



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

**Purificação e caracterização parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: *Chrysomelidae*: *Bruchinae*) e modulação fitoterápica de sua atividade**

Aluna: Juliana Luzia França

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA – MG  
2009

# **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

**Purificação e caracterização parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: *Chrysomelidae*: *Bruchinae*) e modulação fitoterápica de sua atividade**

Aluna: Juliana Luzia França

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

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

UBERLÂNDIA – MG  
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- F814p França, Juliana Luzia, 1983-  
Purificação e caracterização parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus*  
(Coleóptera : Chrysomelidae: Bruchinae) e modulação fitoterápica de sua atividade /  
Juliana Luzia França. - 2009.  
72 f. : il.
- Orientador: Milton Vieira Coelho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.
1. Enzimas - Teses. I. Coelho, Milton Vieira. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.15



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

**Purificação e caracterização parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: *Chrysomelidae*: *Bruchinae*) e modulação fitoterápica de sua atividade**

Aluna: Juliana Luzia França

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho (Orientador)  
Examinadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Amélia Hamaguchi  
Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

Data da defesa: 15.04.09

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

---

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA – MG

***“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas do que parecia impossível.”***

**Charlie Chaplin**

*Dedico aos meus pais, Antônio Gama e Nilda, pelo incentivo, apoio e amor, e deixo, aqui, minha gratidão por tudo que sempre fizeram por mim.*

*Aos meus irmãos, que sempre me apoiaram em tudo, comemorando cada vitória e me incentivando a seguir em frente sempre que surgia alguma dificuldade.*

*Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, minha eterna gratidão pela oportunidade, confiança e paciência.*

## Agradecimentos

Agradeço a Deus, luz sempre presente na minha vida.

Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, por se dedicarem à qualidade do ensino e da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Milton, pela orientação e paciência. Obrigada pela oportunidade de cursar um mestrado de qualidade e por ter dedicado a mim muito de seu conhecimento.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em Genética e Bioquímica, Prof. Dr. Mario Antonio Spanó, por ter sido prestativo em todos os momentos que precisei.

Ao secretário Gerson, pelas informações fornecidas durante todo o curso.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amélia Hamaguchi, pela gentileza de me apresentar ao Prof. Dr. Milton.

À Dona Maura, pela amizade e pelo empenho em manter a ordem do laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro, e à Universidade Federal de Uberlândia, que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos amigos do mestrado, Isabel, Rita, Thaise, Mariana e Boscolli, pela amizade, companheirismo e momentos de alegria compartilhados.

Aos colegas de laboratório, pelos conhecimentos transferidos. Agradeço, em especial, a Anelise, pela amizade, companheirismo, dedicação e contribuição nos experimentos.

À Bióloga Mestre Valéria Conde Correa do Laboratório "Natuoterapia Sinhô Mariano" - Araxá-MG, pela doação das plantas e identificação de *Chenopodium ambrosioides* e *Rosmarinus officinalis* e à Professora Doutora Maryland Sanchez, curadora do Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso, pela identificação das plantas *Eucalyptus citriodora*, *Ruta graveolens* e *Piper nigrum*.

Aos meus pais, que se dedicaram para garantir a formação pessoal e profissional dos filhos, obrigada por terem lutado tanto para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Fernando, Eduardo e Aline, pelo exemplo dado, pela ajuda em todos os momentos e por serem meus anjos da guarda. E aos meus sobrinhos, Lucas, Danielle, Emanuelle e Larissa, que sempre alegraram meus dias.

Aos meus cunhados, Helvécio e Adenilda, que não mediram esforços para me ajudar em tudo que precisei, e à Karla, que mesmo distante, sempre torceu pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Thiago, que, apesar de estar presente há pouco tempo na minha vida, foi muito importante nessa etapa final do meu mestrado, obrigada pelo apoio e compreensão.

Aos meus familiares e amigos, por estarem sempre ao meu lado e pelo entusiasmo com minhas conquistas.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DE:**



**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL  
SUPERIOR**



**UFU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

## Sumário

<b>Introdução Geral</b> .....	1
1. Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	1
2. Pragas de grãos armazenados.....	2
2.1 – <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	4
2.2 – Controle de Pragas de grãos armazenados.....	5
3. ATPases.....	7
4. Referências Bibliográficas.....	19
<b>Capítulo Único</b> .....	35
1. Resumo.....	36
2. Abstract.....	37
3. Introdução.....	38
4. Material e Métodos.....	39
4.1 – Reagentes.....	39
4.2 – Preparação da fração ATPase.....	39
4.3 – Análise da purificação.....	40
4.4 – Atividade ATPase.....	40
4.5 – Dosagem de proteínas.....	41
4.6 – Preparação dos extratos aquosos.....	41
4.7 – Análises estatísticas.....	42
5. Resultados.....	43
6. Discussão.....	50
7. Conclusão.....	54
8. Referências Bibliográficas.....	55

## Lista de Figuras e Tabelas

### Introdução Geral

Figura 1: Exemplar do feijão infestado por *Zabrotes subfasciatus*.

Figura 2. Representação dos principais motores moleculares.

### Capítulo Único

Figura 1: SDS-PAGE do fracionamento de larvas de *Zabrotes subfasciatus*.

Tabela 1: Purificação parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* pela precipitação com sulfato de amônio.

Figura 2: SDS-PAGE do fracionamento de S4 em coluna de Q-Sepharose - eluição NaCl 200mM.

Figura 3a: Atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase das frações.

Figura 3b: SDS-PAGE do fracionamento de S4 em coluna de Q-Sepharose.

Tabela 2: Purificação parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* pela fracionamento em coluna de Q-sepharose.

Figura 4. Atividade  $\text{K}^+/\text{EDTA}$  -ATPase.

Figura 5. Atividade ATPase específica em presença de diferentes cátions

Figura 6. Especificidade de substrato da fração ATPase.

Figura 7. Efeito de inibidores na atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.

Figura 8. Efeito de plantas com potencial inseticida na atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.

## Lista de Abreviaturas

**ADP** – Adenosina 5'-difosfato

**AEBSF** - 4-(2-Amino etil) benzeno sulfonil fluorido hidrocloreto)

**ATP** – Adenosina 5'-trifosfato

**ATPase** – Adenosina trifosfatase

**BSA** – Soroalbumina bovina

**DTT** – Ditioneitol

**E-64** - N-(trans-Epoxysuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**EGTA** – Etileno glico-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) N,N,N',N'-ácido tetracético

**GTP** – Guanosina 5'-trifosfato

**kDa** – Quilodalton

**Pi** – Ortofosfato inorgânico

**PPi** – Pirofosfato inorgânico

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio (Lauril sulfato de sódio)

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

# Fundamentação teórica

O *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) é uma espécie de caruncho que infesta grãos armazenados, principalmente o feijão (*Phaseolus vulgaris*), gerando grandes prejuízos para a economia brasileira. Pouco se sabe sobre as características bioquímicas implicadas na fisiologia desse caruncho. Por isso, é de grande importância estudar o controle desta praga (Ferreira, 1960; Lagarda-Diaz, 2009).

As ATPases, enzimas que hidrolisam o ATP liberando energia para realizar algum tipo de trabalho celular, são importantes alvos de inseticidas, o que justifica o interesse em estudá-las (Ping et al., 2004). Diversos critérios podem ser usados para a identificação de uma ATPase, como por exemplo, a caracterização enzimática. Dentre as ATPases, destacam-se as miosinas, motores moleculares que utilizam a energia liberada pela quebra do ATP para produção de movimentos intracelulares e musculares. Alterações da atividade dessas enzimas levam ao mau funcionamento do organismo (Vale & Milligan, 2000).

## 1. Feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma das leguminosas mais nutritivas e de baixo custo disponível em todo território nacional. No passado, sua produção no Brasil era caracterizada por cultivos em pequenas áreas, com pouca tecnologia e voltada, principalmente, para subsistência. No entanto, a cultura do feijão tem passado por profundas transformações nos últimos anos (Kluthcousk et. al., 2007).

O consumo dessa leguminosa apresenta algumas vantagens nutricionais e terapêuticas. Quanto ao aspecto nutricional, possui elementos essenciais, como proteínas, ferro, cálcio, vitaminas, carboidratos e fibras. Todos estes nutrientes aparecem em quantias significativas, a ponto de suprir deficiências alimentares de produtos de origem animal. Quanto ao aspecto terapêutico, apresenta efeito protetor contra carcinogênese de cólon, anemia e osteoporose (Meira, 1996; Bobe et. al., 2008).

Dentre os problemas relacionados à cultura do feijoeiro, destaca-se a infestação por insetos-praga que, além de atacarem em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura no campo, também danificam os grãos armazenados (Mazzonetto & Vendramim, 2003).

## **2. Pragas de grãos armazenados**

Os carunchos pertencentes à ordem coleóptera – família *Chrysomelidae* e subfamília *Bruchinae* – são pragas que atacam os grãos armazenados, formando um grupo com mais de 1700 espécies reconhecidas, alocadas em cerca de 60 gêneros (Lara, 1992; Johnson & Romero, 2004). No entanto, esse número pode ser ainda maior, pois Silva (2005) prevê a descrição de 1300 espécies somente no Novo Mundo, onde atualmente são conhecidas cerca de 750 espécies.

Essas pragas apresentam corpo ovalado, cabeça livre, antenas com 11 segmentos e élitros estriados. A reprodução é, em geral, sexuada, podendo ocorrer partenogênese em algumas espécies. A maioria é ovípara, sendo que a postura geralmente ocorre no substrato de que se alimentam ou vivem. Os ovos são alongados e lisos, colocados isoladamente ou em grupos (Lara, 1992).

O estudo da biologia de coleópteros é importante, pois algumas famílias apresentam relevância na economia. Além disso, permite compreender o comportamento e a importância ecológica desses insetos (Teixeira & Zucoloto, 2003).

Os carunchos podem causar danos diretos quando atacam o produto a ser comercializado, ou indiretos, quando atacam estruturas vegetais responsáveis pelos processos fisiológicos. Eles também podem transmitir patógenos, especialmente vírus, facilitando a proliferação de bactérias e o desenvolvimento de fungos ou injetando substâncias com potencial tóxico durante o processo alimentar (Gallo et. al. 2002).

Kleine-Tebbe e colaboradores (1992), em um estudo com trabalhadores de silos infestados por carunchos, mostraram que estes podem causar danos ao homem, desencadeando alergias respiratórias, como rinite e asma.

As pragas afetam tanto a quantidade como a qualidade dos produtos armazenados. Os danos quantitativos caracterizam-se pela perda de peso

provocada pelas galerias abertas nos grãos para alimentação; os qualitativos, pela diminuição do valor nutritivo dos grãos infestados e do grau de higiene do produto devido à presença de insetos, excremento e ovos (Gallo et. al. 2002).

Os principais fatores do meio ambiente que influenciam na distribuição e na abundância desses insetos são: tempo, radiação, temperatura, umidade, luz, vento e alimento, assim como suas interações. Dentre esses, a temperatura é de grande importância na regulação das atividades dos insetos. Abaixo de 15°C, os insetos entram em hibernação temporária até uma temperatura de 0°C. E no intervalo de 48°C a 52°C, entram em estivação permanente (Baldin & Lara, 2004).

Segundo Panizzi (1991), as pragas dos produtos armazenados apresentam algumas características próprias que explicam a facilidade de infestação e proliferação. Um primeiro fator é o elevado potencial biótico, que constitui uma alta capacidade de reprodução permitindo a formação de uma grande população em um curto período de tempo. Outro fator é a infestação cruzada, ou seja, os carunchos infestam o produto nos depósitos e no campo. O último fator a ser considerado é a polifagia – capacidade de infestar diversos produtos, permitindo a sobrevivência da praga mesmo na ausência do grão preferido.

Em termos mundiais, os prejuízos gerados por pragas e doenças são bastante elevados e, juntamente com plantas daninhas, chegam a causar perdas de 38% na produção. Levantamentos realizados no Brasil mostraram que as pragas já foram responsáveis por prejuízos de 2,2 bilhões de dólares nas principais culturas brasileiras (Bento, 1999).

Nesse contexto, estudar as pragas que acometem produtos armazenados é relevante, uma vez que se estes forem infestados e destruídos nos depósitos, perde-se a funcionalidade dos cuidados e todo o investimento feito no controle de pragas no campo (Panizzi, 1991). Segundo dados da Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), estima-se que as perdas cheguem a 10% da produção total, sendo que, no Brasil, elas estão em torno de 20%, pois as condições de armazenamento no meio rural são precárias (Bento, 1999).

## 2.1 *Zabrotes subfasciatus*

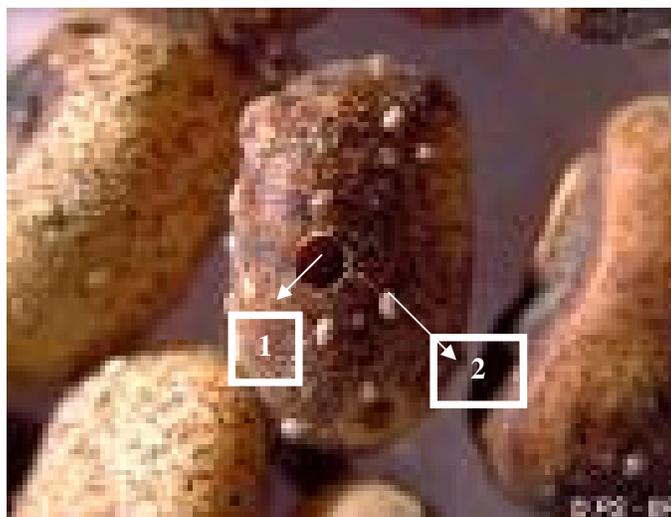
De acordo com Silva (2005), seis espécies de bruquíneos tornaram-se cosmopolitas devido ao comércio internacional e adquiriram importância econômica em todo o mundo. Atualmente, no Brasil, a espécie *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) se destaca como a principal praga do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Lagarda-Diaz et. al., 2009).

