conversion yield. *Bioresour. Technol.* 75, 49-55.

Bezerra, J.A., 1999. Babaçu: as guerreiras do Mearin/mulheres de fibra. *Rev. Globo Rural.* 14, 38-45.

Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 51-57.

Cunha, V.M.N., De Souza, W., Noel, F., 1988. A Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -dependent ATPase activity in subcellular fraction from *Shistosoma mansoni*. *FEB.* 241, 65-68.

Doss, R.P., Oliver, J.E., Proebsting, W.M., Potter, S.W., Kuy, S., Clement, S.L., Williamson, R.T., Carney, J.R., DeVilbiss, E.D., 2000. Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 29, 6218-6223.

Emmerich, F.G., Luengo, C.A., 1996. Babassu charcoal: a sulfurless renewable thermo-reducing feedstock for steelmaking. *Biomass Bioenerg.* 10, 41-44.

Ernst, W.H.O., 1993. Food consumption, life history and determinants of host range in the bruchid beetle *Specularius impressithorax* (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 29, 53-62.

Forline, L.C., 2000. Using and sustaining natural resources: the Guajá Indians and the babassu palm (*Attalea speciosa*). www.nuffic.nl/ciran/ikdm/8-3/forline.html. Disponível em Dez/2005.

Franco, O. L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch Jr, C., Silva, C.P., Grossi de Sá, M.F. 2000. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. Eur. J. Biochem. 267, 2166-2173.

Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi de Sá, M.F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases structure, function and potential for crop protection. Eur. J. Biochem. 269, 397-412.

Friedmann, T., Epstein, C. J., 1967. The role of calcium in the reactivation of reduced Taka-amylase. J. Biol. Chem. 242, 5131-5140.

Gallo, D., 1988. Manual de entomologia agrícola. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 649 p.

García, S., Heinzen, H., Hubbuch, C., Martínez, R., De Vries, X., Moyna, P., 1995. Triterpene methyl ethers from palmae epicuticular waxes. Phytochemistry. 39, 1381-1382.

Gatehouse, A.M.R., Butler, K.J., Fenton, K.A., Gatehouse, J.A., 1985. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. Entomol. Exp. Appl. 39, 279-286.

Gibbons, I.R., Rowe, A., 1965. Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*. 149, 423-.

Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 1999. Lípase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem*. 35, 85-90.

Guzmán-Maldonado, S.H., Marín-Jarillo, A., Castellanos, J.Z., González de Mejía, E., Acosta-Gallegos, J.A., 1995. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Stored Prod. Res.* 32, 53-58.

HASSON, T., MOOSEKER, M. S., 1996. Vertebrate unconventional myosins. *J. Biol. Chem.* 271, 16431-434.

HIROKAWA, 1998 HIROKAWA, N., NODA, Y., OKADA, Y., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 60-73.

Janzen, D.H., 1971. Seed predation by animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2, 465-492.

Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.

KARCHER, R. L., DEACON, S. W., GELFAND, V., 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biology.* 12, 21-27.

Karki, S., Holzbaur, E.L.F., 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opin. Cell Biol.* 11, 45-53.

KIM, A.J., ENDOW, S.A., 2004. A Kinesin family tree. *Cell Science at a Glance*. 3681-3682.

KOWOSZYNSKI, M., WOJTCZAK, A., 1996. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, E. C. 3. 6. 1. 5): function and relationship to ATPases. *Biochem. Biophys. Acta*. 1310, 233-241.

Yamada, T., Hattori, K., Ishimoto, M. 2001. Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seeds of therapy bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochem.* 58, 59-66.

Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56, 219-227.

Linden, A., Mayans, O., Meyer-Klaucke, W., Antranikian, G., Wilmanns, M., 2003. Differential regulation of a hyperthermophilic α -amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc. *J. Biol. Chem.* 278, 9875-9884.

Marshall, J.J., Lauda, C.M. 1975. Purification and properties of Phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *The J. Biological Chem.* 25, 8030-8037.

Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochem. Biophys. Acta.* 1571, 83-88.

May, P.H., Anderson, A.B., Balick, M.J. Frazão, J.M.F., 1985a. Subsistence benefits from the babassu Palm (*Orbignya maritana*). *Econ. Bot.* 39, 113-129.

May, P.H., Anderson, A.B., Frazão, J.M.F., Balick, M.J., 1985. Babassu palm in the agroforestry systems in Brazil's Mid-North region. *Agroforest. Syst.* 3, 275-295.

Meik, J., Dobie, P., 1986. The ability of *Zabrotes subasciatus* to attack cowpeas. *Entomol. Exp. Appl.* 42, 151-158.

MERMALL, V., POST, P.L., MOOSEKER, M. S., 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science*, 279, 527-533.

Merzendorfer, H., Harvey, W.R., Wieczorek, H., 1997. Sense e antisense RNA for the membrane associated 40 kDa subunit M40 of the insect V-ATPase. *FEBS Letters*. 411, 239-244.

Moraes, M.O., Fonteles, M.C., Moraes, M.E.A., 1997. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. *Fitoterapia*. 68, 235-239.

Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Hagihara, H., Ozaki, K., Ito, S., Miki, K., 2003. Crystal structure of calcium-free α -Amylase from *Bacillus sp.* Strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. *J. Biol. Chem.* 278, 24818-24824.

Pinheiro & Frazão, 1994 Pinheiro, C.U.B., Frazão, J.M.F., 1995. Integral processing of babassu palm (*Orbignya phalerata*, Arecaceae) fruits: village level production in Maranhão, Brazil. *Econ. Botany*. 49, 31-39.

Pullikuth, A.K., Gill, S.S., 1999. Identification of a *Manduca sexta* NSF ortholog, a member of the AAA family of ATPases. *Gene*. 240, 343-354.

REDDY, V., REDDY, A. S. N., 2002. The calmodulin-binding domain from a plant kinesin functions as a modular domain in conferring Ca^{2+} -calmodulin regulation to animal plus-and minus-end kinesins. *J. Biol. Chem.* 277, 48058-48065.

Rocha Almeida, R., Del Menezzi, C.H.S., Teixeira, D.E., 2002. Utilization of the coconut shell of babaçu (*Orbignya sp.*) to produce cement-bonded particleboard. *Bioresour. Technol.* 85, 159-163.

Saboury, A.A., Karbassi, F., 2000. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylase. *Thermochim. Acta.* 362, 121-129.

Said, S., Pietro, R.C.L.R. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Legis Summa. 412p.

Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F., 2005. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp.* KR-8104. *Enzyme Microbial Technol.* 36, 666-671.

Santos, G.B., Marques, M.I., Adis, J., de Musis, C.R., 2003. Artrópodos associados à copa de *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), na região do Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Rev. Brasileira de Entomologia.* 47, 211-224.

SCHLIWA, M., WOEHLKE, G., 2003. Molecular motors. *Nature.* 422, 759-765.

SELLERS, R. J., 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta,* 1496, 03-22.

Silva, B.P., Parente, J.P., 2001. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia.* 72, 887-893.

Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., de Sá, M.F.G., Lopes, A.R., Pontes, E.G., 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 355-366.

Teixeira, M.A., 2005. Heat and power demands in babassu palm oil extraction industry in Brazil. *Energ. Convers. Manage.* 46, 2068-2074.

Tuda, M., Morimoto, K., 2004. A new species *Megabruchidius sophorae* (Coleoptera, Bruchidae), feeding on seeds of *Styphonolobium* (Fabaceae) new to Bruchidae. *Zool. Science.* 21, 105-110.

VALE, R. D., GOLDSTEIN, LSB., 1990. One motor, many tails: an expanding repertoire of force-generating enzymes. *Cell.* 60, 883-885.

Vance-Harrop, M.H., De Gusmão, N.B., De Campos-Takaki, G.M., 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian. J. Microbiol.* 34, 120-123.

Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J., 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Letters.* 231, 165-169.

Ping, G., Yanping, L., Shigui, L., 2004. Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pest. Biochem. and Physiol.* 80, 157-162.

- CAPITULO I -

**Detecção e caracterização parcial de atividade ATPásica
no corpo gorduroso de larva de *Pachymerus nucleorum*
(Fabricius, 1792)**

Resumo

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) é uma espécie de coleóptero da sub-família Bruchinae, família Chrysomelidae, que possui como principal hospedeiro a palmeira babaçu (*Orbinya spp*). O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar atividade ATPásica em larvas de *P. nucleorum*. O aparelho digestivo das larvas de *P. nucleorum* foi retirado e o corpo gorduroso foi homogeneizado, imediatamente, em tampão imidazol 50 mM pH 7,5 contendo inibidores de protease (Aprotinina 0,2 µg/mL e Benzamidina 1 mM), sacarose 250 mM e EDTA 1 mM e centrifugado a 15000xg por 30 minutos a 4 °C. A fração S1 foi fracionada com sulfato de amônio a 20 % de saturação. A fração precipitada (P2) foi ressuspendida em tampão Imidazol pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e β-mercaptoetanol 0.2 mM e centrifugado. A fração P3 foi tratada com ATP 10 mM e MgCl₂ 5 mM, e centrifugada. A fração P4 apresentou atividades Mg-ATPásica e Co-ATPásica e os principais polipeptídios desta fração possuem Mr em torno de 180, 54, 43 e 17 kDa. Cálcio ou cálcio/calmodulina não estimularam a atividade Mg-ATPásica, e não foi detectado atividade K-EDTA-ATPásica. A atividade Mg-ATPásica não foi estimulada por outros cátions e foi levemente inibida por vanadato. A atividade Mg-GTPásica foi cerca de 50% da atividade Mg-ATPásica.

Palavras-Chave: Babaçu, Bruquídeo, *Pachymerus nucleorum*, atividade, ATPásica.

Abstract

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) is a beetle specie of the Bruchinae sub-family, family Chysomelidae, that principal host of this insect is a palm babassu (*Orbinya spp*). The objective of this work was identify and to characterize the ATPase activity in *P. Nucleorum* larvae. The *P. nucleorum* larvae guts were discartated and the greasy body was homogenized in 50 mM phosphate buffer, pH 7,5 containing protease inhibitor (0,2 ug/mL Aprotinine, 1 mM Benzamidine, 250 mM sucrose and 1 mM EDTA), after that the samples were centrifugated at 15000_xg for 30 minutes, 4 ° C. Amonium sulfate was added to the supernatant fraction (S1) and centrifugated at 45000_xg for 30 minutes, 4 ° C. The precipitated fraction (P2) was resuspended in Imidazol buffer, pH 8,0 containing 1 mM EDTA and 0,2 mM β-mercaptoetanol and centrifugated at 45000_xg for 30 minutes, 4 ° C. Final concentrations of 10 mM ATP and 5 mM MgCl₂ was added to the P3 fraction and centrifugated. The fraction P4 presented Mg-ATPase e Co-ATPase activity and main polipeptides with 180, 54, 43 and 17 kDa. The Mg-ATPase activity was not stimulated by calcium or calcium/calmoduline, and K-EDTA ATPase activity was absent. The Mg-ATPase was not stimulated by other cátions and was slightly inhibited by vanadate. The Mg-GTPase activity was about 50% of Mg-ATPase activity.

Keywords: Babassu, Bruchid, *Pachymerus nucleorum*, activity, ATPase.

Introdução

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) é uma espécie de besouro incluída na família Bruchidae, atual sub-família Bruchinae, da família Chrysomelidae. O principal hospedeiro das larvas de *P. nucleorum* é o coco da palmeira babaçu (*Orbinya spp*) planta típica da região de transição entre o cerrado, a mata amazônica e o semi-árido nordestino, se concentrando no Estado brasileiro do Maranhão. Região com temperaturas médias de 20 a 27 ° C e regime pluviométrico de 700 a 2100 mm anuais, concentrados (90 %) de Janeiro a Junho (May et al.,1985a).

Nos insetos existem inúmeras funções celulares, responsáveis pela manutenção e desenvolvimento da vida desempenhadas por enzimas como as ATPases (Cunha et al.,1988; Al-Fifi et al.,1998). Algumas ATPases são proteínas integrais de membrana como Ca-ATPases e Na/K-ATPase, enquanto outras são solúveis, como as miosinas, dineínas e cinesinas participando de movimentos ao longo do citoesqueleto (MERMALL et al., 1998; HIROKAWA, 1998).

