



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE de *Alphitobius diaperinus*
(Coleoptera, Tenebrionidae): EFEITO DE DIFERENTES RAÇÕES DE
AVES E DOS INIBIDORES DE *Phaseolus vulgaris*.**

WELLINGTON OLIVEIRA DA CRUZ

***Sob orientação do Professor*
Dr^o. Emerson Guedes Pontes**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Bioquímica.

Seropédica, RJ
Setembro de 2011

636.6089

C957c

T

Cruz, Wellington Oliveira da, 1975-
Caracterização de α -amilase de
Alphitobius diaperinus (Coleoptera,
Tenebrionidae): efeito de diferentes rações
de aves e dos inibidores de *Phaseolus*
vulgaris / Wellington Oliveira da Cruz -
2011.

62 f. : il.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 45-50.

1. Ave - Doenças - Teses. 2. Rações -
Análise - Teses. 3. Inseto como
transmissor de doenças - Teses. 4. Feijão
comum - Doenças e pragas - Teses. I.
Pontes, Emerson Guedes, 1974-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WELLINGTON OLIVEIRA DA CRUZ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Ciências**, Área de Concentração Bioquímica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 / 09 / 2011



Emerson Guedes Pontes. (Dr.) ICE-DEQUIM-UFRRJ
Orientador e Presidente



Ednildo de Alcântara Machado. (Dr.) IBCCF-CCS-UFRRJ



Cristina Amorim Ribeiro de Lima. (Dr.) DENAP-IZ-UFRRJ

À minha querida família: minha mãe,
Aristina, e meus irmãos, Willians e Sheila
incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar em todos os momentos, me mostrando o caminho certo a ser percorrido. Sua presença é fundamental em minha vida.

À minha família querida, que sempre esteve ao meu lado, me dando atenção e incentivo.

À o Professor Emerson Guedes Pontes, paciência, amizade e confiança dedicadas, nos mais de quatro ano de pesquisa.

À Professora Cristina Amorin, amizade, pela atenção e dedicação.

Aos professores da UFRRJ, Rosane Nora, Cláudio, Sônia, Cristiane, pela atenção e amizade.

Aos professores da UFRJ, Marcia, Danielle, Katia Goldin pela disponibilização dos Laboratórios, e pelo auxílio durante os ensaios experimentais.

A minha amiga, companheira e futura esposa Gisele Motta, pelo carinho, dedicação, amizade e paciência. Também por estar ao meu lado neste momento todo especial da minha vida.

Aos meus tios, Almir, Vadinho e Tia Aurea pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, Valdir e Neta.

Aos meus amigos da UFRRJ, Newtom, Carla, Luiza, Leonardo, Carol, pela amizade, carinho, paciência.

À todos os colegas do Laboratório 25, 22 pelo auxílio e pela paciência.

À coordenação do curso de Pós-Graduação e a todos os funcionários pelas inúmeras colaborações.

À UFRRJ, pela oportunidade e qualidade de ensino.

À CAPES, pelo auxílio nesta Dissertação .

À banca examinadora, por aceitar o convite.

À todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CRUZ, Wellington Oliveira. **Caracterização de α -amilase de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): Efeito de Diferentes Rações de Aves e dos Inibidores de *Phaseolus Vulgaris***. 2011. 50 p Dissertação (Mestrado em Química, Área de Concentração Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Alphitobius diaperinus, conhecido como cascudinho de cama aviária, é uma das principais pragas avícolas. Ele utiliza o substrato das aves rico em proteínas e carboidratos como fonte de alimento, colonizando toda a área de produção, encontrando um ambiente favorável para sua proliferação. Este inseto causa problemas sanitários e econômicos, afetando a saúde e o crescimento das aves e atuando também como transmissor de microrganismos tais como bactérias, protozoários e vírus. Neste trabalho foi identificada a presença de uma α -amilase no extrato bruto de larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus*. Esta enzima digestiva é responsável pela degradação de amido utilizado como combustível na obtenção de energia, sendo extremamente importante para sobrevivência de muitos insetos. A α -amilase foi parcialmente purificada por precipitação em sulfato de amônio (25-75 %) em coluna cromatográfica Sephadex G (50-80), revelando em gel de poliácridamida uma única banda com peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Sua pureza enzimática foi confirmada através de ensaio de atividade pelo método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS), observando-se um aumento de 7.2 vezes em relação ao extrato bruto. A α -amilase ensaiada apresentou uma atividade máxima em pH 5.0 e pH 5.6 e uma temperatura de atividade ótima de 50°C. A atividade máxima da α -amilase de *A. diaperinus* foi alcançada na presença de 0.02 mM de CaCl₂, e inibida com o aumento da concentração deste reagente. A atividade enzimática da α -amilase de *A. diaperinus*, foi significativamente inibida pelo inibidor α -AIs, (inibidores tipo lectina) de *Phaseolus vulgaris*, sugerindo que estes podem ser utilizados como importantes ferramentas biológicas no controle e desenvolvimento de *A. diaperinus* através da redução da atividade digestiva destas pragas devido a atuação desses inibidores sobre a ação catalisadora de amilases, enzimas fundamentais para a digestão de amido.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*. α -amilase. Inibidor α -AIs.