Esta espécie representa o menor bruquíneo infestante de grãos armazenados, com comprimento que varia de 5 a 10 mm e diâmetro, de 3 a 5 mm. Ocorre em todas as regiões onde são armazenados feijões e outras leguminosas, desde que não haja fatores climáticos limitantes (Ferreira, 1960; Lagarda-Diaz, 2009).

O dimorfismo sexual é evidente em *Z. subfasciatus*. A fêmea pesa de 1,5 a 2,0 vezes mais que o macho (Howe & Currie, 1964). O tempo de vida médio do adulto em condições laboratoriais é de 13,8 dias para o macho e 10,9 dias para a fêmea. O tempo médio para o desenvolvimento completo, do ovo até a emergência do adulto, é de 26 dias (Carvalho & Rosseto, 1968).

A fêmea deposita seus ovos diretamente nas sementes, após a deiscência das vagens ou ainda dentro das mesmas, utilizando-se de perfurações realizadas por outros insetos (Credland & Dendy, 1992). Ao contrário da maioria dos bruquíneos, as fêmeas necessitam do contato com a semente para estimular a ovogênese (Pimbert, 1985).

Os ovos de *Z. subfasciatus* são arredondados e depositados nas superfícies dos grãos de *P. vulgaris* (Carvalho & Rosseto, 1968). Eles são protegidos por uma substância excretada na hora da postura, o que o fixa firmemente ao feijão. Aparentemente, são vulneráveis a danos físicos, mas isto pode ser insignificante, uma vez que as larvas eclodem muito rapidamente (Southgate, 1979). Após a eclosão, essas penetram diretamente no grão (Carvalho & Rosseto, 1968), onde se desenvolvem, formam pupas e, após o desenvolvimento completo, formam um orifício na superfície do grão por onde ocorre a saída do adulto (Southgate, 1979) (Figura 1).



**Figura 1: Exemplar do feijão infestado por *Zabrotes subfasciatus*.** 1. Orifício feito pelo caruncho adulto para sair do grão. 2. Ovos depositados na superfície dos grãos de feijão.

Controlar a infestação por *Zabrotes subfasciatus* é muito importante economicamente, pois atacam grãos armazenados, livros e cabos de chumbo de linhas telefônicas (Lara, 1992).

## 2.2 Controle de pragas de grãos armazenados

Os praguicidas são tradicionalmente utilizados para prevenção e controle de pragas. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), praguicidas são produtos químicos destinados a combater pragas que causam prejuízo ou interferem na produção, na elaboração, na armazenagem, no transporte ou na comercialização de alimentos, de produtos agrícolas e de madeira; e também podem ser administrados em animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas (Oga, 2003).

Definição semelhante à da FAO é usada na legislação brasileira para agrotóxico, que substitui o termo defensivo agrícola para denominar os venenos agrícolas, colocando em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana. Existem diferentes classes de praguicidas baseadas nos padrões de uso e no tipo de praga a ser controlada. São elas: inseticidas, herbicidas, fungicidas e raticidas (Oga, 2003).

Oga (2003) relatou que, no Brasil, as intoxicações agudas por praguicidas ocupam a terceira posição dentre os agentes causais de tentativas de suicídio e acidentes, sendo a maioria dos casos por inseticidas (73% de organofosforados, piretróides, carbamatos e organoclorados), raticidas (15,3%) e herbicidas (9,7%).

Na época da introdução desses inseticidas sintéticos, não houve nenhum interesse em se estudar a biologia, a ecologia e o comportamento dos insetos. Vinte anos depois, das 204 espécies de pragas conhecidas, 137 já apresentavam algum tipo de resistência. Os diferentes tipos de resistência (comportamental, bioquímica e genética) levaram a grandes investimentos na pesquisa de novos inseticidas e a reiniciar os estudos entomológicos das espécies de importância sanitária e agrícola (Neves, 2003).

O aumento no conhecimento dos prejuízos advindos do uso indiscriminado desses produtos e a preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos têm incentivado estudos relacionados a novas técnicas de controle de pragas (Tavares & Vendramim, 2005).

Entre as principais alternativas a esses produtos convencionais, destaca-se o uso de inseticidas botânicos. Pesquisas com plantas visam, geralmente, obter inseticidas naturais para o controle de pragas (Sousa et. al., 2005).

O Brasil tem uma importante contribuição devido à sua enorme biodiversidade. O país apresenta uma das maiores diversidades genéticas vegetais do mundo, de 350 mil a 550 mil espécies nativas conhecidas, 55 mil apresentam atividade biológica (Nodari & Guerra 1999).

Alguns compostos com ação inseticida foram encontrados em inúmeras plantas, sendo eles: alcalóides, aminoácidos não-protéicos, esteróides, fenóis, flavonóides, glicosídeos, glucosinolatos, quinonas, taninos e terpenos (Lagunes et. al., 1984; Grainge & Ahmed, 1988; Coats, 1994).

Kéita e colaboradores (2001) referenciaram estudos com extratos de origem vegetal e seus efeitos sobre diversas espécies de insetos-praga de sementes e grãos armazenados. Para o controle de carunchos (Coleóptera: Bruchinae), é conhecido o efeito inseticida de *Eucalyptus citriodora*, *Ruta graveolens* (Mazzonetto & Vendramim, 2003), *Piper nigrum L.*, *Chenopodium ambrosioides* (Carvalho, 2008) e *Rosmarinus officinalis* (Guerra et. al., 2009).

Os extratos de origem vegetal podem atuar diretamente na inibição da atividade das ATPases, enzimas que desempenham importantes funções celulares responsáveis pela manutenção e desenvolvimento da vida (Ping et. al., 2004).

### **3. ATPases**

As ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP, liberando ADP e Pi. A energia liberada nesse processo é utilizada para realizar algum tipo de atividade celular. Em geral, requerem cátions bivalentes para sua atividade hidrolítica, sendo que os principais utilizados são o cálcio e o magnésio, para as atividades  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Vale, 1999).

Algumas ATPases são proteínas integrais de membrana (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Carafoli, 1997), enquanto outras se encontram no citoplasma (Sablin, 2000; Krendel & Mooseker, 2005).

Dentre as ATPases de membrana, destacam-se as do tipo P, F, e V (Pedersen, 2002). As  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases representam o tipo P e são responsáveis pelo bombeamento de cátions através de membranas celulares (Moller et. al., 1996).

As  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, ou bombas de cálcio, estão presentes na membrana plasmática, nos retículos endoplasmático e sarcoplasmático, no complexo de Golgi e no envelope nuclear. Essas bombas impulsionam o cálcio para os espaços extracelulares ou para o lúmen dos retículos, mantendo a homeostase dos níveis de cálcio (Caroni & Carafoli, 1981; Carafoli, 2003).

As  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de membrana são formadas por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 134kDa, com domínio de ligação à calmodulina na extremidade C-terminal. Já as presentes no retículo endoplasmático e sarcoplasmático, têm cerca de 100 kDa (Carafoli, 1997). Esta ATPase foi purificada por MacLennan (1970) e sua estrutura cristalizada foi definida com o  $\text{Ca}^{2+}$  ligado (Toyoshima et. al., 2000) e livre de cálcio (Toyoshima & Nomura, 2002). Essas enzimas são fortemente inibidas, estequiometricamente e irreversivelmente, por taspigargina, um sesquiterpeno natural promotor de tumores pertencente à família das lactonas (Ley et. al, 2004).

As Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases são responsáveis pelo transporte de sódio e potássio através da membrana plasmática (Woo et. al., 1999). A energia para realização desse trabalho é obtida a partir da hidrólise do fosfato terminal da molécula de ATP, transportando três íons Na<sup>+</sup> para o meio extracelular e dois íons K<sup>+</sup> para o meio intracelular (Jorgensen et. al., 2003). Esse transporte estabelece um gradiente eletroquímico essencial para a manutenção dos potenciais de membrana responsáveis pelas atividades excitáveis de células musculares e nervosas, proporcionando, também, a regulação do volume e pH intracelulares e a captação de nutrientes extracelulares, como glicose, aminoácidos e vitaminas (Martin, 2005).

Essas enzimas são constituídas por uma subunidade  $\alpha$  de aproximadamente 113kDa e uma subunidade  $\beta$  de 35kDa. São inibidas por ouabaína e digitonina (Lingrel & Kuntzweiler, 1994).

As ATPases de membrana do tipo F (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP) são compostas de um mecanismo de dois sítios, um com subunidades hidrofóbicas embebido em membrana, F<sub>0</sub>, e um F<sub>1</sub> catalítico ligado a F<sub>0</sub> por uma haste (Weber & Senior, 1997; Bulygin, 2009). São também chamadas de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintase, pois realiza a síntese do ATP em condições fisiológicas, embora *in vitro* atue hidrolisando o ATP (Boyer, 1997; Weber & Senior, 1997).

A diminuição da atividade dessas ATPases podem causar uma variedade de desordens neuromusculares severas (Kucharczyk, 2009). A atividade delas é fortemente inibida por cloreto de alumínio 0,1 mM e fluoreto de sódio 5mM (Lunardi et. al., 1988) e, também, por azida 1mM (Murataliev et. al., 1991).

As ATPases tipo V ou V-ATPases, inicialmente encontradas em vacúolos, são compostas de várias subunidades com similaridades de seqüências com as ATPases tipo F (Nishi & Forgac, 2002). Essas enzimas compreendem dois complexos, V<sub>1</sub> – complexo catalítico e V<sub>0</sub> – ligado à membrana, por onde ocorre translocação de prótons (Forgac, 1992).

Os principais processos celulares envolvendo as V-ATPases são: endocitose, transporte intracelular, fusão de membranas, reabsorção óssea e balanço renal ácido/base (Pedersen, 2002). Essas ATPases foram estudadas no sistema excretor de insetos, bombeando prótons para o lúmen dos túbulos de Malpighi, mas seu papel ainda não foi bem estabelecido (O' Donnell et. al., 2003).

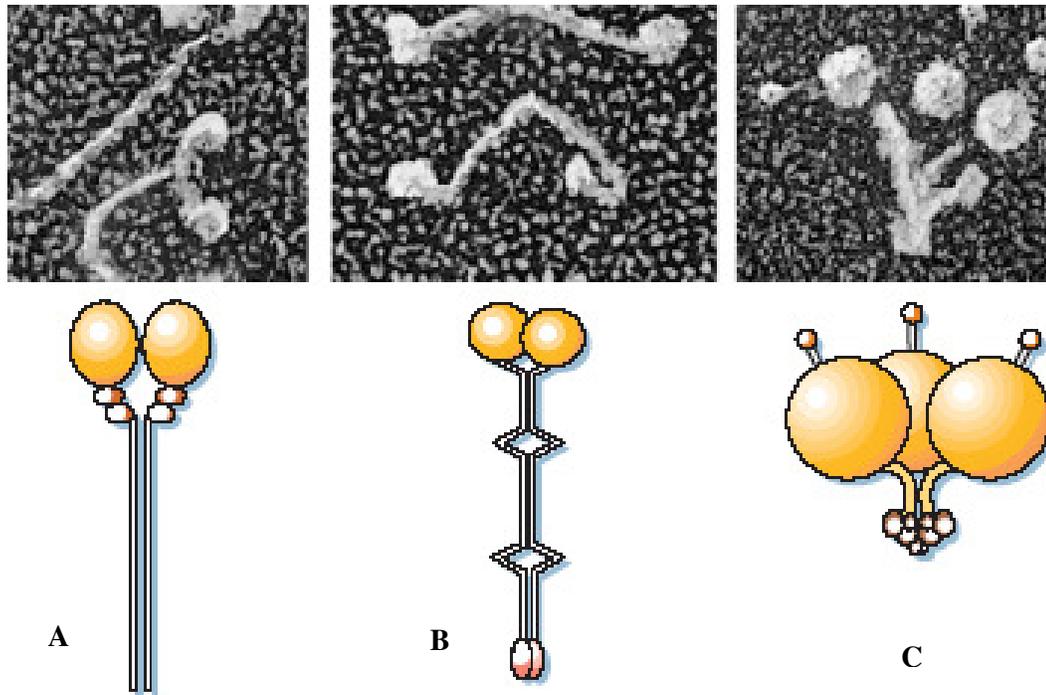
As ATPases solúveis incluem motores moleculares e algumas ecto-ATPases. As últimas podem ser divididas em ectonucleotídeo-difosfohidrolase (ecto-ATPDase ou apirase), que catalisam a conversão de nucleotídeos di e trifosfatos a monofosfato e fosfato inorgânico na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , e ectonucleotídeo-trifosfatase (ecto-ATPase), que catalisam apenas nucleotídeos trifosfato (Wink et. al., 2000). Ambas são inibidas por Triton X-100 e diferenciadas entre si pela inibição por azida, uma vez que apenas as ecto-ATPDases são inibidas por azida 10-20 mM (Plesner, 1995).

A purificação das ecto-ATPases é dificultada pela co-purificação com outras proteínas, assim como sua baixa concentração, falta de especificidade de substrato e cátions bivalentes, como também pela inibição de sua atividade enzimática por detergentes que normalmente solubilizam as proteínas ligadas à membrana (Plesner, 1995).

Segundo Komoszynski & Wojtczak (1996), ecto-ATPases estão relacionadas com neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea e permeabilidade de membranas celulares.