ATPases integrais de membranas podem funcionar como bombas que promovem o transporte de íons contra gradientes de concentração, utilizando o ATP como fonte de energia. ATPases presentes em túbulos de Malpighi promovem a excreção nos insetos (Al-Fifi et al.,1998; O'Donnell et al.,2003). Em besouro *Tenebrio molitor*, a perda de água é reduzida pela formação de gradiente de K^+ , Na^+ , Cl^- envolvendo hábeis ATPases transportadoras de íons disposto na parte final dos túbulos de Malpighi (O'Donnell et al.,2003).

Túbulos de Malpighi de gafanhotos possuem uma ATPase que apresenta atividade ótima em pH 7,5 e em concentrações idênticas de Mg e ATP. Esta apresenta alta atividade Na/K-ATPásica e é insensível a azida e ortovanadato (Al-Fifi et al.,1998). *Manduca sexta*, larva de chifre do tabaco, possui um polipeptídeo que foi reconhecido por um anticorpo gerado contra subunidade de V-ATPase e mostrou uma alta homologia de seqüência com membros dessa família de V-ATPase (Merzendorfer et al.,1997).

Ainda em *Manduca sexta*, pode se encontrar membros das ATPases associadas com diversas atividades celulares (AAA Famílias ATPases) que possuem um ou dois domínios de ligação ao ATP. MsNSF (*Manduca sexta* proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida) apresenta dois domínios de ligação e hidrólise de ATP, o primeiro domínio relacionado diretamente à função de transporte, enquanto o domínio 2 regula esse transporte (Pullikuth & Gill, 1999).

As ATPases podem ser alvo de controle biológico, através de inibições de sua atividade por inseticidas naturais, levando conseqüentemente a morte do inseto. O 1,5-Difenil-2-penten-1one (dp-B), primeiramente isolados de *Stellera chamaejasme* (planta típica da China), age no sistema nervoso de inseto inibindo sua atividade Ca-Mg-ATPásica em detrimento de outras atividades ATPásicas (Ping et al.,2004). O objetivo desse trabalho foi estudar a atividade ATPásica identificada em larvas de *Pachymerus nucleorum*.

Material e Métodos

Reagentes

Os reagentes ATP, Trizma-Base, Imidazol, EDTA, EGTA, inibidores de proteases, β -Mercaptoetanol e DTT foram obtidos da SIGMA Co. USA,. Os demais reagentes usados foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

Preparação da Fração com Atividade ATPásica

Larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792) foram retiradas de cocos de babaçu (*Orbinya martiana*), lavadas e dissecadas com o auxílio de uma lupa. O aparelho digestivo foi retirado, homogeneizando imediatamente o corpo gorduroso em tampão de extração (Imidazol 50 mM, pH 7,5 contendo sacarose

250 mM, EDTA 1 mM, β -Mercaptoetanol 2 mM) na proporção de 3 g/mL. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 \times g durante 30 minutos a 4 °C. Ao sobrenadane S1 foi adicionado sulfato de amônio 20 % de saturação, centrifugando a 45.000 \times g durante 45 minutos a 4 °C. O precipitado P2 foi ressuspenso em tampão I (Imidazol 20 mM, pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e β -Mercaptoetanol 0,2 mM) em volume igual ao de S1, e centrifugado a 45.000 \times g durante 45 minutos a 4 °C. À fração precipitada P3 acrescentou-se ATP 10 mM e MgCl₂ 5 mM, centrifugando a 45.000 \times g durante 45 minutos a 4 °C.

Método de Dosagem de Proteína

A concentração protéica foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976), tendo como padrão soroalbumina bovina (BSA).

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético das frações protéicas foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema tampão descontínuo de Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973), utilizando gel gradiente 5-22 %. Como padrão utilizou-se padrão de peso molecular SDS-6H da SIGMA Co. USA.

Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de Heinonen e Lahti (1981). Como padrão utilizou ortofosfato inorgânico.

Estatística

Os testes estatísticos foram feitos a partir de 3 experimentos (n=3), analisados através do Teste *t-student*, com índice de significância de 5 % (P=0,05). Estão plotados as médias e os erros padrões.

Resultados

Precipitação de ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum*

A análise da Tabela I, mostrou que em P2 foi recuperado cerca de 38 % da atividade Mg-ATPásica total e a precipitação com sulfato de amônio eliminou cerca de 95 % das proteínas de S1. Dessa maneira, a atividade específica de 31,76 nmols de Pi/mg/min em S1 elevou-se para 241,21 nmols de Pi/mg/min em P2, correspondendo a um ganho de 7,6 vezes na atividade específica. Em relação a P2, a quantidade de proteína da fração precipitada P3 não se alterou mantendo seu rendimento de 5,2 %, contudo a atividade específica decaiu para 184,13 nmols de Pi/mg/min, um ganho de 5,8 vezes em relação à atividade da fração inicial S1. A atividade total na fração P2, em relação à atividade da fração S1, foi cerca de 2,5 vezes menor, com pouca alteração para a fração P3 que apresentou uma atividade total de 1060 nmols de Pi/min. Em relação a P3, a fração P4 não mostrou alteração na quantidade de proteína total, contudo o ganho de atividade específica foi de 34 vezes em relação a atividade de S1 e de 6 vezes em relação a P3.

Tabela ITabela de purificação parcial de ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum*.

Etapa	Proteína Total (mg)	Atividade Total (nmols P1/min)	Atividade Específica (nmols Pi/mg/min)	Recuperação	Rendimento
S1	118,716	3770,46	31,76	100	1,0
S2	105,150	1121,69	10,67	29,7	0,3
P2	5,987	1444,06	241,21	38,3	7,6
S3	0,469	2,17	4,63	0,1	0,1
P3	5,757	1059,99	184,13	28,1	5,8
S4	3,076	379,26	123,28	10,1	3,9
P4	1,489	1628,15	1093,58	43,2	34,4

10 µL das frações foram incubados a 37°C, por 15 minutos, em meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM,, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

Observa-se, através de SDS-PAGE, que a fração P2 apresentou polipeptídios com motilidade relativa de 180, 43 e 17 kDa, mais evidente. Contudo ainda existem polipeptídios de 202, 80-100 kDa em menor evidência. Após lavagem de P2, os polipeptídios 202, 180, 54, 43 e 17 kDa foram recuperados em P3 (Figura 1). Os polipeptídios de 202 e 17 kDa foram parcialmente solubilizados com o tratamento com ATP 10 mM e MgCl₂ 5 mM, enquanto os demais polipeptídios foram recuperados na fração P4. A presença de atividade ATPásica e de polipeptídio com mobilidade relativa similar à cadeia pesada de miosina II e V sugere que tal fração pode conter algum membro da família das miosinas. Estas apresentam atividade K-EDTA-ATPásica e algumas possui alta atividade Ca-ATPásica. Contudo a fração precipitada P4 não apresentou atividade K-EDTA-ATPásica (Figura 2) e sua atividade Ca-ATPásica foi 47 % mais baixa em comparação com a atividade Mg-ATPásica, praticamente não sendo alterada pela adição de calmodulina 1 mg/mL (Figura 3).

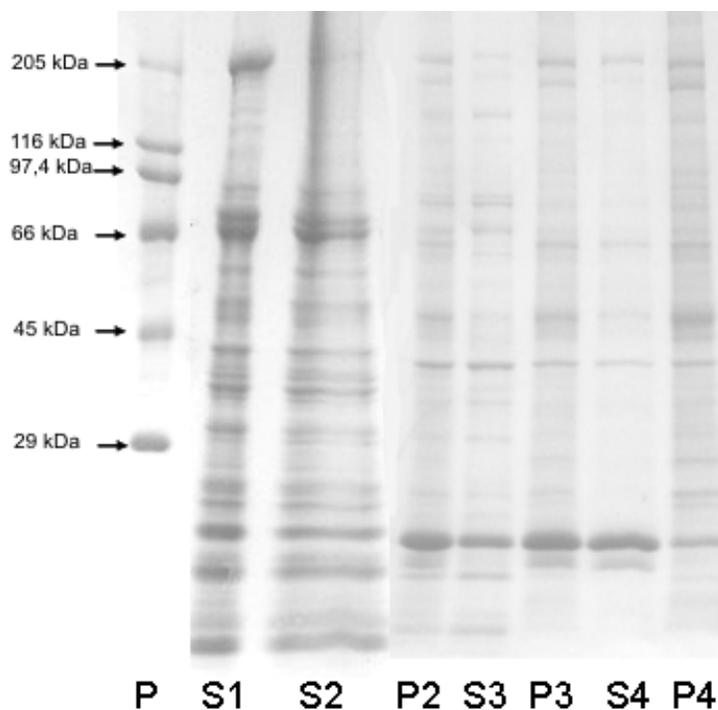


Figura 1: Perfil de polipeptídios das frações S1, S2, P2, S3, P3, S4 e P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Foram aplicados: 12,30 μg de S1; 12,38 μg de S2, 3,05 μg de P2, 2,12 μg de S3, 3,27 de P3, 1,92 μg de S4, 3,72 μg de P4. P – Padrão de peso molecular SDS-6H.

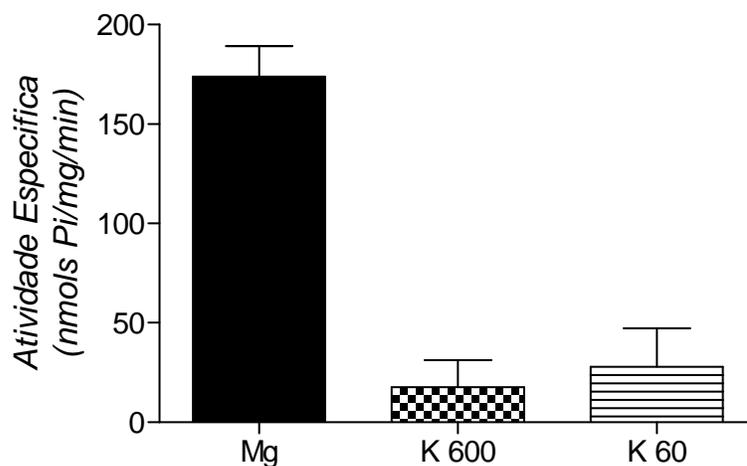


Figura 2: Atividade K-EDTA da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 μg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e MgCl_2 4 mM) para atividade Mg-ATPásica ou ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 ou 600 mM, conforme indicado) para atividade K-EDTA-ATPásica. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C por 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

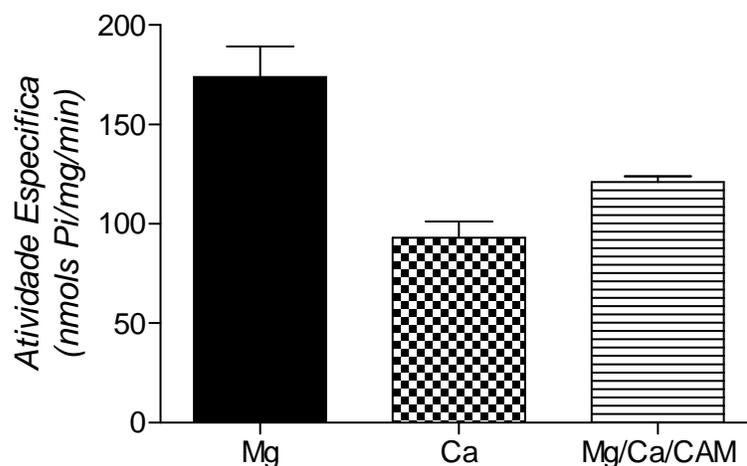


Figura 3: Atividade ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 µg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM) e onde indicado MgCl₂ 4 mM, CaCl₂ 4 mM ou MgCl₂ 4 mM / Ca Cl₂ 2 mM / CAM 1 mg/mL. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

Efeito de cátions sobre a Atividade ATPásica da Fração P4

A atividade ATPásica da fração P4 foi analisada na presença de diferentes cátions, na concentração de 2 mM. A atividade Mg-ATPásica foi de 221 nmols de Pi/mg/min sendo considerada 100%. A atividade Co-ATPásica foi similar à atividade Mg-ATPásica, enquanto que a atividade Ca-ATPásica manteve-se em torno de 67% desta. Na presença do íon cobre ou zinco ou ferro (Fe²⁺ ou Fe³⁺) a atividade ATPásica foi inferior a 50 % em relação à atividade Mg-ATPásica (Figura 4). Foi testado também o efeito dos vários íons, na concentração de 2 mM, na atividade Mg-ATPásica. Esta foi inibida em aproximadamente 25% na presença de cálcio e 20% na presença dos íons cobalto ou ferro (Fe²⁺). Na presença de cobre ou ferro, no estado férrico, ocorreu uma queda de 50 % na atividade Mg-ATPásica e o íon zinco causou a maior inibição, aproximadamente 75 % (Figura 5). O ascorbato, utilizado para manutenção do estado reduzido do ferro, causou cerca de 50 % de inibição da atividade Mg-ATPásica da fração P4.