ABSTRACT

CRUZ, Wellington Oliveira. **Characterization of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae) α -amylase: Effect of Different Birds Diet and Inhibitors from *Phaseolus vulgaris*.** 2011. 50 p Dissertação (Mestrado em Química, Área de Concentração Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Alphitobius diaperinus known as mealworm of poultry litter, is one of the main poultry pests. It uses high protein and carbohydrates substrate of birds as a food source, colonizing all the production area finding a favorable environment for its proliferation. This insect causes sanitary and economic problems, affecting not only healthy and growth of the poultry but also acting as a microorganisms transmitter like bacterias, protozoas and virus. In this work it was identified an α -amylase activity in crude extracts of *A. diaperinus* larvae and adults. This enzyme is responsible for starch degradation used as a energy source extremely important for survival of many insects. The α -amylase was partially purified by ammonium sulfate precipitation (25-75%) in a chromatographic Sephadex column G (50-80), polyacrylamide gel revealed only one band with molecular weight of approximately 30 kDa, its purity was confirmed by the method of enzyme activity assay dinitrosalicylic 3.5-alkaline (DNS) was increased 7.2 times when compared with the crude extract. The α -amylase assays presented a maximum activity at a pH 5.0 and pH 5.6 and an optimal activity temperature of 50 ° C. The maximum activity of α -amylase *A. diaperinus* was achieved in the presence of 0.02 mM CaCl₂, and inhibited by increasing this reaction concentration. The enzymatic activity of *A. diaperinus* α -amylase was significantly inhibited by amylase inhibitor α -AIs (lectin-like inhibitor) of *Phaseolus vulgaris*, suggesting that this inhibitors can be used as an important tool in biological control and development of these pests by reducing the digestion reducing amylase activity which plays an important role in the starch digestion.

Key words: *Alphitobius diaperinus*. α -amylase. Inhibitor α -AIs.

LISTAS DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das dietas referências.....10