As principais famílias que constituem os motores moleculares correspondem às miosinas, cinesinas e dineínas, que são moléculas que têm domínio globular em uma extremidade seguido por uma haste (Figura 2). Esse domínio globular funciona como um domínio motor, que desliza usando a energia da hidrólise de ATP para produção de movimento (Hirokawa & Takemura, 2003). As interações eletrostáticas desempenham uma função vital neste mecanismo de ação, e as ferramentas físicas podem contribuir muito para seu entendimento (Miller et. al., 2009).

As miosinas realizam transporte ao longo de filamentos de F-actina e as dineínas e cinesinas se ligam a microtúbulos. Geralmente, transportam organelas, complexos de proteínas, ácidos nucléicos e outras estruturas presentes no interior da célula (Karcher et. al., 2002).



**Figura 2: Representação dos principais motores moleculares. (A)** Miosina II. **(B)** Cinesina. **(C)** Dineína. As ilustrações acima são micrografias eletrônicas de alta resolução. Os domínios motores estão em amarelo, proteínas associadas, em marrom, e os domínios espiralados estão representados por linhas pretas paralelas (extraído de Schiwa & Woehlke, 2003)

As cinesinas são as mais abundantes em diferentes tipos de células, sendo compostas por 144 domínios motores em 31 espécies. As cargas transportadas por elas incluem vesículas, organelas, fuso mitótico e cromossomos. O movimento das cinesinas pode ser realizado para ambas as extremidades dos microtúbulos (Kim & Endow, 2000).

As dineínas são divididas em dois grupos, axonemal e citoplasmática, com movimentação para a extremidade (-) de microtúbulos (Hirokawa, 1998). As dineínas axonemais estão relacionadas aos batimentos de cílios e flagelos. Já as citoplasmáticas estão envolvidas no transporte de vesículas do complexo de golgi para o retículo endoplasmático e na formação do fuso mitótico (Gibbons & Rowe, 1965; Karki & Holzbaur, 1999).

As miosinas são compostas de três domínios estruturais e funcionais: um domínio N-terminal globular (denominado cabeça ou domínio motor) que pode ligar-se à actina, hidrolizar o ATP e translocar-se ao longo de filamentos de actina;

um domínio regulatório, também denominado de pescoço, que se constitui de uma seqüência ligante de calmodulina e/ou cadeias leves, formando os motivos IQ, que variam de 0 a 6 nas diferentes classes de miosinas, e um domínio cauda C-terminal, que representa a parte mais diversa da cadeia pesada e é responsável pela função específica da miosina (Sellers, 2000; Graziane et. al., 2009).

Geralmente, a atividade  $Mg^{2+}$ -ATPase de miosinas é baixa na ausência de F-actina e é estimulada na sua presença (Conzelman & Mooseker, 1987). As miosinas caracterizam-se, basicamente, por apresentarem uma alta atividade na presença de KCl 600mM e ausência de cátions bivalentes, conhecida como atividade  $K^+$ /EDTA-ATPase (Pollard & Korn, 1973, Pollard, 1982). Outra propriedade de algumas miosinas é o estímulo pelo complexo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina (Espíndola et. al., 1992; Wolenski, 1995).

Baseadas na diferença da seqüência dos domínios motores, as miosinas são classificadas em 18 classes, cada qual com características próprias (Berg et. al., 2001). Mais recentemente, tem sido discutida uma nova classificação com 30 classes (Richards & Cavalier-Smith, 2005; Foth et. al., 2006).

A seguir, são descritas as características de algumas classes de miosinas.

## Miosinas I

As miosinas I são compostas por uma cadeia pesada com massa molecular de 110-140 kDa e 1-6 cadeias leves. Esta classe está dividida em quatro subgrupos que, além da variabilidade na seqüência dos domínios motores, difere na quantidade de motivos IQ, no comprimento e na organização dos domínios da cauda (Redowicz, 2007).

Elas participam do tráfego de membrana, da migração celular, na dinâmica do córtex da actina, das estruturas subplasmáticas da membrana (Barylko et. al., 2005) e na transcrição (Philimonenko et. al., 2004). Também apresentam um papel importante nos mecanismos de resposta imune inata para infecções bacterianas gram-negativa em *Drosophila melanogaster* (Hegan et. al., 2007).

Os membros da família da miosina I são expressos em protozoários, onde foi originalmente isolada, fungos e metazoários (Sellers 1999; Barylko et. al., 2005).

## Miosinas II

As moléculas de miosina II são um hexâmero formado por duas cadeias pesadas de miosina, com massa molecular de 171-244 kDa, enroladas em  $\alpha$ -hélice e quatro cadeias leves (Warrick & Spudich, 1987). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, conhecida como porção globosa da miosina, a qual apresenta sítio de ligação com actina e ATP. (Huxley, 1969; Lowey et. al., 1969; Silva & Carvalho, 2007).

Embora as miosinas musculares sejam um dímero, as duas cabeças parecem agir independentemente e apenas uma se liga à actina em um dado mometo. A estrutura delas revelou um grande centro ativo que liga à actina e um domínio adjacente ligante de cadeia leve (Rayment et. al., 1993; Vale & Milligan, 2000).

Foi a primeira miosina a ser descoberta, também chamada de miosina convencional. Elas apresentam função na contração muscular, gerada pelo deslizamento entre os filamentos de actina e miosina (Huxley & Hanson, 1954), como também na regulação da rotação ommatidial em *Drosophila melanogaster* (Fiehler & Wolff, 2007) e no movimento vesicular (Bhat & Thorn, 2009).

Além disso, há uma grande evidência de que as miosinas II desempenham um papel nos processos secretórios de uma variedade de células como, por exemplo, células “natural killer” (Andzelm et. al., 2007), neurônios sensoriais (Mochida et. al., 1994), exócrinas (Jerdeva et. al., 2005) e oocistos (Becker & Hart 1999).

Estudos também indicam que essas miosinas proporcionam uma força contrátil para expulsar o conteúdo das vesículas e são necessárias na abertura de seus poros (Segawa & Yamashina 1989, Yu & Bement 2007; Graziane et. al., 2009), pois sua inibição atrasa a abertura dos mesmos (Yu & Bement 2007, Neco et. al., 2008, Doreian et. al., 2008).

## Miosinas III e IV

As cadeias pesadas das miosinas III podem ocorrer como duas isoformas de 132 e 174 kDa. A porção amínica terminal das miosinas tipo III é peculiar e contém um domínio de proteína quinase que pode ser um componente importante do processo visual. Elas foram encontradas inicialmente em *Drosophila melanogaster* e apresentam função na fototransdução, inclusive na regulação da localização intracelular de calmodulina em fotorreceptores (Porter et. al., 1993; Cronin et. al., 2004).

As miosinas IV possuem uma cadeia pesada de 178kDa, consistindo em um domínio cabeça de 90kDa, um domínio pescoço com um único motif IQ e um grande domínio cauda de 87kDa (Mooseker & Cheney, 1995). São encontradas em muitos organismos, como ratos, humanos e insetos, (Kelleher et. al., 2000), sendo que em *Drosophila melanogaster*, apresentam função importante na espermatogênese (Rogat & Miller, 2002).

## Miosinas V

As miosinas V são dímeros compostos por duas cadeias pesadas de 190-220kDa. Cada cadeia contém quatro domínios principais (Langford, 2002): um domínio motor que consiste de um sítio ligante de actina e ATP; um pescoço que tem seis sítios de ligação (motifis IQ) para calmodulina e outras cadeias leves; uma região em hélice “coiled-coil” que é necessária para a dimerização das cadeias pesadas e uma cauda C-terminal composta de um domínio globular (Berg et al., 2001; Weisman, 2006).

Estudo recente mostrou que a cauda da miosina V causa a liberação de densos centros vesiculares do citoesqueleto de actina, permitindo um aumento da exocitose nas culturas dos neurônios do hipocampo. Sendo assim, sua participação na exocitose de peptídeos contidos em vesículas de células neuroendócrinas foi confirmada (Bittins et. al., 2009).

Elas apresentam também importância no tráfego através de membranas e na regulação da apoptose (Puthalakath et. al., 2001; Krendel & Mooseker, 2005),

como também participam do desenvolvimento larval e espermatogênese em *Drosophila melanogaster* (Mermall et. al., 2005).

Embora descrita sua participação por Bridgman (2004) na regulação do tráfego de organelas e proteínas associadas aos neurônios, Graziane e colaboradores (2009), demonstraram que bloquear a função da miosina Va com um anticorpo específico não afeta a regulação dos receptores de neurotransmissores, sugerindo a ausência do envolvimento da miosina V no tráfego dos mesmos.

Elas são encontradas na maioria dos eucariotos. Foram independentemente descobertas em fungos, a partir de estudos do gene *MYO2* (Johnston et. al., 1991), em camundongos, como produto do gene *dilute* (Mercer et. al., 1991), e em cérebro de vertebrados, como uma proteína ligante de calmodulina de 190-kDa (complexo p190-calmodulina) (Larson et. al., 1988; Espreafico et. al., 1992).

Essas miosinas são distintas da miosina II de cérebro por ser um substrato para fosforilação por proteína quinase II dependente de calmodulina e substrato para clivagem pela calpaina (Larson et. al., 1990; Espindola et. al., 1992; Coelho & Larson, 1993).

As miosinas V são expressas em baixos níveis em muitos tipos celulares. Entretanto, são particularmente abundante em neurônios, células neurosecretórias e melanócitos (Espíndola et. al., 1992). Em humanos, há três genes da miosina V e seus produtos, denominados miosinas Va, Vb e Vc, são diferentemente expressos (Redowicz, 2007).

## Miosinas VI

As miosinas VI são compostas de uma cadeia pesada de 140 kDa (Mooseker & Cheney, 1995). São constituídas por duas cabeças com um único domínio motor, na cauda estão presente um pequeno segmento “coiled-coil”. Há uma inserção de 25 aminoácidos que, por comparação com a estrutura em cristal da miosina II, devem estar presentes na superfície da alça superior ao domínio 50kDa, assim como uma outra inserção de aproximadamente 50 aminoácidos antes do motif IQ que determina a direção da miosina VI (Sellers, 2000; Sweeney

& Houdusse, 2007). É a única miosina que caminha para a extremidade negativa dos filamentos de actina (Wells et. al., 1999).

Numerosos estudos revelaram que membros da classe das miosinas VI participam da espermatogênese, migração celular, endocitose, tráfego de organelas, manutenção da morfologia do Golgi, secreção de proteína, transcrição de gene e manutenção da integridade estrutural das células dos pêlos internos do ouvido (Hasson, 2003; Buss et. al., 2004; Sweeney & Houdusse, 2007).

Em *Drosophila melanogaster*, está relacionada com a migração celular no ovário (Krendel & Mooseker, 2005). A superexpressão do gene da miosina VI tem sido observada em formas malignas dos cânceres de ovário e próstata (Yoshida et. al., 2004; Dunn et. al., 2006).

Elas foram originalmente descobertas em *Drosophila melanogaster* (Kellerman & Miller, 1992) e, mais tarde, foram encontradas em todos os organismos metazoos (Buss et. al., 2004; Sweeney & Houdusse, 2007).

## Miosinas VII

Elas apresentam uma cadeia pesada com uma massa molecular de 250kDa, a qual é expressa na cóclea, fotoreceptor e células epiteliais da retina, testículos e rim; e uma cadeia pesada com massa molecular de 138 kDa, expressa exclusivamente em testículos (Hasson et. al., 1996). Em diversos organismos, participa da fagocitose e, em *Dictyostelium amoebae*, favorece a adesão célula-célula e célula-substrato (Krendel & Mooseker, 2005).

Os membros da família das miosinas VII foram identificados em *Dictyostelium discoideum* (Titus, 1999) e, posteriormente, em um conjunto diverso de organismos, incluindo vermes, insetos, peixes, sapos e humanos (Thompson & Langford, 2002).

## Miosinas VIII

As miosinas VIII apresentam massa molecular de 131kDa e são constituídas de 90 resíduos amino-terminal no domínio motor, 4 motivos IQ e um

pequeno seguimento “coiled-coil”. Foi primeiramente descrita em *Arabidopsis* (Sellers, 2000).

Apresenta potencial supressor de tumor, pois possui reduzida expressão em um grande número de tumores ovarianos (Yanaihara et. al., 2004).

## Miosinas IX

Elas compreendem uma classe de proteínas motoras únicas contendo, na cauda, um domínio Rho-GAP (proteína que ativa a GTPase) e um domínio ligante de zinco (Bahler, 2000). Também há uma longa inserção (150 aminoácidos) dentro da alça 2 (correspondendo à junção 50/20 kDa) do domínio motor (Wirth et. al., 1996; Redowicz, 2007).

Essas miosinas contém um típico domínio motor, motif IQ, e um longo domínio na cauda com uma região “coiled-coil”, sugerindo que elas devem formar homodímeros (Salamon et. al., 2003). Elas foram expressas, primeiramente, em *Caenorhabditis elegans* e estão presentes em uma variedade de organismos, incluindo vermes, peixes e camundongos (Thompson & Langford, 2002).

São importantes na remodelação do citoesqueleto durante a infecção pela bactéria patogênica *Shigella* (Wirth et. al., 1996).

## Miosinas X , XI e XII

As miosinas X apresentam, em sua estrutura, uma cauda com pequenas extensões “coiled-coil”; um domínio que interage com os mecanismos de transdução de sinal e com o citoesqueleto; e três motifs IQ seguem o domínio motor (Sellers, 2000). Estão relacionadas com a fagocitose (Krendel & Mooseker, 2005) e foram identificadas primeiramente em sapos (Solc et. al., 1994).

As miosinas XI possuem muitas características estruturais similares à miosina V, inclusive 6 motifs IQ e uma cauda com segmentos “coiled-coil” intercalada com seguimentos que não formam hélice (Sellers, 2000). Foram primeiramente identificadas em *Arabidopsis* (Kinkema & Schiefelbein, 1994).