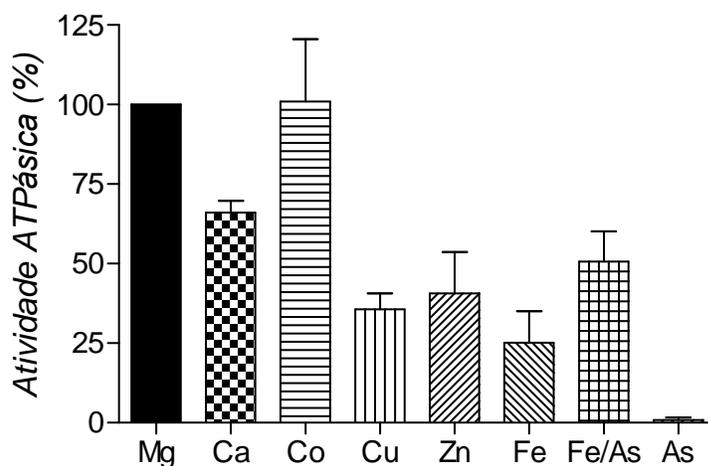


Figura 4: Efeito de cátions na atividade ATPásica de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 µg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM) contendo os cátions indicados na concentração de 2 mM. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem

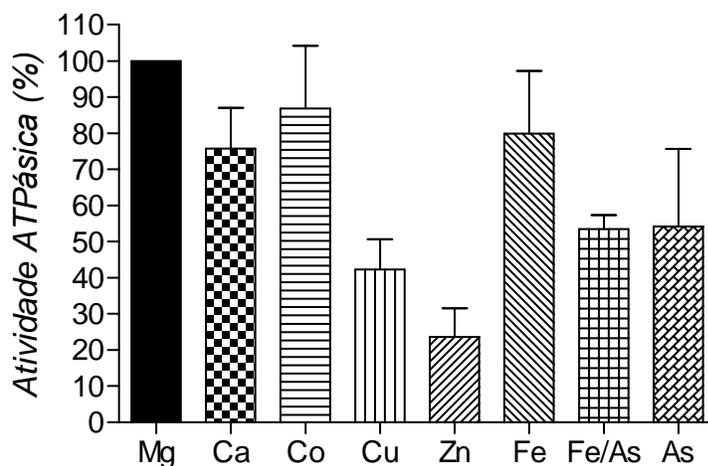


Figura 5: Efeito de cátions sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 µg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 2 mM) contendo os cátions indicados na concentração de 2 mM. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

A atividade Mg-ATPásica da fração P4 aumenta com o aumento da concentração de magnésio e alcança um pico de atividade (100 %) com cloreto de magnésio na concentração de 1,5 mM. Em concentrações maiores de $MgCl_2$, a atividade Mg-ATPásica cai chegando a 75 % da atividade máxima com 6 mM de cloreto de magnésio (Figura 6). Na presença de cloreto de magnésio 0,5 mM (concentração abaixo do ponto de atividade máxima), a atividade ATPásica da fração P4 aumenta com a adição de $CaCl_2$ ou $CoCl_2$ (figuras 7 e 8), mas em cloreto de magnésio 2,0 mM (concentração acima do ponto de atividade máxima) nem o cálcio e nem o cobalto causam aumento da atividade ATPásica (figura 9).

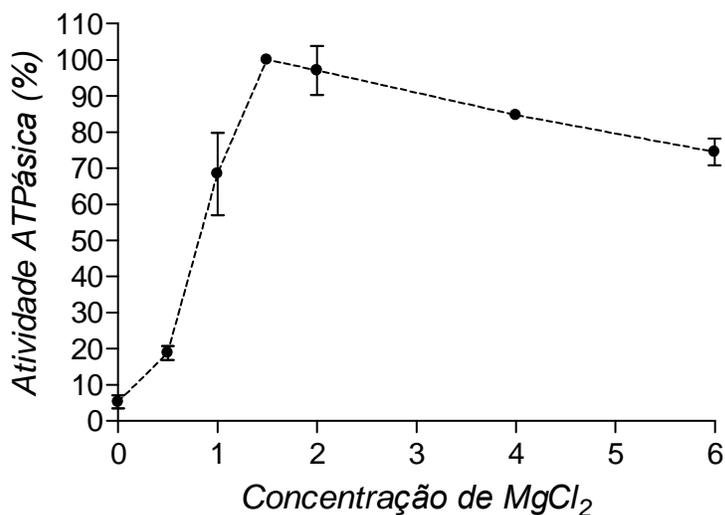


Figura 6: Efeito da concentração de magnésio na atividade ATPásica de P4. Adicionou-se 9 μ g de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM e cloreto de magnésio conforme indicado). A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 ° C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

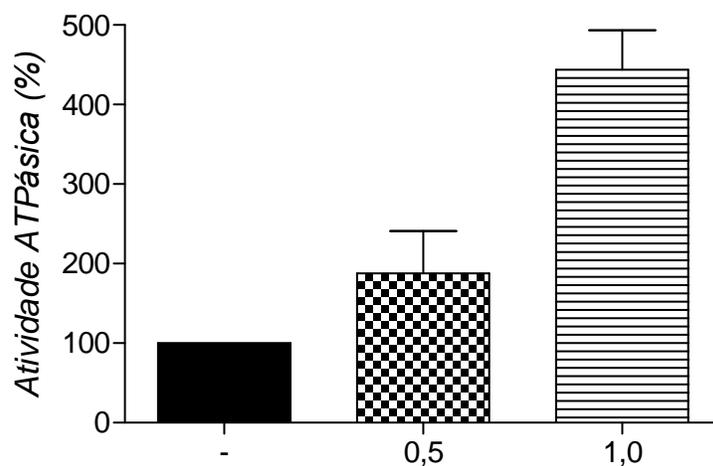


Figura 7: Efeito de ions calcio sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 μg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl_2 0,5 mM) contendo o íon cálcio na concentração de 0,5 ou 1,0 mM, conforme indicado. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

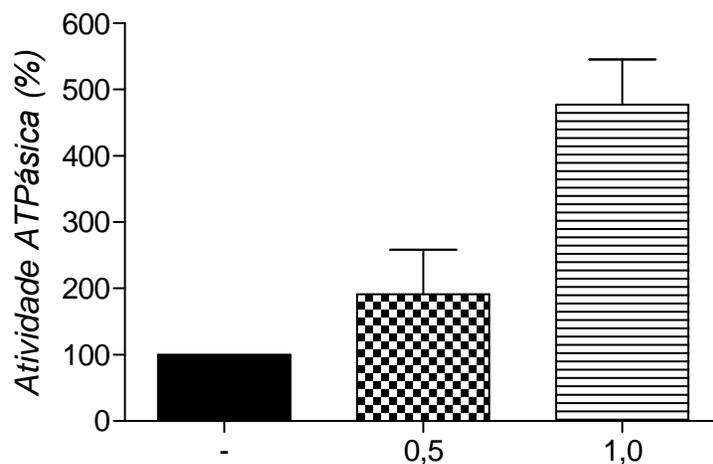


Figura 8: Efeito de ions cobalto sobre atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 μg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl_2 0,5 mM) contendo o íon cobalto na concentração de 0,5 ou 1,0 mM, conforme indicado. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

Para verificar a especificidade de substrato da fração P4, utilizou-se GTP, ADP e PPi no lugar do ATP no meio de reação. A atividade Mg-GTPásica da fração P4 correspondeu a cerca de 50 % da sua atividade Mg-ATPásica. Na presença de PPi a atividade foi cerca de 25 % da atividade Mg-ATPásica, enquanto que na presença de ADP a atividade foi desprezível (Figura 9). O vanadato, um íon estruturalmente similar ao fosfato e conhecido para inibir diversas ATPases, mostrou apenas uma leve inibição (~20%) da atividade Mg-ATPásica de *Pachymerus nucleorum* em todas as concentrações analisadas, 0,05, 0,2 e 1 mM (Figura 10).

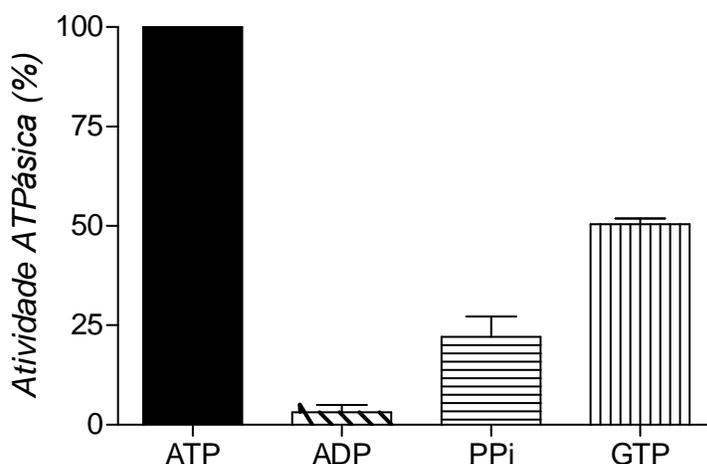


Figura 9: Especificidade de substrato da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 µg de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 4 mM). A reação foi iniciada com adição de substrato 1 mM conforme indicado, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

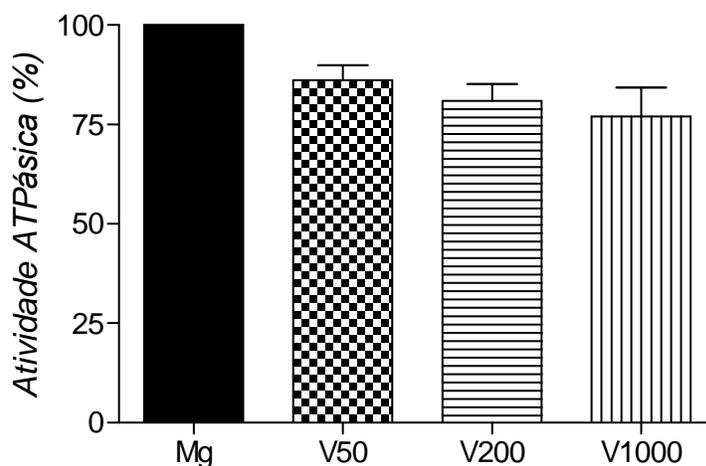


Figura 10: Efeito do Vanadato de sódio sobre a atividade Mg-ATPásica da fração P4 de larva de *Pachymerus nucleorum*. Adicionou-se 9 μ g de proteína de P4 ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 4 mM e vanadato de sódio nas concentrações indicadas (μ M) . A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM, incubada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 2 mL de solução de dosagem.

Discussão

A fração P4 de *Pachymerus nucleorum* apresenta atividade Mg-ATPásica acima de 1000 nmols de Pi/mg/min, sendo cerca de 34 vezes maior do que a atividade de S1. O tratamento da fração S1 com sulfato de amônio eliminou acima de 95 % de proteínas e gerou uma fração precipitada com atividade ATPásica 7,6 vezes maior do que a atividade de S1 (tabela I). Nas etapas seguintes, pouco se alterou em relação à quantidade de proteínas nas frações precipitadas. Contudo em relação a P3, a fração P4 mostrou um aumento de 6 vezes na atividade ATPásica. Em SDS-PAGE, a fração P4 (fig. 1) apresentou 5 polipeptídios principais: 202, 180, 54, 43 e 17 kDa. Os polipeptídeos de 202, 43 e 17 kDa apresentam Mr similares aos observados em preparações de actomiosinas (Larson, et al., 1990; Cheney, et al., 1993; Mermall & Mooseker, 1998)

As miosinas, motores moleculares que realizam transporte ao longo de filamentos de actina, são ATPases amplamente distribuídas na natureza. A cadeia pesada de miosina II e V possuem em torno de 200 kDa e apresentam cadeias leves em torno de 20 kDa (Cheney, et al., 1993; Lowey et al., 1993). A actina é uma proteína globular de aproximadamente 43 kDa (Pollard, et al., 1990).