Tabela 2 - Resumo das Etapas de Purificação da α -amilase de *A. diaperinus*28

LISTAS DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1 - Cascudinho (Adulto), <i>Alphitobius diaperinus</i> (Panzer)..... | 04 |
| Figura 2 - Estrutura tridimensional da α - amilase de <i>Tenébrio molitor</i> | 07 |
| Figura 3 - Curso temporal da atividade de α -amilase de intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> | 17 |
| Figura 4 - Efeito da concentração de proteínas do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> na atividade de α -amilase..... | 18 |
| Figura 5 - Efeito da concentração do substrato na atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> | 19 |
| Figura 6 - Temperatura ótima da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Larvas e adultos)..... | 20 |
| Figura 7 - Inativação térmica a 100 °C da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Larvas e Adultos)..... | 21 |
| Figura 8 - pH ótimo da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Larvas e Adultos)..... | 22 |
| Figura 9 - Efeito da concentração de CaCl ₂ sobre atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> | 23 |
| Figura 10 - Determinação da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> pelo método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955) nos diferentes níveis de purificações..... | 25 |
| Figura 11 - Perfil de eluição da atividade enzimática de <i>Alphitobius diaperinus</i> após ciclo de cromatografia em coluna cromatográfica de Sephadex G(50-80)..... | 26 |
| Figura 12 - Ensaio em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, corado com comassie blue | 27 |
| Figura 13 - Determinação do peso molecular da α -amilase em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, corado com comassie blue..... | 29 |
| Figura 14 - Determinação da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> na presença da (α -AIs), em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante..... | 30 |
| Figura 15 - Determinação da atividade α -amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> na presença da α -AIs, em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 16 - Perda da atividade da α-amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i>, do inibidor de α-amilase (α-AIs) de <i>Phaseolus vulgaris</i> em diferentes variedades..... | 34 |
| Figura 17 - Determinação da atividade α-amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> do inibidor de α-amilase (α-AIs) de <i>Phaseolus vulgaris</i> em diferentes variedades..... | 35 |
| Figura 18 - Perda da atividade da α-amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i>, do inibidor de α-amilase (α-AIs) de <i>Phaseolus vulgaris</i> na presença de diferentes concentrações..... | 36 |
| Figura 19 - Determinação da atividade α-amilase do intestino de <i>Alphitobius diaperinus</i> com inibidor de α-amilase (α-AIs) de <i>Phaseolus vulgaris</i> em diferentes concentrações..... | 37 |
| Figura 20 - Inativação térmica a 100°C do inibidor de α-amilase (α-AIs) de <i>Phaseolus vulgaris</i> em função do tempo..... | 38 |
| Figura 21 - Determinação da atividade enzimática da α-amilase de <i>Alphitobius diaperinus</i> em relação aos tratamentos com as respectivas dietas formuladas para produção em frango de corte..... | 39 |

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| α –AI | inibidor de α - amilase |
| α –AIs | inibidores de α - amilases; |
| α –AI1 | inibidor de α - amilase 1; |
| α –AI2 | inibidor de α - amilase 2; |
| α –AI3 | inibidor de α - amilase 3; |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio; |
| TRIS | 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; |
| U.R | Umidade Relativa; |
| PHA | Fitohemaglutinina; |
| mM | mili – Molar; |
| NaCl | Cloreto de Sódio; |
| C | Celsius; |
| V | Volts; |
| p/v | peso por volume; |
| CaCl ₂ | Cloreto de Cálcio; |
| I ₂ | Iodo; |
| KI | Iodeto de Potássio; |
| DNS | Dinitrosalicílico alcalino; |
| μ L | micro-litro |
| μ g | micro-grama |
| ml | mili-litro |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | Sulfato de Amônio; |
| UV | Ultra – Violeta; |
| DTT | Ditiotreitol; |
| KDa | kilodalton; |
| nm | nanômetro; |
| LBBMA | Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes; |
| ICE | Instituto de Ciências Exatas. |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 03 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 04 |
| 3.1 Enzimas Digestivas de Insetos..... | 05 |
| 3.2 Inibidores de Enzimas Digestivas de Insetos..... | 08 |
| 3.3 Inibidores de <i>Phaseolus vulgaris</i> | 08 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 10 |
| 4.1 Colônias de insetos..... | 10 |
| 4.2 Dosagem de proteínas..... | 10 |
| 4.3 Ração..... | 10 |
| 4.4 Preparo dos homogeneizados intestinais de <i>Alphitobius diaperinus</i> | 11 |
| 4.4.1 Dissecção do Inseto | 11 |
| 4.4.2 Homogeneização do Tubo Digestivo do Inseto..... | 12 |
| 4.5 Zimograma | 12 |
| 4.6 Determinação da atividade de α -amilase..... | 12 |
| 4.7 Purificação parcial do extrato bruto enzimático..... | 13 |
| 4.8 Purificação parcial dos inibidores de <i>Phaseolus vulgaris</i> | 13 |
| 4.9 Determinação da temperatura ótima da atividade da α -amilase..... | 14 |
| 4.10 Inativação Térmica da Atividade da α -amilase..... | 14 |
| 4.11 Determinação do pH ótimo na atividade da α -amilase..... | 14 |
| 4.12 Avaliação do efeito da concentração de CaCl_2 na atividade da α -amilase..... | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 4.13 Avaliação da atividade da α - amilase do extrato bruto e do tecido epitelial do tubo digestivo de <i>Alphitobius diaperinus</i> em relação a os tratamentos com as respectivas rações para frango de corte e postura..... | 14 |
| 5. RESULTADOS..... | 16 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 40 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 44 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por alimentos, principalmente nos países em desenvolvimento, veio acompanhado de um mercado consumidor exigente por produtos de qualidades para consumo humano, exigindo que os métodos de produção utilizados na agricultura leve em consideração o bem estar dos animais, além disso essa exigência no mercado por produtos de qualidade superior, vem alcançando níveis elevados de segurança alimentar. Este aumento da densidade de aves domésticas e o confinamento na produção sob a direção de integradores, intensificou a importância de um seletivo número de artrópodes, ectoparasitas e pragas. Este confinamento das aves proporciona a formação de ecossistemas artificiais que são, por vezes, ideal para o desenvolvimento de grandes populações de pragas (Arends *et al* 1987).