Uma cadeia pesada (300 kDa) com uma extensão amino-terminal de 200 aminoácidos, dois domínios IQ e uma sequência muito curta para formar a região

“coiled-coil” constituem a estrutura das miosinas XII. No entanto, diferem de muitas classes de miosinas, pois a região “coiled-coil” não está justaposta ao último IQ, mas está situada na carboxila-terminal da cauda (Sellers, 2000). Estas miosinas foram identificadas em *C. elegans* pelo projeto genoma (Baker & Titus, 1997).

#### Miosinas XIII, XIV e XV

Dois genes das miosinas XIII foram relatados e nomeados MYO1 e MYO3. Seus domínios motores são completamente similares e ambos têm caudas muito curtas, mas elas diferem no número de motif IQ na região do pescoço: MYO1 possuem 3-5 motifs IQ e MYO3 possuem 5-7 (Sellers, 2000).

As miosinas XIV contêm um domínio motor sem motif IQ e apenas uma cauda muito pequena. Dois membros da classe das miosinas XIV foram encontrados nos parasitas *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (Soldati et. al., 1999), mas não se sabe ainda se as miosinas participam do processo infeccioso (Sellers, 2000).

O gene que codifica as miosinas XV tem 66 éxons. Sendo que, o segundo éxon em rato e humano, codifica um domínio rico em prolina, de aproximadamente 1200 aminoácidos, encontrado na terminação amino que não tem seqüência homóloga a outras proteínas. A cauda não tem nenhuma região para formar “coiled-coils”. Sua massa molecular é de 395 kDa (Liang et. al., 1999; Sellers, 2000) e são expressas apenas em vertebrados (Thompson & Langford, 2002).

#### Miosinas XVI, XVII e XVIII

As miosinas XVI estão evolutivamente relacionadas à miosina III devido à semelhança nos domínios da cabeça (Thompson & Langford, 2002). Já as miosinas XVII, em fungos, parecem ser descendentes evolutivas das miosinas VII. Hodge & Cope (2000), comparando os domínios da cabeça, mostraram uma relação entre estas duas classes.

Há duas isoformas das miosinas XVIII em ratos e em humanos. Análises filogenéticas indicam que miosinas XVIII e miosinas convencionais (classe II) compartilham origens comuns (Foth et. al., 2006).

## 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.

Andzelm, M. M. Chen, X., Krewski, K., Orange, J. L. and Strominger, J. L. 2007. Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J. Exp. Med.* 204: 2285-2291.

Bahler, M. 2000. Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim. Biophys. Acta* 1496: 52–59.

Baker, J. P., Titus, M. A. 1997. A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 272: 523-535.

Baldin, E. L. L., Lara, F. M. 2004. Efeito de Temperaturas de Armazenamento e de Genótipos de Feijoeiro sobre a Resistência a *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Neotrop. Entomol.*33(3): 365-369.

Barylko, B., Jung, G., Albanesi, J. P. 2005. Structure, function and regulation of myosin IC. *Acta Biochim. Polon.* 52: 373–380.

Becker, K. A. and Hart, N. H. 1999. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis. *J. Cell. Sci.* 112: 97-110.

Bento, J. M. S. 1999. Perdas por insetos na agricultura. *Ação Amb.* (4): 19-21.

Berg, J. S., Powell, B. C., Cheney, R. E. 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780–794.

Bhat, P., Thorn, P. 2009. Myosin 2 maintains an open exocytic fusion pore in secretory epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 20(6): 1795-803.

Bittins, C. M., Eichler, T. W., Gerdes, H. H. 2009. Expression of the dominant-negative tail of myosin Va enhances exocytosis of large dense core vesicles in neurons. *Cell Mol Neurobiol*. Epub ahead of print.

Bobbe, G., Barrett, K. G., Mentor-Marcel, R. A., Saffiotti, U., Young, M. R., Colburn, N. H., Albert, P. S., Bennink, M. R., Lanza, E. 2008. Dietary cooked navy beans and their fractions attenuate colon carcinogenesis in azoxymethane-induced Ob/Ob mice. *Nutr Cancer*. 60(3): 373–381.

Boyer, P. D., 1997. The ATPase synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem*. 66: 717-749.

Bridgman, P. C. 2004. Myosin-dependent transport in neurons. *J. Neurobiol*. 58: 164–174.

Bulygin, V. V., Milgrom, Y. M. 2009. A bi-site mechanism for *Escherichia coli* F1-ATPase accounts for the observed positive catalytic cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*. ARTICLE IN PRESS. BBABIO-46256; No. of pages: 8; 4C.

Buss, F., Spudich, G., Kendrick-Jones, J. 2004. Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 20: 649–676.

Carafoli, E. 1997. Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic. Res. Cardiol*. 92 suppl 1: 56-61.

Carafoli, E. 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell*. 4: 326-332.

Caroni, P., Carafoli, E. 1981. The Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. J. Biol. Chem. 256: 3263-3270.

Carvalho, L. H. T. 2008. Atividade inseticida de pós vegetais e do gesso em relação ao caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Alagoas.

Carvalho, R. P., Rossetto, L. 1968. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleóptera: Bruchidae). Ver. Bras. Entomol. 13: 105-117.

Chieragatti, E., Gartner, A., Stoffler, H. E., Bahler, M. 1998. Myr 7 is a novel myosin IX-RhoGAP expressed in rat brain. J. Cell Sci. 111(24): 3597-3608.

Coats, J. R. 1994. Risks from natural versus synthetic insecticides. Annu. Rev. Entomol. 39:489-515.

Coelho, M. V., Larson, R. E. 1993. Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. Brazilian J. Med. Biol. Res. 26: 465-472.

Conzelman, K. A., Mooseker, M. S. 1987. The 110-kDa protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. J. Cell Biol. 105: 313-324.

Credland, P. F., Deny, J. 1992. Intraspecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. Entomol. Exp. Appl. 65: 39-47.

Cronin, M. A., Diao, F., Tsunoda, S. 2004. Light-dependent subcellular translocation of G<sub>q</sub> in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC. J. Cell Sci. 117: 4797-4806.

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

Doreian, B. W., Fulop, T. G. and Smith, C. B. 2008. Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 28: 4470-4478.

Dunn, T. A., Chen, S., Faith, D. A., Hicks, J. L., Platz, E. A., Chen, Y., Ewing, C. M., Sauvageot, J., Isaacs, W. B., De Marzo, A. M., Luo, J., 2006. A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 169: 1843–1854.

Espíndola, 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.

Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento A. A. C., De Camilli, P. V., Larson, R. E., Mooseker, M. S. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 119: 1541-1557.

Ferreira, A. M. 1960. Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. *Garcia de Orta Série de Estudos Agronomicos* 8(3): 559-581.

Fiehler, R. W., Wolff, T. 2007. *Drosophila* Myosin II, Zipper, is essencial for ommatidial rotation. *Develop. Biol.* 310: 348-362.

Forgac, M. 1992. Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 172: 155-169.

Foth, B. J., Goedecke, M. C., Soldati, D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 6681–6686.

Gallo, D; O. Nakano, S. Silveira Neto, R. P. L. Carvalho, G. C. Baptista, E. Berti Filho, J. R. P. Parra, R. A. Zucchi, S. B. Alves, J. D. Vendramim, L. C. Marchini, J. R. S. Lopes & Omoto, C. 2002. *Entomologia agrícola*. FEALQ, 920p.

Gibbons, I. R., Rowe, A. J. 1965. Dynein: A protein with Adenosine Triphosphatase activity from cilia. *Science* 149 (3682): 424-426.

Grainge, M., Ahmed, S. 1988. *Handbook of plants with pest-control properties*. New York: John Wiley, 470p.

Graziane, N. M., Yuen, E. Y., Yan, Z. 2009. Dopamine D4 Receptors Regulate GABAA Receptor Trafficking via an Actin/Cofilin/Myosindependent Mechanism. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Nicholas M., Eunice Y. Yuen, Zhen Yan\* <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M807387200>. A última versão está em JBC Papers in Press. Publicado em 29, 2009 como manuscrito: M807387200.

Guerra, A. M. N. M., Maracajá, P. B., Freitas, R. S., Sousa, A. H., Sousa, C. S. M. 2009. Atividade inseticida de plantas medicinais sobre o *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Revista Caatinga* 22(1): 146-150.

Hasson, T., Skowron, J. F., Gilbert, D. J., Avraham, K. B., Perry, W. L., Bement, W. M., Anderson, B. L., Sherr, E. H., Chen, Z. Y., Greene, L. A., Ward, D. C., Corey, D. P., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. 1996. Mapping of unconventional myosins in mouse and human. *Genomics* 36: 431–439.

Hasson, T. 2003. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell Sci.* 116: 3453–3461.

Hegan, P. S., Mermall, V., Tilney, L. G., Mooseker, M. S. 2007. Roles for *Drosophila melanogaster* myosin IB in maintenance of enterocyte brush-border structure and resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas entomophila*. Mol. Biol. Cell 18: 4625-4636.

Hill, D. S. 2002. Pests of stored products and their control. Bulletin Entomol. Res. 92: 185-189.

Hirokawa, N. 1998. Kinesins and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279: 519–526.

Hirokawa, N., Takemura, R. 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins TRENDS Biochem. Sciences 28 (10): 558-565.

Hodge T., Cope, M. J. 2000. A myosin family tree. J. Cell Sci. 113: 3353-3354.

Howe, R. W., Currie, J. E. 1964. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. Bulletin Entomol. Research 55: 437-477.

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. Science 164: 1359-1366.

Huxley, H. E., Hanson, J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature 173: 973–976.

Jerdeva, G. V., Wu, K., Yarber, F. A., Rhodes, C. J., Kalman, D., Schechter, J. E., Hamm-Alvarez, S. F. 2005. Actin and non-muscle myosin II facilitate apical exocytosis of tear proteins in rabbit lacrimal acinar epithelial cells. J. Cell Sci. 118: 4797-4812.

Johnson, C. D., Romero-Nápoles, J. 2004. A review of evolution of oviposition guilds in the Bruchidae (Coleoptera). Rev. Bras. Entomol. 48: 3401–408.

Johnston, G. C., Prendergast, J. A., Singer, R. A. 1991. The *saccharomyces cerevisiae* MYO gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* 113: 539-551.

Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O., Karlsh, S. J. D. 2003. Structure and mechanism of functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65: 817-849.

Karcher, R. L., Deacon, S. W., Gelfand, V. I. 2002. Motor–cargo interactions: the key to transport specificity. *TRENDS Cell Biol.* 12 (1): 21-27.

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

Kéita, S. M., Vicent, C., Schmit, J., Arnason, J. T., Bélanger, A. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicul* and *O. gratissimum* applied as na insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus*. *J. Stored Prod. Research* 37(4): 339-349.

Kelleher, J. F., Mandell, M. A., Moulder, G., Hill, K. L., L'Hernault, S. W., Barstead, R.; Titus, M. A. 2000. Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis. *Curr. Biol.* 10: 1489 –1496.

Kellerman, K. A., Miller, K. G., 1992. An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 119: 823–834.

Kim, A., Endow, S. 2000. A kinesin family tree. *J. Cell Sci.* 113:3681–3682.

Kinkema, M., Schiefelbein, J. 1994. A myosin from a higher plant has structural similarities to class V myosins. *J. Mol. Biol.* 239: 591-597.

Kleine-Tebbe, J.; Jeep, S.; Josties, C.; Meysel U.; O'Connor, A., Kunkel G. 1992. IgE-mediated inhalant allergy in inhabitants of building infested by the rice weevil (*Sitophilus oryzae*). *Ann Allergy*, 497-504p.

Kluthcousk, J.; Haidar, H.; Thung, M. 2007. Principais problemas da cultura do feijão no Brasil. In: Francelli, A.L. Dourado Neto, D. (Ed.) Feijão. Estratégias de Manejo para alta produtividade. ESALQ/USP/LPV. 3: 53-102.

Komoszynski, M., Wojtczak, A. 1996. Apyrases (ATP diphosphohydrolases): functions and relationship to ATPases. *Biochem Biophys Acta* 1310: 233-241.

Krendel, M., Mooseker, M. S. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiol.* 20: 239-251.

Kucharczyk, R., Zick, M., Bietenhader, M., Rak, M., Couplan, E. Blondel, M., Caubet, S. D., Rago, J. P. Mitochondrial ATP synthase disorders: Molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793: 186–199.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A. M., Urbano-Hernandez, G., Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Winzerling, J., Vazquez-Moreno L.. 2009. Insecticidal action of PF2 lectin from *Oleña tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. *J Agric Food Chem*. 28;57(2): 689-94.

Lagunes, T. A., Arenas, L. A., Rodríguez, H. C. 1984. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. Chapingo: Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados-CONACyT-CP-UACH-INIA-DGSV (SARH). 203p.

Langford, G. M., 2002. Myosin-V, a versatile motor for shortrange vesicle transport. *Traffic* 3: 859–865.

Lara, F. M. 1992. Ordem Coleóptera. Princípios de entomologia. São Paulo. FEALQ, 280p.

Larson, R. E., Pitta, D. E., Ferro, J. A. 1988. A novel 190kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 213-217.

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.

Ley, S. V., Oliver, S. F., Antonello, A., Smith, M. D., Olsen, C. E. 2004. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. *J. Biol. Chem.* 279(17): 17973 – 17979.

Liang, Y., Wang, A., Belyantseva, I. A., Anderson, D. W., Probst, F. J., Barber, T. D., Miller, W., Touchman, J. W., Jin, L., Sullivan, S. L., Sellers, J. R., Camper, S. A., Loyd, R. V., Bachar, B., Friedman, T. B., Fridell, R. A. 1999. Characterization of the human and mouse unconventional myosin xv genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker. *Genomics* 61: 243-258.