Em P4, observamos polipeptídeo de alto peso molecular, similares ao encontrados nas classes de miosinas, juntamente com um polipeptídeo com mobilidade relativa semelhante à actina. Observa-se também um polipeptídeo com Mr similar a cadeia leve de miosinas. Apesar da similaridade com preparações de actomiosina, ensaios de imunoblotting realizados com a fração P3 (dados não mostrados) não apresentaram reação cruzada com anticorpos contra cadeia pesada de miosina II ou V. Contudo vale ressaltar a distância filogenética entre insetos e vertebrados.

Além da atividade Mg-ATPásica na presença de filamentos de F-actina, as miosinas apresentam alta atividade K-EDTA-ATPásica, ou seja, atividade estimulada pela presença de alto potássio e na ausência de cátions bivalentes. Algumas possuem alta atividade Ca-ATPásica (Maruta & Korn, 1977) enquanto outras possuem atividade Mg-ATPásica estimulada por cálcio e pelo complexo Ca^{2+} / Calmodulina (Espindola et al., 1992; Cheney, et al., 1993; Hasson & Mooseker, 1996).

A fração P4 apresenta tanto atividade Mg-ATPásica como Ca-ATPásica, sendo a atividade Mg-ATPásica 30% superior à Ca-ATPásica. A atividade Mg-ATPásica não é estimulada pela adição de cálcio ou cálcio/calmodulina. Observar-se também que P4 não apresenta atividade K-EDTA-ATPásica .

Uma Ca-ATPásica purificada parcialmente de larvas de *Pachymerus nucleorum*, não expressou atividade na presença de outros cátions, como magnésio, cobre, cobalto e zinco (Cruz, 2006; Cruz e Coelho, 2006). Na presença de cátions como magnésio, cobalto, cobre ou zinco, a atividade Ca-ATPásica desta enzima foi inibida totalmente. A presença de magnésio nas concentrações de 0,25 mM inibe mais de 50 % dessa atividade Ca-ATPásica (Cruz, 2006; Cruz e Coelho, 2006). Diferente dessa ATPase, a enzima da fração P4 apresenta

atividade Mg-ATPásica e Co-ATPásica maior do que a atividade Ca-ATPásica. A atividade Ca-ATPásica da fração P4 corresponde a cerca de 50 % da atividade Mg-ATPásica.

Uma única enzima parece ser responsável pelas atividades Mg-ATPásica, Ca-ATPásica e Co-ATPásica da fração P4, pois em concentrações de magnésio abaixo do ponto de atividade máxima observa-se uma ativação da atividade Mg-ATPásica pela adição de cálcio ou cobalto, mas em concentrações de magnésio acima de 1,5 mM, que corresponde ao pico de atividade, não foi observado ativação da atividade ATPásica por cálcio ou cobalto. Portanto, nessas condições não foi observado uma soma das atividades Mg-ATPásica e Ca-ATPásica ou Mg-ATPásica e Co-ATPásica, como era esperado caso houvessem mais de uma enzima ativa na fração P4

As apirase são enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos di e trifosfato para monofosfato e fosfato inorgânico na presença de cálcio ou magnésio (Plesner, 1995). Diferente destas enzimas, a fração P4 não apresentou atividade ADPásica. A atividade GTPásica da fração P4 pode ser devido a alguma GTPase específica como a dinamina, uma GTPase envolvida nos processos de endocitoses, que foi primeiramente identificada em preparações de dineína e cinesina de cérebro (Shpetner & Valle, 1989) ou à própria ATPase dessa fração, que também usa o GTP como substrato. Dineína citoplasmática de cérebro, por exemplo, apresenta atividade GTPásica maior que a atividade ATPásica (Shpetner et al., 1988). Observou-se, também, uma pequena atividade pirofosfatase na fração P4, que pode ser devida à ação inespecífica da ATPase dessa fração ou à presença de alguma pirofosfatase nessa fração. A fração P4 também não apresenta inibição pelo íon vanadato (0,05, 0,2 e 1 mM), como observado por SHPETNER et al (1988) nas dineínas citoplasmáticas de cérebro, que são inibidas por vanadato 10 μ M e as cinesinas convencionais que são inibidas por concentrações de vanadato em torno de 50 μ M.

Referências Bibliográficas

Al-Fifi, Z.I.A., Marshall, S.L., Hyde, D. Anstee, J.H., Boweler, K., 1998. Characterization of ATPases of apical membrane fractions from *Locusta migratoria* Malpighian tubules. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 201-211.

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

Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75, 13-23.

Cheney, R. E., 1998. Purification and assay of myosin V. *Methods in Enzimology.* 298, 3-18.

Cruz, C.G.C., 2006. Caracterização de uma Ca-ATPasica de larva *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1972) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia –UFU. 65p.

Cruz, C.G.C., Coelho, M.V. 2006. Characterization of the Ca²⁺-ATPase Activity of *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) Larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B.* Submetido a publicação.

Cunha, V.M.N., De Souza, W., Noel, F., 1988. A Ca²⁺-stimulated, Mg²⁺-dependent ATPase activity in subcellular fraction from *Shistosoma mansoni*. *FEB.* 241, 65-68.

Espindola, F. S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A.R., Costa, F. R. C., Mooseker, M. S., Larson, R. E., 1992. Biochemical and immunological

characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biol.* 118, 359-368.

Gershoni, J. M., Palade, G. E., 1982. Protein blotting: principles and application. *Anal Biochem.* 131, 1-15.

Hasson, T., Mooseker, M. S., 1996. Vertebrate unconventional myosins. *J. Biol. Chem.* 271, 16431-434.

Heinonen, J. K., Lathi, R. J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113, 313-317.

Hirokawa, N.; Noda, Y.; Okada, Y. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 60-73.

LAEMMLI, U. K., 1973. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.

Larson, R.E., Espindola, F.S., Espreafico, E.M., 1990. Calmodulin-binding proteins and calcium-calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.* 54, 1288-1294.

Lowey, S., Waller, G., Trybus, K. 1993. Function of Skeletal Muscle Myosin Heavy and Light Chains forms by an in Vitro Motility Assay. *J. Biol. Chem.* 268, 20414-20418.

Maruta, H., Korn, E. 1977. *Acanthamoeba* myosin II. *J. Biol. Chem.* 252, 6501-6509.

May, P.H., Anderson, A.B., Balick, M.J. Frazão, J.M.F., 1985a. Subsistence benefits from the babassu Palm (*Orbignya maritana*). *Econ. Bot.* 39 (2), 113-129.

Mermall, V., Post, P.L., Mooseker, M. S., 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science*, 279, 527-533.

Merzendorfer, H., Harvey, W.R., Wieczorek, H., 1997. Sense e antisense RNA for the membrane associated 40 kDa subunit M40 of the insect V-ATPase. *FEBS Letters*. 411, 239-244.

O'Donnell, M.J., Janowski, J.P., Linton, S.M., Rheault, M.R., 2003. Inorganic and organic anion transport by insect renal epithelia. *Biochem. Biophys. Acta*. 1618, 194-206.

Ping, G., Yanping, L., Shigui, L., 2004. Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pesticide Biochem. and Physiol.* 80, 157-162.

Plesner, L. 1995. Ecto-ATPases: Identities and functions. *Inter. Rev. of Cytol.* 158, 141-214.

Pollard, T.D., Satterwhite, L., Cisek, L., Corden., Sato., Maupin, P., 1990. Actin and Myosin biochemistry in relation to cytokinesis. *Annals New York Ac. Sciences*. 582, 120-130.

Pullikuth, A.K., Gill, S.S., 1999. Identification of a *Manduca sexta* NSF ortholog, a member of the AAA family of ATPases. *Gene*. 240, 343-354.

SELLERS, R. J., 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta*, 1496, 03-22.

Schmid, S.L., McNivent, M.A., Camilli, P.1998. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.*10, 504-512.

Shpetner, H.S., Paschal, B.M., Vallee, R.B.1988. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *The J. of Cell Biol.* 107, 1001-1009.

Shpetner, H.S., Vallee, R.B. 1989. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell.* 59, 421-432.

STUDIER, F. W., 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79, 237-248. .

Wink, M.R., Buffon, A., Bonan, C.D., Valensuela, M.A., Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., 2000. Effect of protein-modifying reagents on ecto-apyrase from rat brain. *The Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 105-113.

- CAPITULO II-

**Caracterização parcial de atividade amilásica presente
em intestino de larva de *Pachymerus nucleorum*
(Fabricius, 1792)**

Resumo

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) é uma espécie de besouro da sub-família Bruchinae, família Chrysomelidae e cujo principal hospedeiro são cocos da palmeira babaçu (*Orbinya spp*), planta típica de zonas de várzeas e vales de rios. O objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar atividade amilásica no intestino de larva de *P. nucleorum*. Foram retirados o intestino de larvas de *P. nucleorum*, homogeneizados imediatamente em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 contendo inibidores de protease (Aprotinina 0,2 µg/mL e Benzamidina 1 mM) e sacarose 250 mM e EDTA 1 mM. A fração solúvel S1 apresentou maior atividade amilásica em relação à fração precipitada P1 e análise em SDS-PAGE mostrou polipeptídios em torno de 62 kDa e entre 12 a 40 kDa nessa fração. A fração S1 apresentou máxima atividade amilásica a 50 °C. Na presença de cálcio 0,5 mM ou cloreto de sódio 14 mM, a atividade amilásica foi ativada, respectivamente, em 20 e 45 %. A preparação com sacarose e EDTA apresentou maior atividade amilásica em relação à preparação sem sacarose e EDTA. Em ambas as preparações, observou-se um aumento de atividade quanto armazenada em geladeira, um maior aumento na preparação sem sacarose e EDTA.

Palavras-chave: Babaçu, Bruquídeo, *Pachymerus nucleorum*, atividade, amilásica.

Abstract

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) is a beetle specie of the Bruchinae sub-family, family Chysomelidae and principal host is coconut of the palm babassu (*Orbinya spp*), typical of the varzea zones and river valleys. The objective in this work was identify and to characterize the amylolytic activity in *P. nucleorum* larvae guts. The guts were immediately homogenized in phosphatate buffer 50 mM pH 7,5 containing protease inhibitor (Aprotinine 0,2 ug/mL and Benzamidine 1 mM), sucrose 250 mM and EDTA 1 mM, after that the samples were centrifugated at 15000_xg for 30 minutes, 4 ° C. The supernatant fraction (S1) presented higher amylolytic activity in relation to the precipitated fraction (P1). Analyses in SDS-PAGE revealed polipeptides of 62 kDa, in fraction P1 and in fraction S1 polipetides of 12 and 40 kDa. The fraction S1 presented maximum amylolytic activity in 50°C, and estimation of the activity in 20% and 45% in presence of calcium 0,5 mM or sodium chloride 14 mM, respectively. The preparation containing sucrose and EDTA presented higher amylolytic activity in relation to the preparation without sucrose and EDTA. An increase in the amylolytic activity was observed in both preparations when stored in refrigerator, however the preparation without sucrose and EDTA presented higher increase in this activity.

Keywords: Babassu, Bruchid, *Pachymerus nucleorum*, activity, amylase.

Introdução

Pachymerus nucleorum (Fabricius, 1792) é uma espécie de besouro incluída na família Bruchidae, atualmente modificada para sub-família Bruchinae, da família Chrysomelidae. Essa família é conhecida por atacar sementes de *Phaseolus vulgaris* (Carvalho et al 1968; Meik & Dobie, 1968) e copas de plantas tropicais como *Acácia farnesiana* (Janzen, 1971), *Erythrina abyssinica* (Ernst, 1993) e *Attalea phalerata* (Santos et al.,2003). O principal hospedeiro da larva de *P. nucleorum* são cocos da palmeira babaçu (*Orbinya spp*) planta típica da região de transição entre o cerrado, a mata amazônica e o semi-árido nordestino, se concentrando no Estado brasileiro do Maranhão.