As pragas aumentam o custo de produção e é um dos principais fatores na propagação de doenças aviárias. A biologia, comportamento, controle de ectoparasitas e pragas são descritos em relação à habitação e diferentes práticas de produção para os criadores de frangos (Axtell *et al* 1999).

O *Alphitobius diaperinus* são causadores de problemas sanitários, comumente infestando sistemas de produção de aves, quando associados a esses agroecossistemas, alimentam – se de aves moribundas, das carcaças, fezes e ração das aves (Leschen e Steelman 1988). Em função disso há um incremento da umidade produzida pela cama aviária, proveniente tanto das excretas das aves, como da água dos bebedouros, faz do *Alphitobius diaperinus* um vinculador de diversos patógenos, destacando – se bactérias, protozoários, vírus que causam imunossupressão das aves, (Chernaki *et al* 2001).

O *Alphitobius diaperinus* distribuem – se espacialmente em toda área de produção avícola, são consideradas pragas estruturais por danificarem seriamente as instalações. Devido ao sistema intensivo de produção que utiliza piso de terra batida ou cimento, coberto com maravalha ou cepilho que, juntamente com a temperatura e umidade elevadas, favorecem o desenvolvimento do *Alphitobius diaperinus*. Durante a fase larval, os insetos vivem em meio à cama aviária, frestas das paredes e no solo, onde passam à fase pupal. Este hábito permite sua sobrevivência na retirada da cama e uma posterior reinfestação do aviário após a colocação do novo substrato (Arends *et al* 1987).

O fato de possuir hábito alimentar bem diversificado, as enzimas digestivas desses insetos estão diretamente relacionadas a partir da natureza de sua alimentação (Sarin *et al* 1973). Estudos sobre enzimas de insetos, em particular aquelas que participam na digestão dos alimentos, são de importância óbvia para a compreensão das suas necessidades nutricionais e dos processos metabólicos. A presença ou ausência de uma enzima determina a disponibilidade de certos alimentos. O problema da nutrição e do metabolismo dos insetos deve ser considerado como uma importante ferramenta, utilizada para o controle bem sucedido de insetos (Sarin *et al* 1973).

A fim de obter energia para seu desenvolvimento, os insetos contam com uma grande variedade de enzimas hidrolíticas, dentre estas a α -amilase (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolase), que catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas, transformando polissacarídeos em mono e dissacarídeos. (Franco *et al* 2005).

A adoção de medidas de controle do *Alphitobius diaperinus* é dificultada pela presença constante das aves, sendo que os agrotóxicos usados inadvertidamente podem causar intoxicação nos avicultores, aves e além de deixar resíduos químicos na carne utilizada para consumo humano, favorecer a seleção de populações resistentes de insetos e reduzir a quantidade de inimigos naturais, contribuindo para maior infestação de praga nos aviários.

Plantas produzem substâncias como alcalóides, fenóis, β -1,3-glucanases, lectinas e inibidores de enzimas para se defender contra predadores e patógenos (Silva *et al* 2007). Os inibidores protéicos de α -amilase (α -AIs) extraídos de *Phaseolus vulgaris*, inibem α -amilase

digestiva (Payan *et al* 2004). Estes inibidores são classificados de acordo com sua estrutura terciária (Franco *et al* 2002). Constituindo uma importante ferramenta biológica que pode ser usada no controle do desenvolvimento de pragas através da redução da digestão de carboidratos (Grossi de Sá *et al* 1997).