Lingrel, J. B., Kuntzweiler, T. 1994.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659-19662.

Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* 42: 1-29.

Lunardi, J.; Dupuis, A.; Garin, J.; Issartel, J. P.; Michel, I.; Chabre, M. & Vignais, P. V. 1988. Inhibition of  $\text{H}^+$ -transporting ATPase by formation of a tight nucleoside diphosphatefluoroaluminate complex at the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 8958-8962.

MacLennan, D. H., 1970. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 245: 4508-4518.

Martin, D. W. 2005. Estrutura - Função de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - pomb. *Sem. Nephrol.* 198: 282-291.

Mazzonetto, F., Vendramim, J. D. 2003. Effect of powders from vegetal species on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in stored bean. *Neotrop. Entomol.* 32 (1): 145-149.

Meira, L. R. S. 1996. Feijão. Disponível na: <http://www.luizmeira.com/feijão.htm>. Acessado em 04/02/09.

Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature* 349: 709-713.

Mermall, V., Bonafé, N., Jones, L., Sellers, J. R., Cooley, L., Mooseker, M. S. 2005. *Drosophila* myosin V is required for larval development and spermatid individualization. *Dev. Biol.* 286: 238-255.

Miller, J. H., Vajrala, V., Infante, H. L., Claycomb, J. R. Palanisami A., Fang, J., Mercier, G. T. 2009. Physical mechanisms of biological molecular motors. *Physica B.* 404: 503-506.

Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y., Muramoto, K., Nonomura, Y. 1994. Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* 13: 1131-1142.

Moller, J. V., Juul, B., Maire, M. 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1286: 1-51.

Mooseker, M. S., Cheney, R. E. 1995. Unconventional Myosins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 633-675.

Murataliev, M. B., Milgrom, Y. M., Boyer, P. D. 1991. Characteristics of the combination of inhibitory  $Mg^{2+}$  and azide with  $F_1$  ATPase from chloroplasts *Biochemistry* 30: 8305-8310.

Neco, P., Fernandez-Peruchena C., Navas, S., Lindau, M., Gutierrez, L. M., Alvarez de Toledo, G., Ales, E. 2008. Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J. Biol. Chem.* 283: 10949-10957.

Neves, D. P. 2003. Controle de Insetos. *Parasitologia humana*. Editora Atheneu. São Paulo, 387p.

Nishi, T., Forgac, M. 2002. The vacuolar ( $H^+$ )-ATPases – nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 94-103.

Nodari R. O., Guerra M. P. 1999. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Simões et. al. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 11-24p.

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.

Oga, S. 2003. *Fundamentos de toxicologia*. Editora Atheneu. São Paulo. 439-448p.

Panizzi, A. R., Parra, J. R. P. 1991. *Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo integrado de pragas*. Editora Manole. São Paulo. 815p.

Pedersen, P. L. 2002. Transport ATPase in biological systems and relationships to human disease: a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34: 327-332.

Philimonenko, V. V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W. A., de Lanerolle, P., Hozak, P., Grummt, I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 6: 1165–1172.

Pimbert, M. 1985. A model of host plant change of *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Bruchidae) in a traditional bean cropping system in Costa Rica. *Biol. Agri. and Hort.* 3: 39-54.

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

Plesner, L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214.

Pollard, T. D., Korn, E. D. 1973. Acanthamoeba myosin. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 248: 4682-4690.

Pollard, T. D. 1982. Structure and polymerization of Acanthamoeba myosin-II filaments. *J. Cell Biol.* 95: 816-825.

Porter, J. A., Montell, C. 1993. Distinct roles of the *Drosophila* nina C kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis. *J Cell Biol.* 122(3): 601–612.

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C. S., Strasser, A. 2001. A proapoptotic bh3-only protein regulated by interaction with the myosin v actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293 (5536): 1829 – 1832.

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., Milligan, R. A.. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65.

Redowicz, M. J. 2007. Unconventional myosins in muscle. *Europ. J. Cell Biol.* 86: 549–558.

Richards, T. A., Cavalier-Smith, T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436: 1113–1118.

Rogat, A. D., Miller, K. G. 2002. A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 115: 4855-4865.

Sablin, E. P. 2000. Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms. *Cur. Op. Cell Biol.* 12(1): 35-41.

Salamon, M., Millino, C., Raffaello, A., Mongillo, M., Sandri, C., Bean, C., Negrisol, E., Pallavicini, A., Valle, G., Zaccolo, M., Schiaffino, S., Lanfranchi, G. 2003. Human MYO18B, a novel unconventional myosin heavy chain expressed in striated muscles moves into the myonuclei upon differentiation. *J. Mol. Biol.* 326: 137–149.

Schiliwa, M., Woehlke, G. 2003. Molecular motors. *Nature* 422: 759-765.

Segawa, A., Yamashina, S. 1989. Roles of microfilaments in exocytosis: a new hypothesis. *Cell Struct. Funct.* 14: 531-544.

Sellers, J. R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Bioch. Biophys. Acta* 1496: 3-22.

Sellers, J. R. 1999. *Myosin, Protein Profile*, second ed. Oxford University Press, Oxford. 256p.

Silva, J. A. P. 2005. Morfologia comparada e análise cladística do grupo merobruchus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae: Bruchini: Acanthoscelidina) Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da Universidade Federal do Paraná.

Silva, M. D. P., Carvalho, R. F. 2007. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. R. Bras. Zootec., v.36, suplemento especial, p.21-31.

Solc, C. K., Derfler, B. H., Duyk, G. M., Corey, D. P. 1994. PCR screen of a Bull-frog inner ear reveals a novel class of myosins (class X). *Audit. Neurosci.* 1: 63-75.

Soldati, T., Geissler, H., Schwarz, E. C. 1999. How many is enough? Exploring the myosin repertoire in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Cell Biochem. Biophys.* 30: 389-411.

Sousa, A. H., Maracajá, P. B.; Silva, R. Alves, M., Moura, A. M. N., Andrade, W. G. 2005. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 5(2) Disponível em: <[http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario\\_v5\\_n2.htm](http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v5_n2.htm)>.

Southgate, B. J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Ann. Rev. Entomol.* 24: 449-473.

Sweeney, H. L., Houdusse, A. 2007. What can myosin VI do in cells? *Trends Cell Biol.* 19: 57–66.

Tavares, M. A. G. C., Vendramim, J. D. 2005. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleóptera: Curculionidae). *Neotrop. Entomol.* 34(2): 319-323.

Teixeira, I. R. V., Zucoloto, F. S. 2003. Seed suitability and oviposition behaviour of wild and selected populations of *Zabrotes subfasciatus* (Boehman) (Coleóptera: Bruchidae) on different hosts. *J. Stored Prod. Res.* 39: 131-140.

- Thompson, R. F., Langford, G. M. 2002. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* 268: 276-289.
- Titus, M. A. 1999. A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr. Biol.* 9: 1297–1303.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 405: 647-655.
- Vale, R.D. (1999). Millennial musings on molecular motors. *Trends Cell Biol.* 9: 38-42.
- Vale, R. D., Milligan, R. A. 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motors proteins. *Science* 288: 88-95.
- Vendramim, J. D., Castiglioni, E. 2000. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: Guedes, J.C.; Costa, I.D.; Castiglioni, E. (Org.) *Bases e Técnicas do Manejo de Insetos*. Santa Maria: Pallotti. 113-128p.
- Warrick, H. M.; Spudich, J. A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol.* 3: 379-421.
- Weber, J., Senior, A. E. 1997. Catalytic mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1319: 19-58.
- Weisman L. S. 2006. Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 243-252.
- Wells, A. L., Lin, A. W., Chen, L. Q., Safer, D., Cain, S. M., Hasson, T., Carragher, B. O., Milligan, R. A., Sweeney, H. L. 1999. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401: 505–508.

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

Wirth, J. A., Jensen, K. A., Post, P. L., Bement, W. M., Mooseker, M. S. 1996. Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase activating protein domain in its tail. *J. Cell Sci.* 109: 653–661.

Wolenski, J. S. 1995. Regulation of calmodulin-binding myosins. *Cell Biol.* 5: 310-316.

Woo, A. L., James, P. F., Lingrel, J. B. 1999. Characterization of the fourth  $\alpha$  isoform of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Membrane Biol.* 169: 39-44.

Yanaihara, N., Nishioka, M., Kohno, T., Okamoto, A., Ochiai, K., Tanaka, T. 2004. Reduced expression of MYO18B, a candidate tumor-suppressor gene on chromosome arm 22q in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 112(1): 150-154.

Yoshida, H., Cheng, W., Hung, J., Montell, D., Geisbrecht, E., Rosen, D., Liu, J., Naora, H. 2004. Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: a role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8144–8149.

Yu, H. Y., Bement, W.M. 2007. Multiple myosins are required to coordinate actin assembly with coat compression during compensatory endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 18: 4096-4105.

## Capítulo Único

Purificação e caracterização parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera: *Chrysomelidae: Bruchinae*) e modulação fitoterápica de sua atividade

# 1. Resumo

*Zabrotes subfasciatus* (Boheman) é a principal praga do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). O objetivo do presente estudo foi a purificação, caracterização e modulação fitoterápica de uma ATPase a partir da fração solúvel de larvas de *Z. subfasciatus*. As larvas, recém extraídas do feijão, foram homogeneizadas em tampão de extração e centrifugadas a 45.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi fracionado com sulfato de amônio. A fração precipitada 45-80% de saturação foi homogeneizada em tampão de baixa força iônica e centrifugada, o sobrenadante resultante foi aplicado em coluna de Q-Sepharose. A coluna foi eluída com NaCl 200mM e, posteriormente, com um gradiente de NaCl 200 a 500mM. Após a cromatografia, as frações que expressaram maior atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase foram reunidas, constituindo a fração ATPase de larvas de *Z. subfasciatus*. O principal polipeptídeo dessa fração apresentou massa molecular relativa um pouco acima da cadeia pesada de miosina II. A fração ATPase apresentou atividade  $\text{K}^+/\text{EDTA}$ -ATPase significativa. O PPI e o ADP praticamente não foram hidrolisados. Tapsigargina, ouabaína e azida não inibiram a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. Extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*, *Chenopodium ambrosioides* e *Rosmarinus officinalis* inibiram a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, sendo que o *Eucalyptus citriodora* inibiu por completo essa atividade. A caracterização desta fração excluiu a possibilidade da presença de várias ATPases e apresentou um forte indício da presença de miosina, devido a alta atividade  $\text{K}^+/\text{EDTA}$ .

Palavras-chave: ATPase, *Zabrotes subfasciatus*, inseticida natural

## 2. Abstract

*Zabrotes subfasciatus* is the most common pest of the stored beans (*Phaseolus vulgaris*). This study was carried out to characterize ATPase from *Z. subfasciatus* larvae and to investigate its phytotherapy modulation. Larvae extracted from *Phaseolus vulgaris* were firstly homogenised in extraction buffer, and then centrifuged 45000g for 30min at 4°C. Supernatant was fractioned with ammonium sulfate, precipitated fraction on 45-80% saturation was homogenized in reduction ionic strength buffer, centrifuged and the supernatant was applied in ion exchange chromatography on Q-Sepharose. The column was eluted with 200mM NaCl and after that with salt gradient containing 200 to 500mM NaCl. After chromatography, fractions that presented  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity constituted *Z. subfasciatus* larvae ATPase fraction. The main polypeptide from this fraction showed relative molecular weight similar of the myosin VII. This fraction presented significant  $\text{K}^+/\text{EDTA}$ -ATPase activity. Both pyrophosphate and ADP were not hydrolyzed. Tapsgargin, ouabain and azide did not inhibit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity. Aqueous extracts from leaves of *C. ambrosioides*, *R. officinalis* and *E. citriodora* inhibited  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity, being the last one more effective. These results strongly indicate the presence of myosin in *Z. subfasciatus* larvae ATPase fraction, considering that it presented high  $\text{K}^+/\text{EDTA}$  activity.

Key-words: ATPase, *Zabrotes subfasciatus*, botanical insecticide

### 3. Introdução

*Zabrotes subfasciatus* (Boheman), a principal praga do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), é considerado o menor bruquíneo infestante de grãos armazenados. Esta espécie ocorre em todas as regiões onde se armazenam feijões e outras leguminosas (Ferreira, 1960; Lagarda-Diaz, 2009).

O controle de bruquíneos em feijão armazenado geralmente é feito com o uso de inseticidas sintéticos (Hill, 2002). O aumento no conhecimento dos prejuízos advindos do uso indiscriminado desses produtos e a preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos têm incentivado estudos relacionados a novas técnicas de controle de pragas (Tavares & Vendramim, 2005).

Entre as principais alternativas aos inseticidas convencionais, destaca-se o uso de inseticidas botânicos. Pesquisas com plantas visam, geralmente, encontrar princípios ativos que atuem no controle de pragas (Sousa et. al., 2005).

Kéita et. al. (2001) referenciam estudos com extratos de origem vegetal e seus efeitos sobre diversas espécies de insetos-praga de sementes e grãos armazenados. Para o controle de carunchos (Coleóptera: Bruchinae), é conhecido o efeito inseticida de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), *Ruta graveolens* (Arruda) (Mazzonetto & Vendramim, 2003), *Piper nigrum* (Pimenta do reino), *Chenopodium ambrosioides* (Erva de Santa Maria) (Carvalho, 2008) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) (Guerra et. al., 2009).

Os extratos de origem vegetal podem atuar diretamente na inibição da atividade das ATPases (Ping et. al., 2004). Estas enzimas hidrolisam o ATP liberando ADP e Pi. A energia liberada nesse processo é utilizada para realizar algum tipo de trabalho celular. Algumas ATPases são proteínas integrais de membrana (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Carafoli, 1997), enquanto outras se encontram no citoplasma (Krendel & Mooseker, 2005).