Larvas de besouro da família Bruchinae possuem α -amilases (EC 3.2.1.1), enzimas que degradam o amido, hidrolisando suas ligações α -1,4-glicosídicas, também classificadas como endoamilases. No intestino médio de larvas de besouros da espécie *Zabrotes subfasciatus*, praga de *Phaseolus vulgaris*, encontram isoformas de α -amilase com 95, 85 e 65 kDa. A isoforma de 85 kDa possui sensibilidade ao calor, sendo completamente inativada após 30 minutos de incubação a 65 °C, enquanto que a de 65 kDa se mostrou mais termoestável, permanecendo ativa depois de 2 horas. A isoforma de 95 kDa mostrou termoestabilidade intermediária inativando-se entre 90 a 120 minutos (Silva et al.,1999). Em 1990, Lemos e colaboradores verificaram que frações de α -amilases obtidas de *Z. subfasciatus* foram levemente inibidas a 60 °C, mas tal atividade foi reestabelecida após a adição de NaCl 20 mM ou CaCl₂ 1,0 mM. Esses pesquisadores também observaram que a adição de EDTA a 2 mM estimulava em 27 % a atividade amilásica em algumas frações, mas inibia outras em 34 %. Em intestino de larvas da espécie *Z. subfasciatus* inibidores de α -amilase (α AI-1) ou inibidores extraído de *Triticum aestivum* mostravam ações distintas (Lemos et al.,1990). Essa diferença de inibição foi relacionada à capacidade de liberação de diferentes isoformas pela larva (Silva et al., 2001).

No intestino de *Callosobruchus maculatus*, pragas de sementes de *Vigna unguiculata*, encontram-se isoformas de α -amilase de 56, 45 e 35 kDa que apresentaram sensibilidade ao calor. A amilase de 35 kDa mostrou maior sensibilidade ao calor enquanto que a de 56 kDa apresentou maior termostabilidade, mas todas foram completamente inativas a 65 °C por um período menor que 10 minutos (Silva et al., 1999). Em 1989, Campos e colaboradores mostraram a presença de isoformas similares em *C. maculatus* que não eram inibidas por inibidor de α -amilase (α AI-1), extraído de sementes de *Phaseolus vulgaris*, mas eram inibidas por inibidores extraídos de *Triticum aestivum*.

Como a digestão de amido é de fundamental importância para os bruquídeos, a identificação e caracterização de atividade amilásica em intestino de larvas do coleóptero *Pachymerus nucleorum* pode esclarecer aspectos importantes desse processo e ser útil no controle desses insetos.

Material e Métodos

Reagentes

Os reagentes amido, fosfato monobásico e bibásico, EDTA, inibidores de proteases, β -mercaptoetanol e DTT foram obtidos da SIGMA Co. USA. O kit de amilase foi obtido da Labtest Diagnóstica. Os demais reagentes usados foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

Preparação da fração com atividade amilásica

Larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792) foram retiradas de coco de babaçu (*Orbinya spp*), lavadas e dissecadas com o auxílio de uma lupa. Homogenizou-se imediatamente 0,1g de intestino por mL de tampão Fosfato 50 mM, pH 7,5 contendo Benzamidina 1 mM, Aprotinina 2 µg/mL e conforme indicado Sacarose 250 mM e EDTA 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000xg durante 30 minutos a 4 °C em centrifuga Sigma 3K30. As frações sobrenadante (S1) e precipitada (P1) foram recuperadas e mantidas a 4 °C.

Determinação da Atividade Amilásica

A atividade amilásica foi dosada pelo método de Caraway (1959) usando o kit de amilase da LABTEST. Adotou-se como unidade (U) a quantidade de enzima que cliva 10 mg de amido em 30 minutos a 37 °C.

Cálculos de atividade amilásica:

$$\text{Amido hidrolisado} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. da amostra})}{\text{Abs. controle}} \times [] \text{ de amido}$$

Método de Dosagem de Proteína

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976). Paralelamente a dosagem protéica das frações, uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada.

Método de Dosagem de Cálcio

O cálcio foi dosado pelo método de Connerty (1966) usando o kit de cálcio da Bioclin.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações protéicas foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema tampão descontínuo de Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973) e mini-géis com concentração gradiente de 5 a 22 % e fixa de 10 %. Como padrão utilizou-se padrão de peso molecular SDS-6H da SIGMA Co. USA.

Zimograma

Os mini-géis foram preparados em concentração de 10 % (gel de separação), usando mini-géis 10 x 8 x 0,075 cm. As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 µL da respectiva fração a 10 µL de tampão de amostra (Tris 6,5 mM pH 6,8 contendo glicerol 1 %, SDS 2 %, Bromofenol 1 %), observando a ausência de aquecimento e β-mercaptoetanol. A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida sob voltagem constante de 150 V utilizando fonte Bio-Rad Power Pac 1000.

Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de Triton X-100 a 2,5 % (w/v) por 20 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, transferida para uma solução de tampão fosfato pH 7,0 contendo amido solúvel a 1 % (w/v) e incubada a 37 °C por 24 horas. A atividade amilásica foi parada com adição de solução corante (iodo metálico 1,3 % e iodeto de potássio 3 %). Após a reação, as bandas claras contra o fundo escuro indicam a presença de amilase ativa.

Estatística

Os testes estatísticos foram feitos a partir de 3 experimentos (n=3), analisados através do Teste *t-student*, com índice de significância de 5 % (P=0,05). Estão plotados as médias e os erros padrões.

Resultados

Perfil eletroforético da fração S1 e P1

Em SDS-PAGE, observa-se que a fração sobrenadante S1 apresenta uma banda mais evidente, que corresponde a dois polipeptídios de Mr em torno de 62 kDa. Esta ainda apresenta vários outros polipeptídios, mas que aparecem menos intensamente no gel. Dentre esses, destacam-se um de alto peso molecular (234 kDa) e alguns entre 12 e 40 kDa. Já na fração precipitada P1, verifica-se a presença de 6 polipeptídeos mais evidentes, dois pareados em torno de 63 kDa. O restante se distribui abaixo do padrão de peso molecular 45 kDa, dois com peso molecular de 31 e 27 kDa e mais dois polipeptídios de baixo peso molecular pareados em torno de 21 kDa (Figura 1).

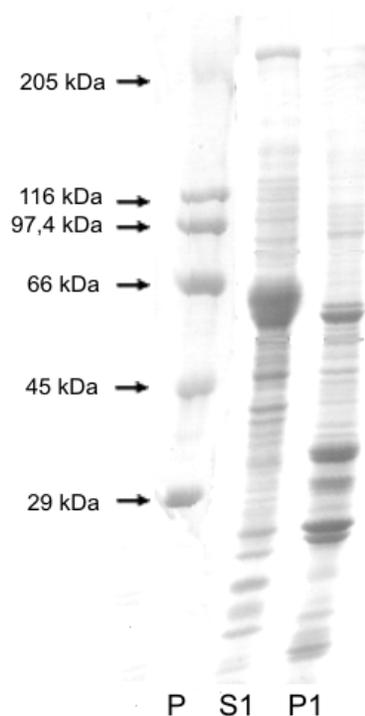


Figura 1: Perfil de polipeptídios das frações S1 e P1 de intestino de larva de *Pachymerus nucleorum*. Foram aplicados: 8,01 μg de S1; 8,22 μg de P1. P – Padrão de peso molecular SDS-6H

Análise da atividade amilásica das frações S1 e P1

A fração S1 apresenta atividade amilásica de 187,74 mU/mg, correspondendo a hidrólise de 11 % do amido do meio de reação, ao passo que a fração precipitada P1 não apresenta atividade amilásica (Figura 2).

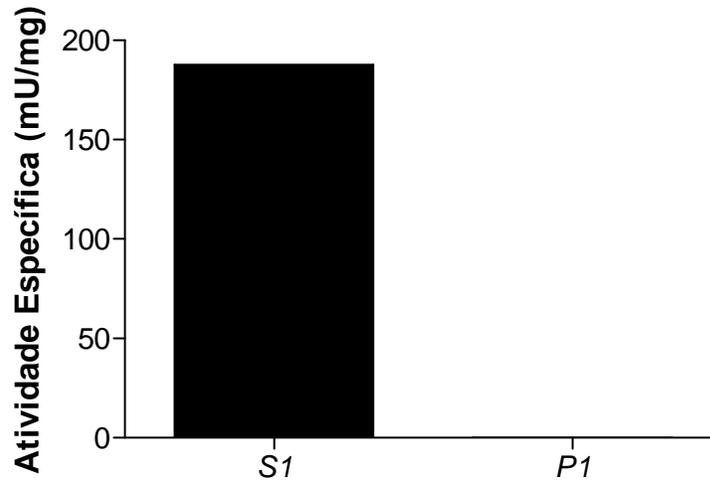


Figura 2: Atividade amilásica das frações S1 e P1 de intestino de larva de *P. nucleorum*. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando, em seguida, 0,17 mg de S1 ou 0,12 mg de P1, conforme indicado. Após incubação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

A determinação da atividade amilásica foi realizada através da leitura de amido remanescente na reação. Para verificar se a atividade estava subestimada foi analisado o conteúdo de amido endógeno nas frações S1 e P1. Observou-se que a fração P1 apresenta 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de amido, enquanto a fração S1 apenas 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 3). Na figura 4 observa-se que a fração P1 causou o desaparecimento total da atividade amilásica da fração S1. Isto é devido ao amido endógeno de P1 (ver discussão). Uma leve inibição aparente também foi detectada quando a fração P1 foi adicionada a frações de amilase salivar (Figura 5).

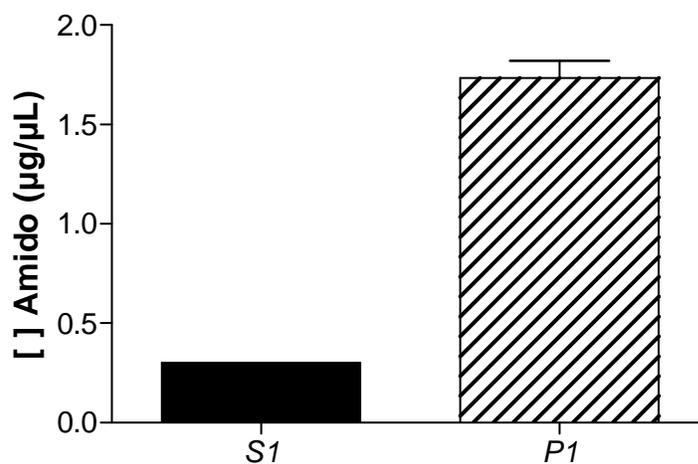


Figura 3: Concentração de amido nas frações S1 e P1. Acrescentou-se 50 µL da fração S1 ou P1 conforme indicado, em 500 µL de água. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água. Utilizou-se curva padrão de amido de 0 a 0,2 mg.