Os inibidores protéicos de enzimas digestivas têm sido amplamente estudados para insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, demonstrando eficiência contra essas pragas de grande importância econômica (Sivakumar *et al* 2006). Despertando grande interesse na utilização desses compostos com atividade específica as baixas concentrações, que permite um controle mais adequado desses insetos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.

- Caracterizar o efeito de inibidores de *Phaseolus vulgaris* na atividade enzimática da α -amilase no trato digestivo de *Alphitobius diaperinus*.

2.2 Objetivo Específico.

- Determinação e caracterização da atividade enzimática de α -amilase, presente no trato digestivo de *Alphitobius diaperinus*.

- Efeito de diferentes rações, de frangos de corte e uma ração de galinha poedeira, sobre a atividade da α -amilase digestiva de *Alphitobius diaperinus*.

- Estudo de potenciais inibidores de α -amilase, presentes nas sementes de *Phaseolus vulgaris* com atividade biológica contra *Alphitobius diaperinus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família *Tenebrionidae* compreende cerca de 1.700 gêneros e 18.000 espécies (Booth *et al* 1990), destas, aproximadamente 100 têm sido registradas em associação com produtos armazenados e diversas espécies são reconhecidas como importantes pragas secundárias. Estas espécies são consideradas cosmopolitas e pragas de grãos armazenados (Preiss *et al* 1970) A coleopterofauna avícola têm grande influência na predação de larvas de dípteros (Lomônaco *et al* 1994), onde as infestações dessas pragas em instalações avícolas são responsáveis por ocasionarem problemas sanitários e prejuízos financeiros.

O *Alphitobius diaperinus* é um inseto da ordem Coleóptera, denominado vulgarmente de cascudinho da cama das aves ou “lesser mealworm”, com a capacidade de adaptar-se nesses ambientes de produção avícola pelo qual a disponibilidade de alimentos e condições ideais como temperatura e umidade pelo qual favorece o seu desenvolvimento (figura 1).



Figura 1. Cascudinho (Adulto), *Alphitobius diaperinus* (Panzer).

Fonte: www.ozanimals.com/Insect/Lesser-Mealworm-beetle/Alphitobius/diaperinus.html

O ciclo de desenvolvimento do *Alphitobius diaperinus*, dura dentre 40 a 100 dias (Dunford e Kaufman 2006). As fêmeas produzem ovos durante a maior parte da vida com aproximadamente cinco dias de intervalo, chegam a pôr aproximadamente 2000 ovos, estes ovos eclodem entre quatro e sete dias, e o completo desenvolvimento da larva até o estágio adulto é dividido em aproximadamente seis a onze “instar”, que pode durar entre 35 e 65 dias, (Dunford e Kaufman 2006). No campo o adulto de *Alphitobius diaperinus* vive aproximadamente um ano podendo viver mais de dois anos em condições experimentais (Falomo *et al* 1986).

Em estudo sobre o efeito da temperatura nas fases imaturas de *Alphitobius diaperinus*, houve desenvolvimento em todas as temperaturas estudadas (22°C, 25°C, 28°C e 31°C), sendo que a 22°C foi constatada maior duração do desenvolvimento e menor sobrevivência. A temperatura de 31°C mostra se a mais favorável para o desenvolvimento com alta sobrevivência (Chernaki *et al* 2001).

Em outro estudo foi observado que as larvas necessitam de elevados teores de umidade para seu desenvolvimento (>80% U.R.) (Silva *et al* 2001), o que favorece a multiplicação de fungos nas camas aviárias, mas aparentemente, não alteraram o ciclo do coleóptero. Existem registros de correlação positiva entre a presença do fungo *Aspergillus* e bom desenvolvimento de *Alphitobius diaperinus* (Wilson *et al* 1968).