Considerando que as ATPases podem ser de grande importância no controle biológico de pragas, o objetivo do presente estudo foi a purificação, caracterização e modulação fitoterápica de ATPase de larvas de *Z. subfasciatus*.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados, tais como imidazol, EDTA, EGTA,  $\beta$ -mercaptoetanol, DTT, ATP, nucleotídeos, inibidores de proteases, reagentes para eletroforese, sacarose, pirofosfato tetrasódico, KCl,  $\text{FeSO}_4$ , ouabaína e tapsigargina foram de grau analítico.

### 4.2 - Preparação da fração ATPase

As larvas (0,6g) recém-extraídas do feijão foram homogeneizadas em solução tampão contendo: imidazol 50 mM pH 7,5, sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, DTT 0,2mM, benzamidina 1 mM e um conjunto de inibidores de protease Sigma<sup>®</sup> P2714 (AEBSF, aprotinina, bestatin, E-64, EDTA e leupeptina), que foi diluído conforme recomendado pelo fabricante. As larvas foram utilizadas na proporção de 0,1 g/mL de solução tampão. Para homogeneização das larvas, foi usado homogeneizador potter e todo o procedimento realizado em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 45.000g, por 30 min, a 4°C em centrífuga Sigma<sup>®</sup> 3K30. Adicionou-se à fração sobrenadante (S1) sulfato de amônio 45% de saturação, incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a 30.000g, por 30 min, a 4°C. A fração sobrenadante (S2) foi tratada com sulfato de amônio 80% de saturação, incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a 45.000 g por 30 min a 4°C. A fração precipitada (P3) foi ressuspensa em 5mL de tampão de ressuspensão (imidazol 20mM pH 7,5, EDTA 2mM, DTT 0,5mM) e novamente centrifugada a 45.000 g por 30 min a 4°C, originando as frações S4 e P4. A fração sobrenadante (S4) foi recuperada e submetida à cromatografia. A Cromatografia foi realizada utilizando uma coluna de 3mL de Q-sepharose, que foi equilibrada com 10 volumes de solução A (imidazol 20mM pH 7,5, EDTA 0,1mM, DDT 0,1mM). S4 foi aplicada na coluna que, em seguida, foi lavada com 10 volumes de solução A. Posteriormente, a coluna foi eluída com cinco volumes de solução A

contendo NaCl 200mM e, logo, com um gradiente formado por 20mL de tampão contendo NaCl 200mM e 20mL de tampão com NaCl 500mM. Após o estabelecimento do gradiente, foram coletadas frações de 1,5mL por tubo.

#### **4.3 - Análise da purificação**

O perfil de polipeptídios das frações protéicas foi analisado em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e o sistema de placas empregado por Studier (1973). Os géis, gradiente de 5% a 22% de acrilamida, foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 7,5 x 0,06cm.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25mM, EDTA 2mM, Glicina 0,2M, SDS 2,5mM sob corrente constante de 30mA. Os géis foram corados em solução de “*comassie brilliant blue-R*” 0,125% em etanol 50% e ácido acético 10% e, em seguida, descorados em solução etanol 20% e ácido acético 12,5%.

Foi usado o padrão SDS-6H Sigma (cadeia pesada de miosina 205 kDa,  $\beta$  Galactosidase 116 kDa, Fosforilase 97,4 kDa, albumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa e anidrase carbônica 29 kDa) para calcular a massa molecular aproximada dos polipeptídios em gel, segundo o método de Lambin et. al. (1976).

#### **4.4 - Atividade ATPase**

A atividade ATPase foi determinada pela medida do fosfato inorgânico (Pi) liberado do ATP, usando o método de Heinonen & Lathi (1981). A atividade cátion-ATPase foi realizada utilizando meio de reação imidazol 25mM pH 7,5, DTT 1,0 mM, EDTA 2 mM, KCl 60 mM, ATP 1mM contendo 2mM dos respectivos cátions. A atividade K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase foi realizada em meio de reação, imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM; EDTA 2 mM, ATP 1 mM contendo KCl 60 ou 600 mM. Os efeitos de ouabaína 1,7mM, tapsigargina 140 $\mu$ M e azida 1 e 10mM foram testados na atividade Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-ATPase, estes inibidores foram adicionados à fração protéica, juntamente com meio de reação. O mesmo ocorreu com o ensaio

utilizando os extratos aquosos, sendo que todos estes foram usados na proporção de 125µL do extrato/0,1g de larva. Volumes pré-determinados das frações protéicas foram adicionados aos meios de reação e o volume final de 200µL foi completado com a adição de água Milli-Q.

A reação foi realizada em duplicatas e iniciada com a adição de ATP, GTP, ADP ou PPI, seguida de incubação a 37°C por 20 minutos e interrompida com a adição de 2ml de solução de dosagem de Pi. Essa solução foi preparada com acetona (PA), ácido sulfúrico 5 N e molibdato de amônio 10mM na proporção volumétrica de 2:1:1, respectivamente, no momento do ensaio. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 355 nm.

#### **4.5 – Dosagem de Proteínas**

Para quantificação das proteínas, foi utilizado o método de Bradford, usando como padrão soro albumina bovina (BSA).

Alíquotas das frações foram diluídas em água deionizada para 100µl, seguida pela adição de 3ml de reagente de Bradford (100mL de comassie blue G, 50mL de etanol 95%, 100mL ácido fosfórico 85%, completando o volume com água para 1L). As determinações foram realizadas em duplicata, lendo-se em espectrofotômetro a 595nm (Bradford, 1976).

#### **4.6 – Preparação dos extratos aquosos utilizados nos ensaios de inibição da atividade ATPase**

As folhas dos vegetais utilizados foram secas ao sol, trituradas, misturadas em água destilada e filtradas através de papel filtro. Os extratos aquosos foram preparados na concentração 10mg de extrato/ml de água destilada (Ribeiro et. al., 2007).

Foram utilizadas cinco espécies vegetais: *Chenopodium ambrosioides* (Erva de santa maria), *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto-cheiroso), *Ruta graveolens* (Arruda) e *Piper nigrum* (pimenta do reino).

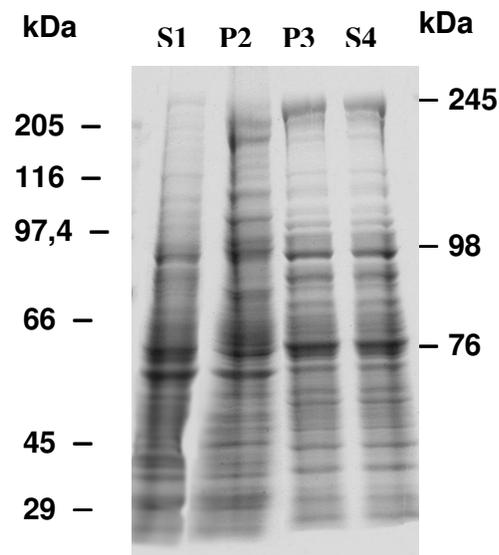
As folhas dos vegetais foram coletadas em Fevereiro de 2009, identificadas e depositadas no herbário da Reserva Ecocerrado Brasil, Araxá-MG.

#### **4.7 – Análises estatísticas**

Os resultados foram representados graficamente com médias e desvio padrão. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) para comparação das variáveis e o teste de Tukey para as diferenças mínimas significativas, através do software InStat, com auxílio do programa GraphPad InStat (3.0 for Windows). Os dados calculados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

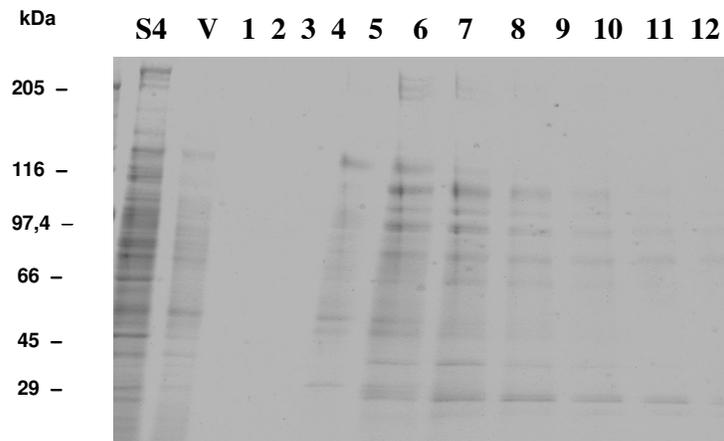
## 5. Resultados

A precipitação com sulfato de amônio 45% de saturação, na fração S1, levou à precipitação de vários polipeptídios como indicado em P2. O sulfato de amônio 45-80% de saturação causou a precipitação de alguns polipeptídios, sendo que os principais apresentaram massa molecular relativa de 245, 98 e 76kDa, como pode ser observado em P3. Estes polipeptídios foram solubilizados em tampão de baixa força iônica como indicado em S4 (Figura 1).



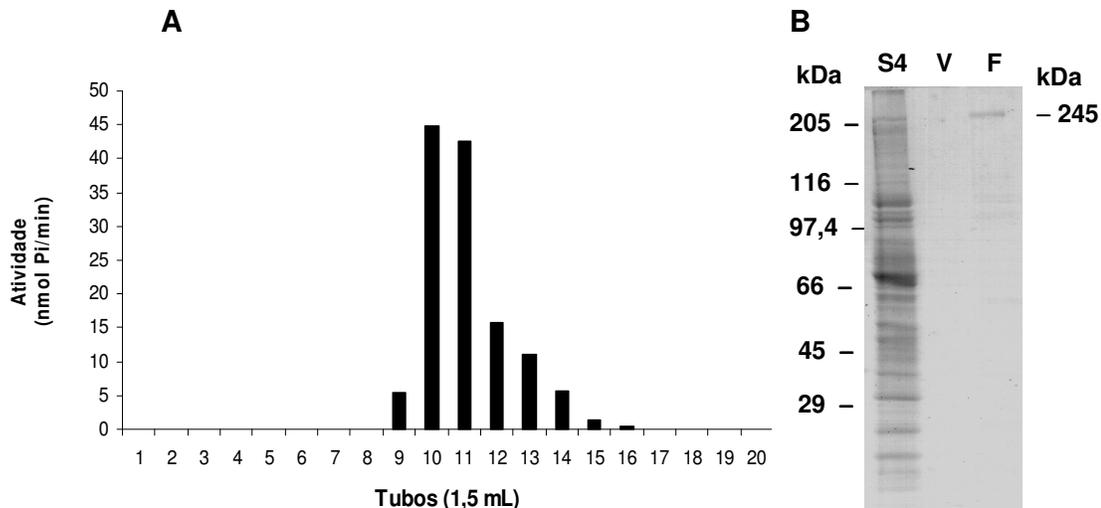
**Figura 1: SDS-PAGE do fracionamento de larvas de *Zabrotes subfasciatus*.** Foram aplicados 2 $\mu$ L de S1 e 10 $\mu$ L das demais frações em gel gradiente de poliacrilamida de 5 a 22%. S1: sobrenadantes 45000g X 30' de larvas de *Z. subfasciatus*, P2: precipitado 45% sulfato de amônio, P3: precipitado 45-80% sulfato de amônio e S4: polipeptídios de P3 solubilizados em baixa força iônica. Os valores à esquerda correspondem às massas moleculares de marcadores. Os valores à direita indicam as massas aproximadas dos principais polipeptídios presentes na fração S4.

A fração S4 foi aplicada em coluna de Q-Sepharose. Realizou-se eluição com NaCl 0,2M, o que contribuiu na purificação da ATPase, uma vez que eliminou alguns polipeptídios (Figura 2).



**Figura 2: SDS-PAGE do fracionamento de S4 em coluna de Q-Sepharose - eluição NaCl 200mM.** Foram aplicados 2 $\mu$ l de S1 e 10 $\mu$ L das demais frações em gel gradiente de poliacrilamida de 5 a 22%. S4: fração ATPase de larvas de *Z. subfasciatus*, V: Void e 1-12: Frações eluídas da coluna. Os valores à esquerda correspondem aos marcadores de peso molecular.

Após a eluição descrita, realizou-se um gradiente de 0,2 a 0,5M de NaCl. A atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase foi maior nos tubos 10 e 11, estes foram reunidos constituindo uma fração única que foi denominada ATPase Zs -FS4Q (ATPase de *Z. subfasciatus* - fração S4 após Q-Sepharose), a qual foi caracterizada (Figura 3A). O principal polipeptídido da ATPase Zs -FS4Q apresentou massa molecular relativa acima da cadeia pesada de miosina II com aproximadamente 245kDa (Figura 3B), semelhante à massa molecular da miosina VII (250kDa).



**Figura 3A: Atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase do fracionamento de S4 em coluna de Q-Sepharose - eluição NaCl 200 - 500mM.** A respectiva fração (100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM), contendo  $\text{CaCl}_2$  2 mM e  $\text{MgCl}_2$  2 mM. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 20 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. A figura ilustra os dados de um experimento. **Figura 3B: SDS-PAGE do fracionamento de S4 em coluna de Q-Sepharose - eluição NaCl 200 - 500mM.** S4 - Fração aplicada na coluna de Q – sepharose. V – Void. F- Fração ATPase (tubos 10 e 11 eluídos da coluna com o gradiente). Foram aplicados no gel: 10 $\mu\text{L}$  de S4, V e da fração ATPase. Os valores à esquerda correspondem aos marcadores de massa molecular. O valor à direita indica a massa aproximada do principal polipeptídeo presentes na fração S4.