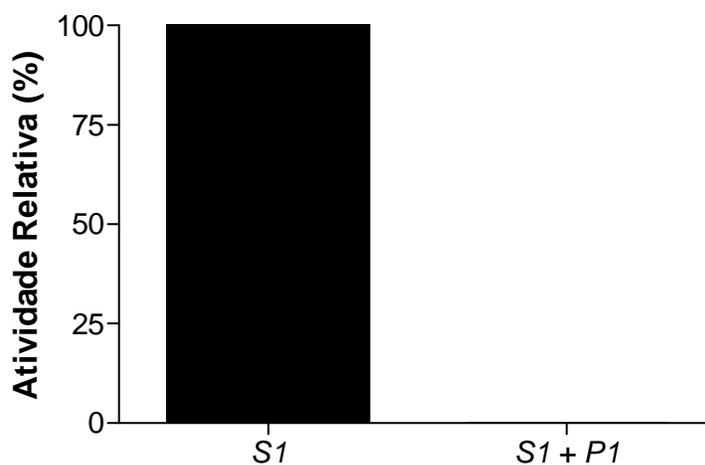


Figura 4: Efeito da fração P1 sobre a atividade amilásica da fração S1. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando, em seguida, 0,17 mg de S1 e 0,12 mg de P1 conforme indicado. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

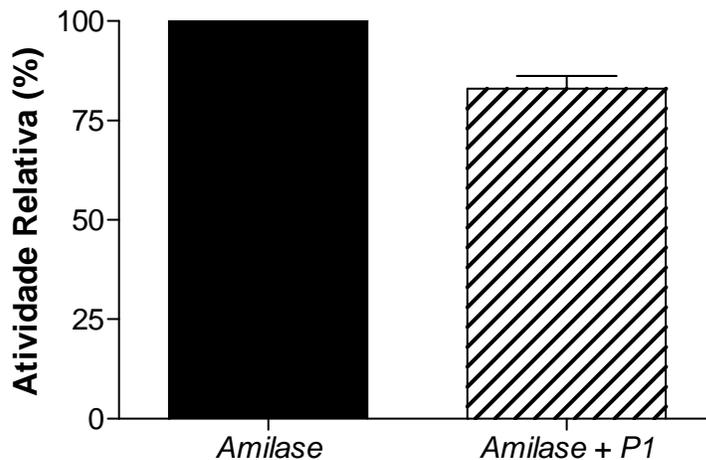


Figura 5: Efeito da fração P1 sobre a atividade amilásica da amilase salivar. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando frações de 0,88 µg de amilase salivar e 10 µL de P1 conforme indicado. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

Efeito de Sacarose e EDTA na preparação da fração S1

Na preparação da fração S1, foram usados tampões de extração sem ou com sacarose 250 mM e EDTA 1 mM, que mostraram diferenças significativas em relação à atividade amilásica. A preparação com sacarose e EDTA apresentou atividade específica de 187,74 mU/mg, enquanto a extração sem sacarose e EDTA teve atividade específica de 60,82 mU/mg (Figura 6).

Como a preparação obtida com sacarose e EDTA, apresentou atividade amilásica 3 vezes maior do que a preparação sem, testou-se o efeito da sacarose e do EDTA na atividade amilásica dessa última. Observou-se uma ativação de apenas 5 % quando se adicionou sacarose e 4 % em relação ao EDTA, comparados com o controle sem sacarose e EDTA (Figura 7).

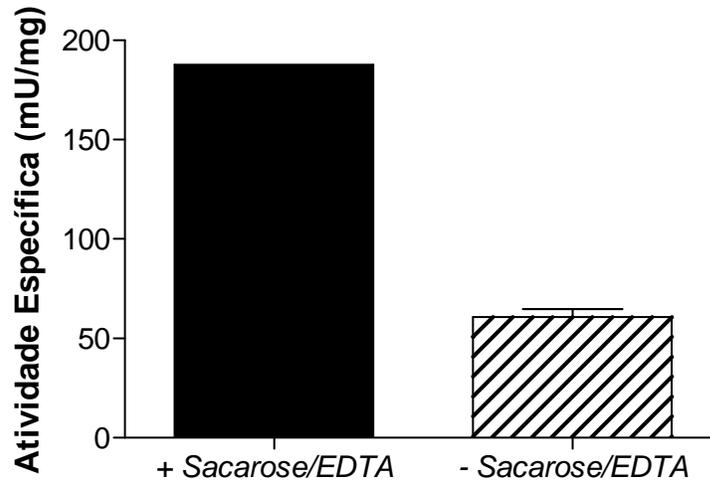


Figura 6: Atividade amilásica das frações S1 obtidas com e sem sacarose e EDTA. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando em seguida 0,12 ou 0,17 mg de proteína de S1, respectivamente, com ou sem sacarose e EDTA conforme indicado. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

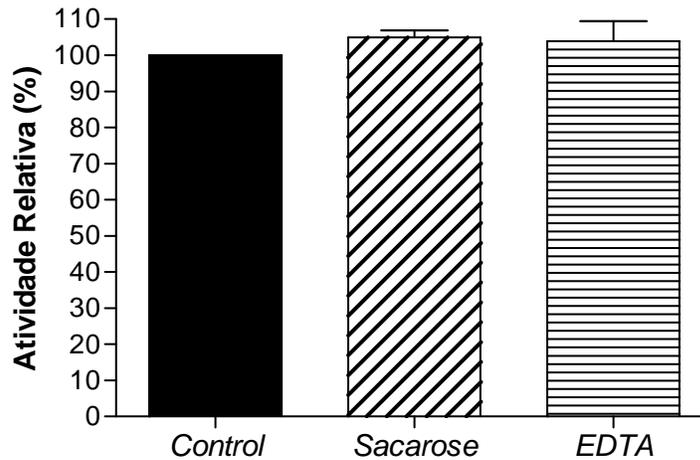


Figura 7: Efeito de sacarose e EDTA sobre a atividade amilásica de S1. Adicionou-se, 5 minutos antes do ensaio de atividade, 250 mM de Sacarose ou 1 mM de EDTA em frações de S1 obtidas sem sacarose e EDTA. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando em seguida 0,17 mg de proteína. Após incubação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

Observou-se também que a atividade amilásica da fração S1 obtida com e sem sacarose e EDTA apresentou, quando armazenada a 4 °C, um aumento em torno de 20 e 90 %, respectivamente (Figura 8). Como era esperado, as duas frações S1 apresentaram diferenças também na concentração de cálcio livre. Na fração obtida na presença de sacarose e EDTA a concentração de cálcio livre foi de 63 µM, enquanto que a fração obtida sem sacarose e EDTA apresentou uma concentração 4 vezes maior, correspondendo a 242 µM (Figura 9). Como a fração S1 apresentou atividade amilásica, os polipeptídios dessa fração foram separados em SDS-PAGE e incubados com amido solúvel (Zimograma). Observa-se, no zimograma pequenos pontos claros acima de 58 kDa, que parece corresponder à clivagem do amido. Foi usada uma amilase industrial (Termamyci) como controle positivo (Figura 10).

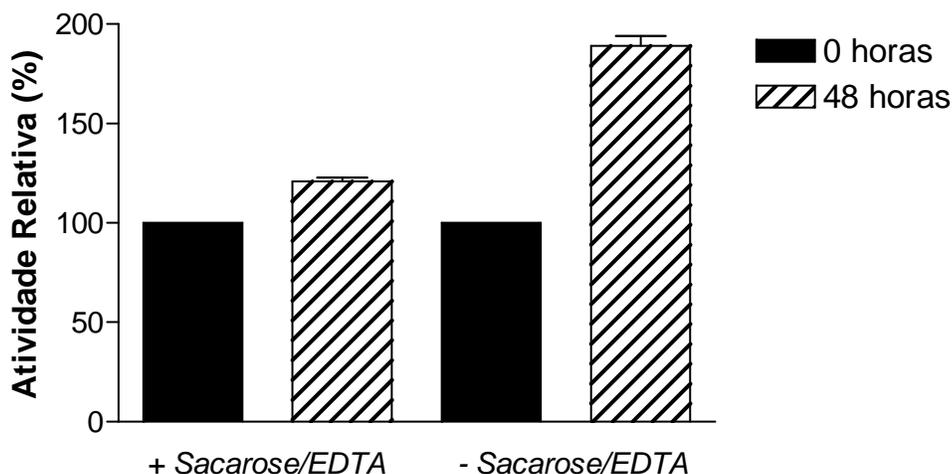


Figura 8: Estimulação da atividade amilásica das frações S1 com ou sem sacarose/EDTA após 48 horas a 4 °C. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando em seguida 0,12 ou 0,17 mg de proteína da preparação com ou sem sacarose e EDTA conforme indicado. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.



Figura 9: Concentração de cálcio nas frações S1 extraídas com ou sem sacarose/EDTA. Foram adicionados 20 µL da fração S1 a 1 mL de tampão e 1 mL de solução de γ -cresolfaleína 0,5 mM e 8-hidroxi quinoleína 0,7 mM. Como padrão utilizou-se cálcio 10 mg/dL.

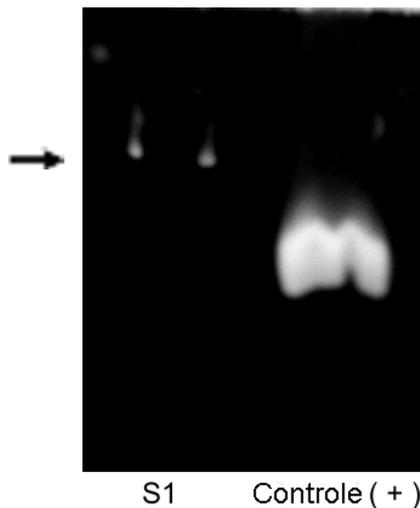


Figura 10: Zimograma da fração S1 de intestino de larva de *P. nucleorum*. 38 µg de S1 e 23 µg do controle (+) foram separados em SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de Triton X-100 a 2,5 % (w/v) por 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente, transferida para uma solução de tampão fosfato pH 7,0 contendo amido solúvel a 1 % (w/v) e incubada a 37 °C por 24 horas. Após adição de solução corante (iodo metálico 1,3 % e iodeto de potássio 3 %) as bandas claras contra o fundo escuro indicam a presença de amilase ativa. Utilizou-se como controle positivo amilase industrial

Caracterização da atividade amilásica da fração S1

Efeito de Temperatura

A atividade amilásica de S1 foi analisada em temperaturas que variavam de 24 a 80 °C. Como observado na figura 11, a fração S1 apresenta atividade de 137 mU/mg a 24 °C, elevando-se gradativamente até 235 mU/mg (50° C) e decaindo em temperaturas mais altas (11). Acima de 70 °C, a enzima é totalmente inativada.

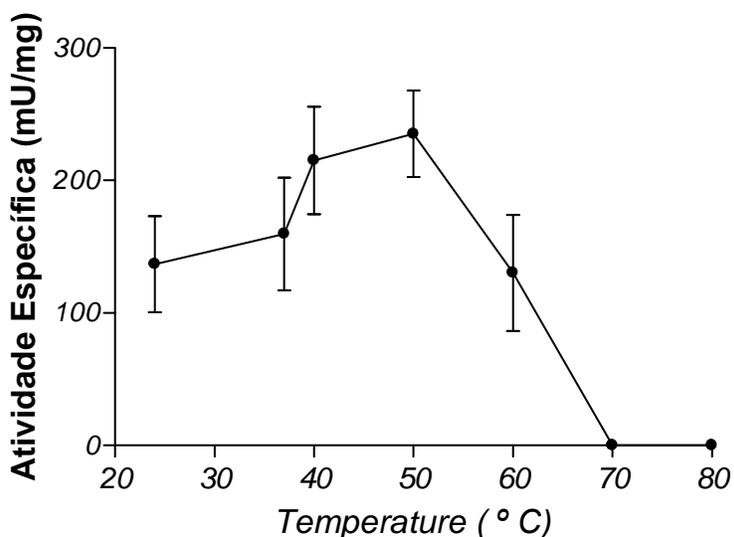


Figura 11: Efeito de temperatura sobre a atividade amilásica da fração S1. 0,2 mg de substrato foi pré-incubado por 2 minutos na temperatura indicada, adicionando em seguida 0,17 mg de proteína. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos, na temperatura indicada, foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

Efeito de Cálcio

Para verificar o efeito do cátion cálcio na atividade amilásica da fração S1, adicionou-se cloreto de cálcio em concentrações crescentes (0,05 a 2 mM) ao meio de reação. A atividade não se alterou significativamente nas diferentes concentrações de cálcio. Observou-se apenas um leve aumento (20 %) na atividade amilásica em 0,5 mM de cálcio, e uma leve inibição (16 %) na concentração de 2 mM (Figura 12).