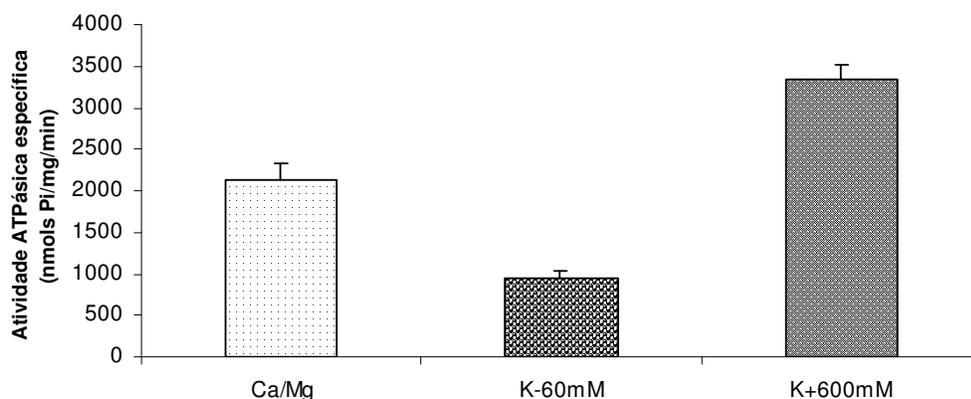
Através da análise da tabela 1 observou-se que as precipitações com sulfato de amônio 45 e 80% foram eficientes, pois a primeira precipitou 78,6% dos polipeptídeos de S1 e a segunda 80,6% dos de S2. Considerando que a fração P3 teve aproximadamente duas vezes menos polipeptídeos que P2, constatou-se que este procedimento foi importante na purificação. A atividade específica de hidrólise de ATP mostrou que a fração P3 apresentou atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase consideravelmente maior que em P2. A alta atividade de P3 foi praticamente recuperada em S4.

A cromatografia em coluna de Q-sepharose também foi eficiente na purificação parcial da ATPase, pois a quantidade de proteínas no eluato foi 99,8% menor que a fração inicial (S1) e 98,8% menor que na fração aplicada na colna (S4). A atividade específica de hidrólise de ATP mostrou que a ATPase Zs-FS4Q apresentou atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 97% maior que S1 e 91% maior que S4.

Fração	Volume total (mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (nmols Pi/mg/min)	Atividade Total (nmols Pi/min)
S1	6,0	14,4	56	806,4
S2	5,5	9,02	13	117,2
P2	5,5	3,08	49	150,9
S3	5,0	3,8	6	22,8
P3	5,0	1,75	224	392
S4	4,5	2,07	166	343,6
ATPase Zs -FS4Q	3,0	0,024	1915	45,96

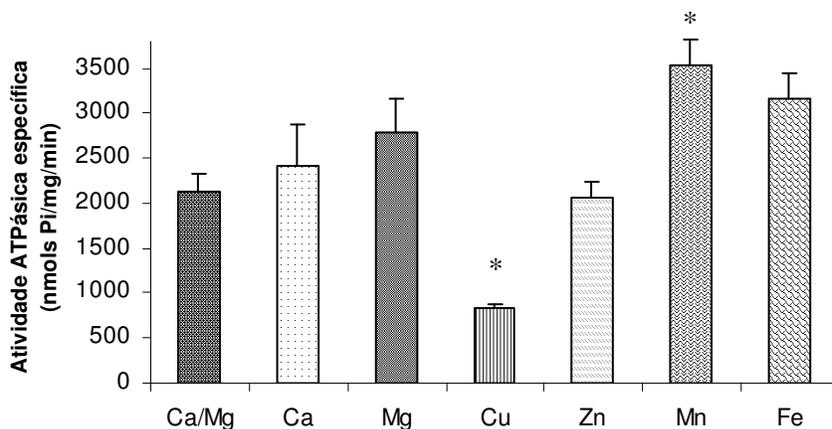
**Tabela 1: Purificação parcial de ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus*.** A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). Para a atividade específica foram adicionados 100  $\mu$ L das frações ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM), contendo  $\text{CaCl}_2$  2 mM e  $\text{MgCl}_2$  2 mM. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 20 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. S1, S2 e S3: sobrenadantes 45000g X 30' de larvas de *Z. subfasciatus*, P2: precipitado 45% sulfato de amônio, P3: precipitado 45-80% sulfato de amônio e S4: polipeptídios de P3 solubilizados em baixa força iônica.

A fração ATPase Zs - FS4Q apresentou atividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase significativa, cerca de 3,5 vezes maior que o controle (KCl 60mM) e 1,5 vezes maior que sua atividade  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Figura 4).



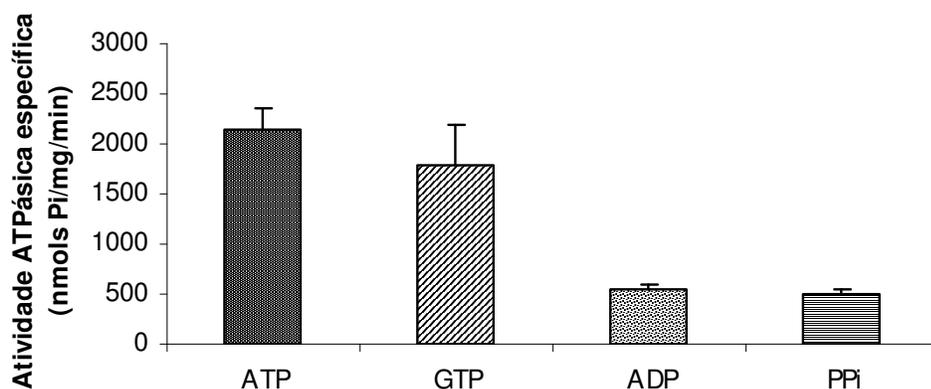
**Figura 4. Atividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase.** A fração ATPase (100 $\mu$ L) foi incubada por 20 min. a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60mM) contendo  $\text{CaCl}_2$  2mM e  $\text{MgCl}_2$  2mM, para a dosagem da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, EDTA 2mM e KCl 60mM ou 600mM como indicado, para dosagem da atividade  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

A ATPase Zs - FS4Q apresentou atividade na presença de todos os diferentes cátions testados (Figura 5). As atividades mais altas foram a  $Mn^{2+}$ -ATPase e a  $Fe^{2+}$ -ATPase, seguidas pela  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ -ATPase, sendo que apenas a atividade  $Mn^{2+}$ -ATPase foi significativamente maior que  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase. Não houve diferenças consideráveis quando  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  foram testados isolados ou associados. A atividade  $Cu^{2+}$ -ATPase foi menor que todas as demais.



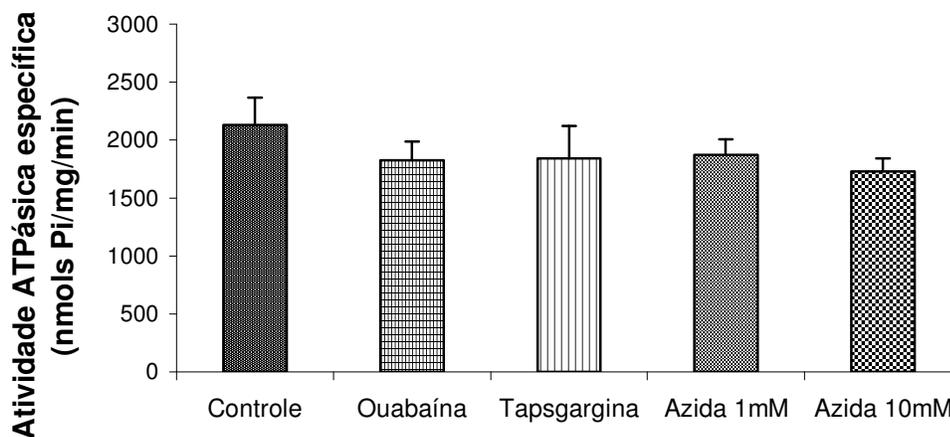
**Figura 5. Atividade ATPase específica em presença de diferentes cátions.** A fração (100 $\mu$ L) foi incubada por 20 min. a 37°C em meio de reação (Imidazol-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, DTT 1mM, KCl 60mM) contendo os cátions indicados na concentração final de 2mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos. \*Difere significativamente da atividade  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase ( $p < 0,05$ ).

A atividade  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -GTPase correspondeu a cerca de 84% da atividade  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPase. Enquanto que o PPI e o ADP praticamente não foram hidrolisados (Figura 6).



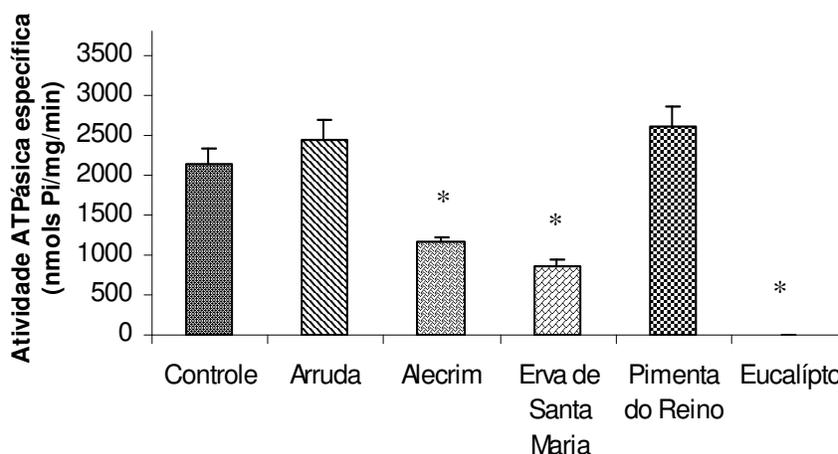
**Figura 6. Especificidade de substrato da fração ATPase.** Foram adicionados 100 $\mu$ L da fração ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM) contendo 2 mM de cálcio e 2mM de magnésio. A reação foi iniciada com a adição do respectivo substrato a 1mM, seguindo a incubação a 37°C durante 20 minutos, e então foi interrompida com a adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

O efeito de inibidores de ATPase de membranas foi testado sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase para verificar se a atividade poderia ser devido a alguma ATPase de membranas. Na fração ATPase Zs - FS4Q nenhum inibidor teve efeito sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Figura 7).



**Figura 7. Efeito de inibidores na atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.** Foram adicionados 100 $\mu$ L da fração ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM) contendo 2 mM de cálcio e 2 mM de magnésio, e onde indicado, ouabaina 1,7mM, tapsgargina 140 $\mu$ M e azida 1 e 10mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM e interrompida com adição de solução de dosagem. Os dados representam a média de três experimentos distintos.

Os extratos aquosos de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), *Chenopodium ambrosioides* (Erva de Santa Maria) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) inibiram a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, sendo que *Eucalyptus citriodora* inibiu completamente essa atividade. Os extratos de *Ruta graveolens* (Arruda) e *Piper nigrum* (Pimenta do reino), na concentração utilizada, não inibiram a atividade da ATPase Zs - FS4Q (Figura 8).



**Figura 8. Efeito de plantas com potencial inseticida na atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.** Foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de proteínas da fração ao meio de reação I (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM), contendo 2 mM de cálcio e 2 mM de magnésio e, onde indicado, 125  $\mu\text{L}$  extratos aquosos/0,1g de larvas. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37°C durante 20 minutos e então foi interrompida com a adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. Os dados representam a média de três experimentos distintos. \*Difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ).

## 6. Discussão

O presente estudo buscou a purificação e caracterização de uma ATPase a partir da fração solúvel de larvas de *Z. subfasciatus* e testar a ação de plantas com propriedades inseticidas na modulação da atividade dessa enzima. Pois, existem inseticidas naturais que provocam inibições de ATPases (Ping et. al., 2004).

O principal polipeptídeo encontrado na fração ATPase Zs - FS4Q, apresentou massa molecular relativa de aproximadamente 245kDa, semelhante à massa molecular das miosinas VII, 250kDa.

Em diversos organismos as miosinas VII participam da fagocitose (Krendel & Mooseker, 2005), são expressas na cóclea, fotoreceptor e células epiteliais da retina, testículos e rim (Hasson et. al., 1996). Os membros desta classe foram identificados em *Dictyostelium discoideum* (Titus, 1999) e, posteriormente, em um conjunto diverso de organismos, incluindo insetos, peixes, sapos e humanos (Thompson & Langford, 2002).

As miosinas possuem a característica exclusiva de apresentarem uma atividade ATPase alta na ausência de cátions bivalentes e presença de alta força iônica, atividade  $K^+$ /EDTA-ATPase (Pollard & Korn, 1973, Pollard, 1982). Os achados do presente estudo evidenciaram essa alta atividade na ATPase Zs - FS4Q, o que também indica a presença de miosinas.

Uma  $Ca^{2+}$ -ATPase purificada parcialmente a partir de larvas de *Pachymerus nucleorum*, coleóptero da mesma família de *Z. subfasciatus*, não apresentou atividade na presença de outros cátions, como magnésio, cobre, cobalto e zinco (Cruz, 2006). Diferente desta  $Ca^{2+}$ -ATPase, a ATPase Zs - FS4Q apresentou atividade na presença de todos os cátions testados, mas corrobora com Cruz (2006) em relação à alta atividade na presença de Manganês.

As ATP difosfohidrolases (ATPDases, ecto-ATPDases ou apirases) hidrolisam tanto ATP quanto ADP (Kaczmarek et. al., 1996). Sendo assim, há indícios de que a atividade da fração ATPase Zs - FS4Q não seja devido à presença de ATPDases, pois não houve atividade hidrolítica considerável de nucleotídeos difosfato (ADP) ou de pirofosfato (PPi).