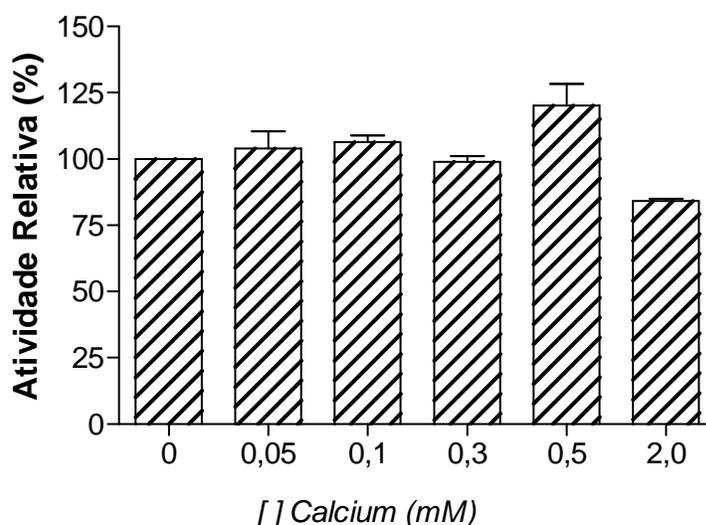


Figura 12: Efeito do íon cálcio sobre a atividade amilásica da fração S1. A fração S1 foi pré-incubada por 5 minutos com diferentes concentrações (0,05 a 2,0 mM) de cálcio. 0,17 mg de proteína dessa fração foram adicionados a 0,2 mg de substrato previamente incubado por 2 minutos a 37 ° C. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

Efeito de NaCl

O NaCl também parece afetar a atividade amilásica da fração S1. Observa-se que a atividade da fração S1, a princípio aumenta com o aumento da concentração de cloreto de sódio, culminando com 45 % de estimulação com 14 mM do NaCl. Esta se mantém estável em torno de 120 % durante as concentrações subsequentes (Figura 13).

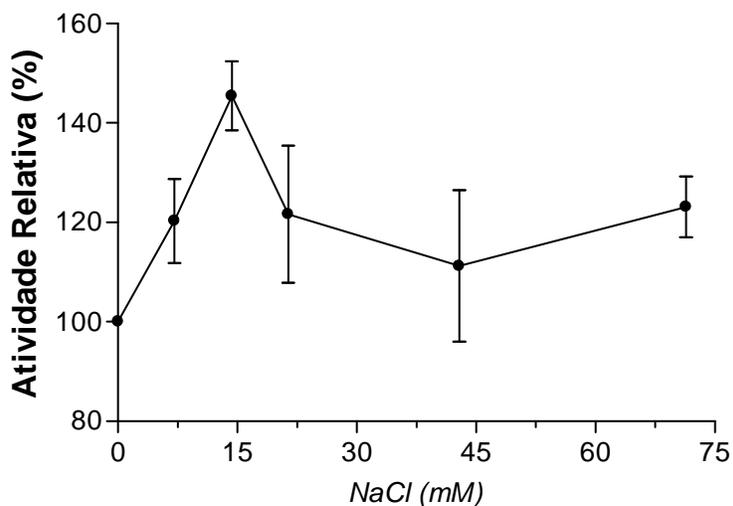


Figura 13: Efeito de cloreto de sódio sobre a da atividade amilásica da fração S1. 0,2 mg de substrato, contendo cloreto de sódio conforme indicado, foi pré-incubado por 2 minutos a 37 ° C, adicionando em seguida frações de 0,17 mg de proteína. Após incubação da reação por 7 minutos e 30 segundos foi adicionado 0,5 mL de solução de iodato de potássio 16,7 mM e iodeto de potássio 271 mM e 4 mL de água.

Discussão

A fração solúvel de *Pachymerus nucleorum* apresentou maior atividade amilásica em comparação à fração precipitada (fig. 2), semelhante à espécie *Zabrotes subfasciatus* cuja fração solúvel apresenta atividade amilásica cerca de 10 vezes maior do que a fração precipitada (Silva et al.,1999). Apesar da espécie *Callosobruchus maculatus* não apresentar diferença entre a atividade amilásica das frações solúvel e precipitada, a atividade específica dessas frações, em torno de 210 mU/mg, está próximo ao encontrado na fração solúvel de *Pachymerus nucleorum* (Silva et al.,1999).

De acordo com o zimograma, parece que um polipeptídeo em torno de 60 kDa é o responsável pela atividade amilásica da fração solúvel de *P. nucleorum* (fig. 9). Amilase com mobilidade relativa similar à desse polipeptídeo foi observada em *Z. subfasciatus* (Silva et al, 1999).

Os resultados mostraram a presença de amido endógeno tanto em S1 como P1 (fig. 3). Em relação a S1, a quantidade de amido presente, 0,3 µg/µL, quando considerada nos cálculos de atividade específica, elevou a atividade amilásica em cerca de 50 %, ou seja, a atividade de S1 está subestimada. Da mesma forma, a fração P1 apresentou atividade amilásica diferente de zero, quando considerado nos cálculos de atividade amilásica a presença de amido endógeno.

Nas condições de ensaio utilizadas, a fração S1 hidrolisou cerca de 16 % do substrato (amido endógeno a S1 + amido adicionado). Essa hidrólise foi totalmente inibida, quando a fração S1 foi incubada juntamente com a fração P1. Nesse ensaio, foram adicionados 0,1 mg de amido, endógeno à fração P1, ao meio de reação. Como o meio de reação contém 0,2 mg de amido, o amido proveniente de P1 corresponde a 50 % do amido do meio e é superior à quantidade de amido (0,032 mg), que a fração S1 hidrolisa nas condições de ensaio. Portanto, a aparente inibição da atividade amilásica da fração S1 pela fração P1 pode ser justificada pela presença de amido endógeno à fração P1 e

não devido a algum inibidor de amilase presente em P1. O amido endógeno à P1, também, justifica a leve inibição que essa fração causa na atividade da amilase salivar.

O aumento de atividade amilásica da fração S1, observado após 48 horas a 4 °C, também pode estar relacionado à quantidade de amido presente na fração S1 (fig. 3). Em temperaturas baixas, apesar da diminuição de atividade amilásica, o tempo de exposição do substrato amido à enzima amilase é muito longo (48 horas) e a hidrólise do amido endógeno pode justificar o pequeno aumento da atividade amilásica de S1 em preparações com sacarose e EDTA (fig. 8).

Na preparação sem sacarose e EDTA, o aumento de atividade amilásica, em torno de 90 %, não pode ser justificado pela degradação prévia de amido endógeno à fração S1. Uma possibilidade é a degradação de inibidores de amilases da fração S1 por proteases endógenas. Tais inibidores poderiam ser provenientes da dieta (castanha) da larva. No pH da fração S1 (7,5), a ação de proteinases pode estar favorecida, como observado para intestino de larva de besouro *Tenebrio molitor*, que apresentaram tripsina e quimotripsina ativas nessas condições (Terra e Cristofolletti, 1996). A fração S1 apresentou polipeptídeos com mobilidade relativa similar à de inibidores de amilases. O polipeptídeo de 45 kDa, por exemplo, possui mobilidade relativa similar à da faseolamina, um inibidor de amilase extraído de *Phaseolus vulgaris* (Marshall e Lauda, 1975). Observou-se também polipeptídeos com mobilidade relativa similares às subunidades da lectina extraída de *Talisia esculenta*. Essa lectina é um inibidor de amilase e sua introdução na dieta causou um aumento em 50 % na mortalidade de bruquídeos como *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* (Macedo et al., 2002; Franco et al., 2003). Polipeptídeo com mobilidade relativa similar à do inibidor extraído de *Triticum aestivum* também é observado na fração solúvel de *P. nucleorum*. Esse inibidor inibe a atividade amilásica de amilases de insetos como *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Franco et al., 2000; Franco et al., 2002).

A atividade amilásica da fração solúvel de *P. nucleorum* apresentou atividade ótima em torno de 50 °C. Em 60 °C observou-se uma inibição de 40 % e

em 70 °C a atividade é totalmente inibida. Amilases de *Z. subfaciatus* também foram inibidas em aproximadamente 85 % a 60 °C, mas tal atividade foi reestabelecida após a adição de NaCl 20 mM ou CaCl₂ 1,0 mM (Lemos et al., 1990). Amilases de *C. maculatus*, também, são inativadas em torno de 60 °C (Silva et al., 1999).

O aumento de atividade amilásica de S1 na presença de 0,5 mM de cálcio (fig. 13) pode estar relacionado à estrutura funcional da família das α-amilase (Janecek, 1997; MacGregor et al.,2001). A ligação entre os domínios A e B de amilases, região altamente conservada, possui sítio de ligação de cátions cálcio, que atuam estabilizando a estrutura enzimática, mantendo esta região mais flexível e estável (Janecek, 1997; Machius et al.,1995; Machius et al.,1998). Em 2 mM de cálcio (fig. 13), a leve inibição da atividade pode estar relacionada a outros sítios de ligação do cálcio na enzima que possuem menor sensibilidade, como no caso da Taka-amilase que apresenta um segundo sítio abaixo da região de ligação do substrato, e que é responsável pela inibição da enzima em altas concentrações de cálcio (Janecek, 1997). Amilases de leveduras e bactérias, também, foram inibidas por concentrações de cálcio da ordem de milimolar (Wanderley et al.,2004; Demirkan et al.,2005).

O sódio na concentração de 14 mM causou um aumento de atividade amilásica de 45 % (fig. 15) podendo estar relacionado à presença de íons nos sítios ativos de amilases como *Bacillus licheniformis*, que possui uma tríade composta de cálcio–sódio–cálcio promovendo um maior espaço ao sítio de ligação do substrato e causando maior estabilidade das cargas negativas das cadeias laterais de resíduos Asp, Glu e Asp (Machius et al.,1995; Machius et al.,1998). Ou ainda como observado por Nonaka (2003), a presença de sódio no lugar do cálcio, nos sítios altamente conservados das α-amilase, também responsável pela estabilidade da estrutura.

Referências Bibliográficas

Bezerra, J.A., 1999. Babaçu: as guerreiras do Mearin/mulheres de fibra. Rev. Globo Rural. 14, 38-45.

BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). Comp. Biochem. Physiol. 92B, 51-57.

Caraway, W.T., 1959. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. Am. J. Clin. Path. 29, 91-93.

Carvalho, R.P.L., Rosseto, C.J., 1968. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera Bruchidae). Rev. Brasileira Entom. 13, 109-117.

Connerty, H.V., Briggs, A.R., 1966. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. The Am. J. Clin. Path. 45, 290-296.

Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., Utsumi, S., 2005. α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. Process Biochem. 40, 2629-2636.

Ernst, W.H.O., 1993. Food consumption, life history and determinants of host range in the bruchid beetle *Specularius impressithorax* (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 29, 53-62.

Friedmann, T., Epstein, C. J., 1967. The role of calcium in the reactivation of reduced Taka-amylase. *J. Biol. Chem.* 242, 5131-5140.

Yamada, T., Hattori, K., Ishimoto, M., 2001. Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seeds of therapy bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry*. 58, 59-66.

Janecek, S., 1997. α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 67, 67-97.

Janzen, D.H., 1971. Seed predation by animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2, 465-492.

Laemmli, U. K., 1973. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophago T4. *Nature*. 227, 680-685.

Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56, 219-227.

Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochem. Biophys. Acta.* 1571, 83-88.

Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., 1995. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 246, 545-559.

Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G., 1998. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder \rightarrow order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*. 6, 281-292.

Marshall, J.J., Lauda, C.M., 1975. Purification and properties of Phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. The J. Biol. Chemis. 250 (20), 8030-8037.

May, P.H., Anderson, A.B., Balick, M.J. Frazão, J.M.F., 1985a. Subsistence benefits from the babassu Palm (*Orbignya maritana*). Econ. Bot. 39, 113-129.

May, P.H., Anderson, A.B., Frazão, J.M.F., Balick, M.J., 1985b. Babassu palm in the agroforestry systems in Brazil's Mid-North region. Agroforest. Syst. 3, 275-295.

Meik, J., Dobie, P., 1986. The ability of *Zabrotes subasciatus* to attack cowpeas. Entomol. Exp. Appl. 42, 151-158.

Moraes, M.O., Fonteles, M.C., Moraes, M.E.A., 1997. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. Fitoterapia. 68, 235-239.

Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Hagihara, H., Ozaki, K., Ito, S., Miki, K., 2003. Crystal structure of calcium-free α -Amylase from *Bacillus sp.* Strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. The J. Biological Chem. 278, 24818-24824.

Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F., 2005. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp.* KR-8104. Enzyme Microbial Technol. 36, 666-671.

Santos, G.B., Marques, M.I., Adis, J., de Muis, C.R., 2003. Artrópodos associados à copa de *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), na região do Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. Rev. Brasileira de Entomologia. 47, 211-224.

Silva, B.P., Parente, J.P., 2001. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*. 72, 887-893.

Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., de Sá, M.F.G., Lopes, A.R., Pontes, E.G., 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 355-366.

Silva, C.P., Terra, W.R., de Sá, M.F.G., Samuels, R.I., Isejima, E.M., Bifano, T.D., Almeida, J.S., 2001. Induction of digestive α -amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. *J. Insect Physiol.* 47, 1283-1290.

STUDIER, F. W., 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79, 237-248. .

Terra, W.R., Cristofolletti, P.T., 1996. Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113b, 725-730.

Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J., 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Letters.* 231, 165-169.

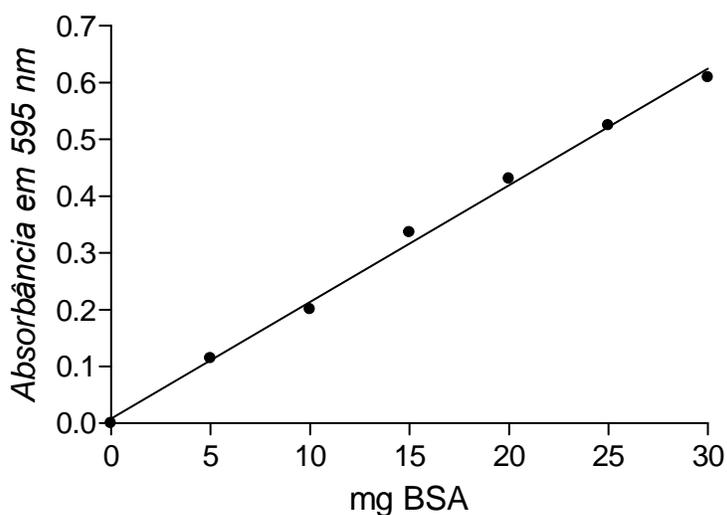
- CONCLUSÃO GERAL -

Neste trabalho foi mostrado a presença de atividade amilásica em intestino de larva de *Pachymerus nucleorum* e atividade ATPásica no restante da larva. A atividade ATPásica é maior na presença de magnésio em relação a outros íons como cálcio e cobalto. A atividade amilásica apresenta temperatura ótima de 50 °C e é estimulada por cloreto de sódio e cálcio em baixas concentrações, mas inibida por cálcio em concentrações maiores.

- ANEXO -

Anexo 1: Método de Dosagem de Proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976). 20 μL das frações obtidas foram adicionados a 80 μL de H_2O Milli-Q em tubos de vidro. A cada tubo foram adicionados 3 mL de solução de Bradford (Coomassie Blue G-250 0,001 % em etanol 4,7 % e ácido fosfórico 8,5 %). As reações foram realizadas em duplicatas. A absorbância foi medida em 595 nm. Paralelamente à dosagem protéica das frações, uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada. A curva apresentou-se linear entre 0 e 30 μg de BSA (Figura 1).



$$y = 0,0206x + 0,0083$$
$$R^2 = 0,9966$$

Figura 1: Exemplo de uma curva padrão de BSA, no intervalo linear do método, com equação e coeficiente de linearidade.

Anexo 2: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações protéicas foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema tampão descontínuo de Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas empregado por Studier (1973).

Os mini-géis foram preparados em concentração fixa de 5 % de acrilamida (gel de empilhamento), seguido por gel gradiente 5-22 % ou 10 % (gel de separação). Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 8 x 0,075 cm.

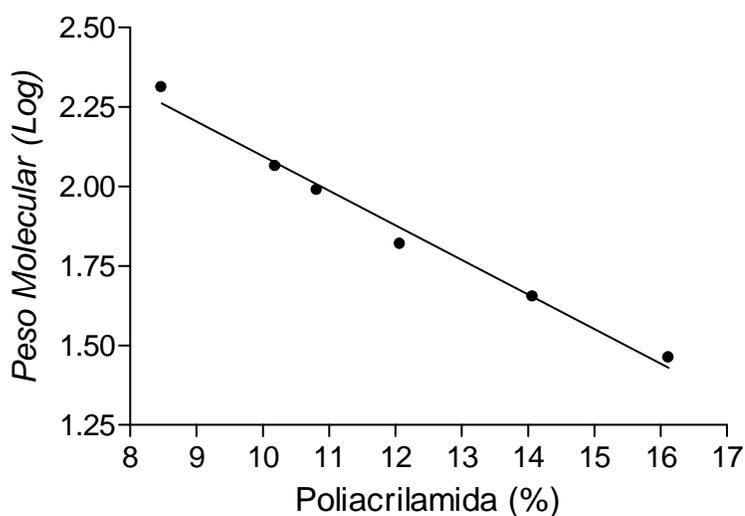
As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 μ L da respectiva fração a 10 μ L de tampão de amostra (Tris 18,7 mM pH 6,8 contendo β -mercaptoetanol 2,8 mM, SDS 0,6 %, EDTA 0,6 mM, Glicerol 2,76 %, Bromofenol 0,05 g). Antes de aplicar as amostras no gel, estas foram colocadas em H₂O em ebulição por 2 minutos. Utilizando microseringa de vidro Hamilton[®], as amostras foram aplicadas no gel, devidamente montado em cuba Hoefer[®] SE 250, *Amersham Biosciences, USA*.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,3, EDTA 2 mM, Glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 25 mA utilizando fonte Bio-Rad Power Pac 1000. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant blue-R 0,25 % em metanol 50 % e ácido acético 10 % e descorados em solução de metanol 30 % e ácido acético 10 %.

O padrão SDS-6H (cadeia pesada de miosina 205 kDa, β -galactosidase 116 kDa, fosforilase-b 97 kDa, albumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa), foi utilizado como referência de mobilidade relativa.

Anexo 3: Determinação do peso molecular de polipeptídios

A estimativa do peso molecular dos polipeptídios de interesse foi feita utilizando uma curva de calibração, obtida plotando a porcentagem de poliacrilamida do gel um polipeptídeo do padrão contra o logaritmo do peso molecular do respectivo polipeptídeo, figura 2, (Bollag, D.M. Edelstein, S.J. 1991. Protein Methods. Wiley-Liss). A mobilidade relativa do polipeptídeo de interesse é calculada determinando a porcentagem de poliacrilamida correspondente à sua migração e plotando esse valor na curva acima. Para o sistema usado, cada centímetro migrado no gel corresponde um acréscimo na concentração de poliacrilamida de 2,42 %. Esse valor é encontrado dividindo a diferença entre a porcentagem de poliacrilamida no final do gel (22%) e a porcentagem de poliacrilamida no início do gel (5%) pelo comprimento do gel (7 cm). É importante lembrar que este tipo de cálculo não é 100% confiável, pois alguns polipeptídios migram de forma anômala.



$$y = -0,1089x + 3,1858$$
$$R^2 = 0,9856$$

Figura 2: Exemplo de curva padrão da porcentagem de poliacrilamida correspondente ao log do polipeptídeo do padrão de peso molecular, com equação e coeficiente de linearidade.

Anexo 4: Determinação da Atividade Adenosina Trifosfatásica

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de Heinonen e Lahti, 1981.

A cada tubo de ensaio foram adicionados 40 μ L do meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM) contendo os cátions indicado em 2 mM concentração final.

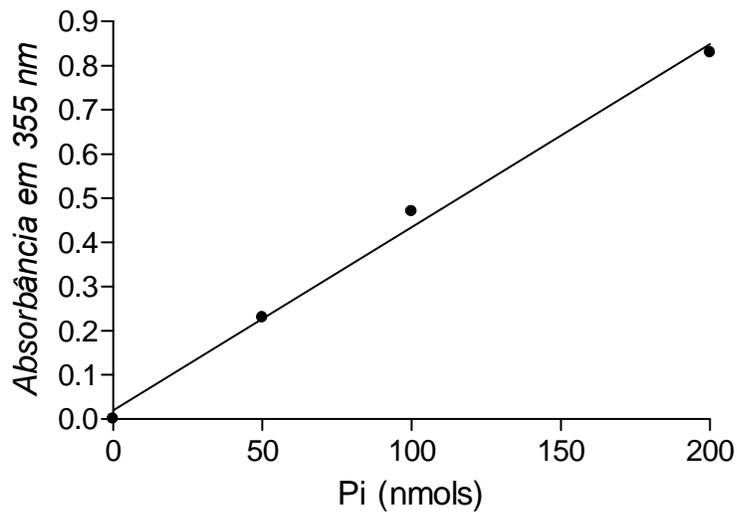
Volumes pré-determinados das frações protéicas foram adicionados aos tubos e o volume final de 200 μ L foi completado com adição de água Milli-Q.

A reação foi iniciada com adição de substrato, seguida da incubação a 37 °C durante 30 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida com adição de 2 mL de solução de dosagem AAM (acetona 100 %, molibdato de amônio 10 mM e ácido sulfúrico 5 N numa proporção de 2: 1: 1, respectivamente) e submetida à agitação. Após 15 segundos, 200 μ L de ácido cítrico 1 M foram adicionados mantendo-se a agitação por mais 10 segundos. Foram preparadas reações controle para cada amostra, nas quais a incubação se procedeu sem a adição de substrato, o qual foi adicionado imediatamente antes de interromper a reação com solução de dosagem.

As reações foram realizadas em duplicata e a absorbância medida em 355 nm. Paralelamente foi feito uma curva padrão de ortofosfato inorgânico, entre 0 e 200 nmols de ortofosfato (Figura 3).

Determinação da atividade específica das frações

A atividade específica foi calculada a partir do número de nmols de Pi por mg de proteína por unidade de tempo. Sendo a atividade total para cada amostra o produto de sua atividade específica pela quantidade de proteína total da amostra.



$$y = 0,0041x + 0,02$$

$$R^2 = 0,9946$$

Figura 3: Exemplo de uma curva padrão usado para determinar a concentração de fosfato, com equação e coeficiente de linearidade.

Anexo 5: Determinação da Atividade amilásica

A atividade amilásica foi dosada pelo método de Caraway (1959) usando o kit de amilase da LABTEST. Uma alíquota da fração foi adicionada a 500 µL de substrato (amido a 0,4g/mL) e foi deixado em incubação por 7,5 minutos à temperatura de 37°C. Após a reação, acrescentou 500 µL de reagente de cor (Iodato de potássio 16,7 mM, Iodeto de potássio 271 mM e ácido clorídrico 112 mM) e 4 mL de água milli-Q, lendo a absorbância a 660 nm após 5 minutos. A cor é estável por 30 minutos. Adotou-se como unidade (U) a quantidade de enzima que cliva 10 mg de amido em 30 minutos a 37 ° C.

Os cálculos de atividade amilásica baseiam:

$$\text{Amido hidrolisado} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. da amostra})}{\text{Abs. controle}} \times [] \text{ de amido}$$

Anexo 6: Zimograma

Os mini-géis foram preparados em concentração de 10 % (gel de separação), usando mini-géis 10 x 8 x 0,075 cm. As amostras protéicas foram preparadas adicionando-se 90 µL da respectiva fração a 10 µL de tampão de amostra (Tris 6,5 mM pH 6,8 contendo Glicerol 1 %, SDS 2 %, Bromofenol 1 %), observando a ausência de aquecimento e β-mercaptoetanol. A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida sob voltagem constante de 150 V utilizando fonte Bio-Rad Power Pac 1000.

Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de Triton X-100 a 2,5 % (w/v) por 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente, transferida para uma solução de tampão fosfato pH 7,0 contendo amido solúvel a 1 % (w/v) e incubada a 37 ° C por 24 horas. A atividade amilolítica foi parada com adição de solução corante (iodo metálico 1,3 % e iodeto de potássio 3 %). Após a reação, as bandas claras contra o fundo escuro indicam a presença de amilase ativa.

Anexo 7: Dosagem de cálcio

Em um tubo de ensaio acrescentou-se 1 mL de tampão 2-amino-2-metil-1-propanol 3,5 mM, 1 mL de reagente de cor e 20 µL de amostra, homogenizou-se e a leitura da absorbância foi feita a 578 nm, acertou-se o zero com o branco. No branco não foi adicionado amostra. A cor é estável por 30 minutos. Em paralelo realizou idêntico procedimento, acrescentando no lugar da amostra, 20 µL de padrão de cálcio (10 mg/dL).

Cálculo:

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 10$$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)