A atividade GTPase da fração ATPase Zs - FS4Q pode ter sido devido a alguma GTPase específica como a dinamina, envolvida nos processos de endocitose. Ela foi primeiramente identificada em preparações de dineína e cinesina de cérebro (Shpetner & Valle, 1989), ou a própria ATPase do presente estudo, que, também, pode usar o GTP como substrato.

A ATPase mitocondrial, F1-ATPase, é inibida por azida 1mM (Murataliev et. al., 1991). Diferentemente disto, a presente fração ATPase Zs - FS4Q não tem sua atividade alterada por azida, tanto em presença de 1 ou 10mM.

A tapsigargina 170nM inibe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases do retículo endoplasmático e sarcoplasmático (Lyttton et. al., 1991). A sua ação causa perda de transporte de cálcio e de atividade ATPase dependente de cálcio (Thastrup et. al., 1990), além de impedir a formação do complexo enzima-ATP no estado de baixa afinidade por cálcio (Sagara et. al., 1992). As respostas inibitórias são extremamente rápidas mesmo em baixas concentrações do inibidor, além de não serem revertidas com aumento da concentração de ATP (Lyttton et. al., 1991). A tapsigargina 140 $\mu$ M não inibiu a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de larvas de *Z. subfasciatus*, o que difere dos resultados encontrados por Duarte (2007) em que Tapsigargina 140 $\mu$ M inibiu sensivelmente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de larvas de *P. nucleorum*.

O glicosídeo ouabaína é usado freqüentemente em pesquisas biomédicas como inibidor específico da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase da membrana plasmática, proteína que cataliza o transporte ativo acoplado de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  estabelecendo um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. Sendo assim, não é possível afirmar a presença de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na fração ATPase Zs - FS4Q estudada, uma vez que a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase não foi inibida por ouabaína 1,7mM.

Segundo Mazzonetto & Vendramim (2003), os inseticidas e repelentes naturais utilizados na forma de pós e extratos aquosos, por serem de fácil obtenção e aplicação, constituem a melhor opção para o agricultor de baixa renda, que normalmente não dispõe de recursos econômicos e técnicos para aquisição e aplicação dos produtos sintéticos.

Estudos desenvolvidos por Ping et. al. (2004), demonstraram que o extrato de *Stellera chamaejasme* (planta típica da China), inibiu a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de gafanhotos. Neste estudo, extrato aquoso de Eucalipto, Erva-de-Santa-Maria e Alecrim inibiram a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de *Z. subfasciatus*.

As espécies vegetais utilizadas foram selecionadas baseadas em estudos anteriores sobre suas propriedades inseticidas. Silva Júnior (1997), Kyamanywa et. al. (1999), Lorenzi & Abreu-Matos (2000), Tapondjoua et. al. (2002), Mazzonetto & Vendramim (2003) e Silva et. al. (2003) mostraram o efeito tóxico da erva-de-santa-maria em relação aos coleópteros.

O eucalipto também apresentou o mesmo efeito sobre *Acanthocelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchinae) (Mazzonetto & Vendramim, 2003; Brito et. al., 2006; Batish et. al., 2008; Pereira et. al., 2008) e *Sitophilus zeamais* (Coleoptera) (Sandi & Blanco, 2007; Nerio et. al., 2009).

O alecrim atua no controle de muitas espécies de inseto (Papachristos & Stamopoulos, 2002; Koschier & Sedy, 2003; Prajapati et al., 2005). Ele é utilizado, por exemplo, como inseticida botânico no controle de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchinae) (Guerra et. al., 2009). No presente estudo, essas plantas foram eficientes na redução da atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de larvas de *Z. subfasciatus*.

Segundo Balmé (2000), a arruda repele parasitos e ratos, uma vez que o cheiro desta erva é muito forte, mas esta não demonstrou reduzir a atividade da ATPase Zs - FS4Q.

Investigações sobre a utilização de extratos da pimenta-do-reino na proteção de grãos contra traça-dos-cereais (*Sitotroga cerealella*) (Boff & Almeida, 1995), larvas de *Culex* (*Culex quinquefasciatus*), (Chahad & Boff, 1994) e carunchos (Coleoptera-Bruchidae) (Almeida et. al., 2004), obtiveram resultados promissores. Entretanto, não foi observado a redução da atividade ATPase de larvas de *Z. subfasciatus* por esta planta.

Este estudo sugere a possibilidade da fração ATPase Zs - FS4Q ser alvo de inseticida natural, uma vez que, alguns extratos aquosos de espécies com potencial inseticida inibiram a atividade  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase.

Considerando que a fração ATPase de larvas de *Z. subfasciatus* apresentou alta atividade  $\text{K}^+/\text{EDTA}$ , característica exclusiva de miosinas, e um polipeptídeo com massa molecular relativa semelhante à miosina VII e que a caracterização excluiu a possibilidade da presença de várias outras ATPases, há um forte indício da presença de miosina na fração ATPase Zs - FS4Q.

Como as ATPases podem agir como ferramentas de controle biológico, o presente trabalho e os demais citados corroboram quanto ao uso de inseticidas naturais como recursos alternativos no controle de pragas agrícolas. Além disso, os resultados contribuem para investigações futuras, como por exemplo, a completa elucidação do efeito inseticida das espécies vegetais testadas sobre as ATPases.

## 7- Conclusão

Neste trabalho foi purificada e caracterizada parcialmente uma ATPase de larvas de *Zabrotes subfasciatus* com propriedades similares a membros da família de miosinas. Também foi mostrado que extratos aquosos de folhas de eucalipto, erva-de-santa-maria e alecrim inibiram a atividade ATPase dessa fração, sendo que o Eucalipto inibiu por completo essa atividade.

## 8. Referências Bibliográficas

Aizman, O.; Ulhen, P.; Lal, M.; Brismar, H.; Asperia, A. 2001. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98 (23): 13420-13424.

Almeida, S. A.; Almeida, F. A. C.; Santos, N. R.; Araújo, M. E. R.; Rodrigues, J. P. 2004. Atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *R. Bras. agrociência*, 10 (1): 67-70.

Amaral, E. A. 2006. Inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase pelo Derivado Esteróide Ouabaína: Implicações sobre o Ciclo de Vesículas Sinápticas em Junção Neuromuscular. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular. Universidade Federal de Minas Gerais.

Balmé, F. 2000. Plantas medicinais. Editora Hemus. As plantas medicinais como podem ser reconhecidas e para que servem. 171p.

Batish, D. R.; Singh, H. P., Kohli, R. K., Kaur, S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manag.* 256: 2166–2174.

Berg, J. S., Powell, B. C., Cheney, R. E. 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780–794.

Boff, M. I. C., Almeida, A. A. 1995. Efeito residual de *Piper nigrum* sobre larvas neonatas de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). In: Anais do Congresso Brasileiro da Sociedade Entomológica do Brasil. 24: 115–121.

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

Brito, J. P., Oliveira, J. E. M., Bortoli, S. A. 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). Rev. Biol. Ciências da Terra 6 (1): 96-103.

Carvalho, L. H. T. 2008. Atividade inseticida de pós vegetais e do gesso em relação ao caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Alagoas.

Chadad, S.; Boff, M. I. C. 1994. Efeito de extratos de *Piper nigrum* sobre larvas de *Culex* (*Culex quinquefasciatus*). Sociedade Entomológica do Brasil. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil Londrina. 23 (1) 13-18.

Conzelman, K. A., Mooseker, M. S. 1987. The 110-kDa protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. J.Cell Biol. 105: 313-324.

Cruz, G. C. N. 2006. Caracterização de uma Ca-ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1972) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia.

Duarte, V. L. 2007. Solubilização e Caracterização Parcial de Ca<sup>2+</sup>-ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1972) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia.

Ferreira, A. M. 1960. Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. Garcia de Orta Série de Estudos Agronomicos 8(3): 559-581.

Graziane, N. M., Yuen, E. Y., Yan, Z. 2009. Dopamine D4 receptors regulate GABAA receptor trafficking via an actin/cofilin/myosin-independent mechanism. The

American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Nicholas M., Eunice Y. Yuen, Zhen Yan\* <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M807387200>. Papers in Press. Publicado em 29 de janeiro, 2009 como manuscrito M807387200.

Guerra, A. M. N. M., Maracajá, P. B., Freitas, R. S., Sousa, A. H., Sousa, C. S. M. 2009. Atividade inseticida de plantas medicinais sobre o *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae). Revista Caatinga 22(1): 146-150.

Hasson, T., Skowron, J. F., Gilbert, D. J., Avraham, K. B., Perry, W. L., Bement, W. M., Anderson, B. L., Sherr, E. H., Chen, Z. Y., Greene, L. A., Ward, D. C., Corey, D. P., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. 1996. Mapping of unconventional myosins in mouse and human. Genomics 36: 431–439.

Heinonen, J. K., Lahti, 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.

Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J. Beaudoin, A. R., Bach, F. H., Robson, S. C. 1996. Identification and characterization of CD39/vascular ATP dyphosphohydrolase. J. Biol. Chem. 271: 33116-33122.

Kéita, S. M., Vicent, C., Schmit, J., Arnason, J. T., Bélanger, A. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicul* and *O. gratissimum* applied as na insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus*. J. Stored Prod. Research 37 (4): 339-349.

Koschier, E., Sedy, K., 2003. Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of Thrips tabaci Lindeman. Crop Protec. 22: 929–934.

Krendel, M., Mooseker, M. S. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. Physiol. 20: 239-251.

Kyamanywa, S., Bisikwa, J. Ayesiga, R. 1999. Effect of kawunyila (*Chenopodium* sp.) and other traditional storage protectants on population of bean bruchids (*Acanthoscelides obtectus*) and their damage on stored beans. *African Crop Sci. J.* 7: 207-215.

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

Lagarda-Diaz I., Guzman-Partida A. M., Urbano-Hernandez G., Ortega-Nieblas M. M., Robles-Burgueño M. R., Winzerling J., Vazquez-Moreno L. 2009. Insecticidal action of PF2 lectin from *Oleaya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. *J Agric Food Chem.* 57(2): 689-94.

Lambin, P., Rocher, D., Fine, J. M. 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.* 74: 567-575.

Lorenzi, H. & Abreu Matos, F. 2000. *Plantas Daninhas do Brasil*. Editora: Nova Odessa. São Paulo. 104p.

Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M. R. 1991. Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. *J. Biol. Chem.* 266 (15): 17067-17071.

Mazzonetto, F.; Vendramim, J. D. 2003. Effect of powders from vegetal species on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in stored bean. *Neotrop. Entomol.* 32 (1): 145-149.

Mcfadden, S. C.; Bobich, J. A.; Zheng, Q. 2001. Double-labeled preparation for simultaneous measurement of [3H]-noradrenaline and [14C]-glutamic acid exocytosis from streptolysin-O (SLO)-perforated synaptosomes. *J. Neurosci. Methods* 107 (1-2): 39-46.

Murataliev, M. B., Milgrom, Y. M., Boyer, P. D. 1991. Characteristics of the combination of inhibitory  $Mg^{2+}$  and azide with  $F_1$  ATPase from chloroplasts . Biochemistry 30: 8305-8310.

Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. E. 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). J. Stored Produc. Res. In press. 1–3.

Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2002. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Produc. Res. 38: 117–128.

Pereira, A. C. R. L., Oliveira, J. V., Junior, M. G. C. G., Câmara, C. A. G. 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] Ciênc. Agrotec. 32 (3): 717-724.

Ping, G., Yanping, L., Shigui, L. 2004. Effect of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. Pestic. Biochem. Physiol. 80: 157-162.

Pollard, T. D. 1982. Structure and polymerization of *Acanthamoeba* myosin-II filaments. J. Cell Biol. 95: 816-825.

Pollard, T. D., Korn, E. D. 1973. *Acanthamoeba* Myosin. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. J. Biol. Chem. 248: 4682-4690.

Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bioresource Technology 96: 1749–1757.

Ribeiro, L. P.; Rigo, D. S.; Sausen, C. D.; Sturza, V. S.; Egewarth, R.; Dequech, S. T. B. 2007. Uso de extratos vegetais no controle de insetos-praga na cultura do pepino em estufas plásticas. Informe técnico Centro de Ciências Rurais. N° 11. Universidade Federal de Santa Maria.

Sagara, Y., Wade, J. B., Inesi, G. 1992. A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin. J. Biol. Chem. 267(2): 1286-1292.

Sandy, J. T. T., Blanco, R. F. 2007. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (MYRTACEAE), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: Curculionidae). Biol. & Health J. 1 (1, 2): 93-100.

Sellers, J. R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. Bioch. Biophys. Acta 1496: 3-22.

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

Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) com polvos vegetales solos y em mesclas com carbonato de cálcio em maiz almacenado. Cien. Inv. Agr. 30 (3): 153-160.

Silva Júnior, A. A. 1997. Plantas medicinais e aromáticas. Itajaí – SC. Apoio MMA – Secretaria da Agricultura e do Desenvolvimento Rural.

Sousa, A. H.; Maracajá, P. B.; Silva, R. M, Alves; Moura. A. M. N; Andrade. W. G. 2005. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. Revista de Biologia e Ciências da Terra 5(2) Disponível em: <[http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario\\_v5\\_n2.htm](http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v5_n2.htm)>.

Studier, F. W. 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. *J. Mol. Biol.* 79: 237-248.

Tapondjoua, L. A.; Adlerb, C.; Boudaa, H.; Fontemc, D. A. 2002. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *J. Stored Prod. Res.* 38: 395–402.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drabak, B. K., Hanley, M. R., Dawson, A. P. 1990. *Proc. Nutl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 2466-2470.

Thompson, R. F. & Langford, G. M. 2002. Myosin Superfamily Evolucionary History. *The anatomical Record* 268: 276-289.

Titus, M. A. 1999. A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr. Biol.* 9: 1297–1303.

# 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](#)