Outra das características do *Alphitobius diaperinus* é apresentar-se como disseminador patogênico como bactérias (*Salmonella Typhimurium*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Streptococcus sp*), protozoários (*Eimeria sp*, *Gregarina alphitobii*, *Histomonas meliagridis*), vírus (*Gumboro*, *Leucose e Reovirus*), Helmintos (*Choetaenia infundibulum*, *Raillietina cestocillus*, *Hymenolepis carioca*, *H. cantiana*, *Heterakis gallinae*), fungos (*Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Candida sp*), (Snedeker *et al* 1967). Além de prejudicar a conversão alimentar no ganho de peso, pois as aves desenvolvem o hábito de se alimentar das larvas do inseto no lugar da ração balanceada, proveniente do contato direto com as aves, (Goodwin *et al* 1996). A sua presença é rotineiramente verificada na cama dos aviários durante pesquisa bacteriológica, e há relatos que os adultos de *Alphitobius diaperinus* são capazes de veicular *Salmonella Typhimurium* (De las Casas *et al* 1968).

Diante de um ambiente favorável na proliferação do *Alphitobius diaperinus*, medidas de controle se tornam necessárias para amenizar perdas e os prejuízos ocasionados pelo inseto praga. A utilização de práticas de manejo e a utilização de produtos químicos sintéticos como organofosforado e piretroides são os métodos de controles comumente utilizados (Chernaki *et al* 2001). Porém um dos principais entraves são os altos níveis de contaminação gerados por esses produtos químicos, problemas como acúmulo de resíduos no ambiente de produção, no desenvolvimento de populações resistentes, riscos de contaminação tanto do produtor como das aves (Arends *et al* 1987).

3.1 Enzimas Digestivas de Insetos.

Uma das principais características da Classe Insecta é a capacidade de adaptarem-se nos mais diversos tipos de ambientes e possuir hábito alimentar bem diversificado. Oriundo dessa diversificação, os alimentos absorvidos são constituídos de diferentes compostos químicos. Conseqüentemente esses animais desenvolveram a habilidade de expressar diferentes enzimas digestivas, no tubo digestivo. Grande parte das dietas utilizadas por esses insetos pragas, também são utilizados como importante fonte de alimento para humanos, exemplo disso são as sementes de leguminosas ricas em proteínas, carboidratos e lipídeos, que deste modo sofrem predação. Por possuírem essas habilidades alguns podem ser classificados como pragas em culturas agrícolas, em estocagem de alimentos e grãos, das indústrias e da saúde humana (Terra *et al* 1996).

Os insetos possuem a capacidade de modular as enzimas digestivas, complementares àquelas utilizadas primariamente, em quantidades relativas em resposta ao diferentes tipos de dietas (Terra *et al* 1994). Esses insetos possuem características específicas quanto ao mecanismo de absorção dos alimentos, podendo ser mastigadores, quando são adaptados para alimentar - se diretamente sobre os tecidos das plantas e os sugadores que são adaptados para alimentar - se da seiva bruta das plantas, sendo ambos os mecanismos responsáveis por danos físicos ou contaminações sistêmicas por patógenos veiculados, proporcionando a morte da planta (Eidson *et al* 1965).

A ocorrência das diferentes enzimas digestivas presentes no tubo digestivo dos insetos é principalmente devido à composição química da dieta ingerida, uma gama extensa de nutrientes, é absorvido e metabolizado por eles (Terra *et al* 1996). A degradação desses alimentos ingeridos pelos insetos ocorre em três etapas distintas. Primeiramente a diminuição do peso molecular procedente da degradação das macromoléculas que constituem os

alimentos através da ação das hidrolases, tais como amilases, celulasas, proteases. Após a fragmentação dos polímeros, os oligômeros resultantes sofrem uma segunda hidrólise por hidrolases específicas onde os produtos formados nesta fase são dímeros ou pequenos oligômeros como maltose, celobiose, dipeptídeos derivados do amido, celulose e proteína e finalmente os dímeros são clivados por hidrolases como maltase, celobiase originando monômeros, moléculas simples que posteriormente é absorvida pelas células digestivas (Terra *et al* 1996).

As enzimas amilolíticas, formam um grande grupo de enzimas que tem o amido como substrato e estão relacionadas na degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos. São conhecidas três estruturas amilolíticas específicas as α -amilases, β -amilases e as glicoamilases. Apesar do fato de que elas tenham funções relacionadas, catalisam as ligações glicosídicas no mesmo substrato, porém estruturalmente e mecanicamente são bastante diferentes (Janecek *et al* 2000).

As α -amilases constituem uma família de endo-amilases que catalisam preferencialmente a hidrólise nas cadeias glicosídicas com ligações α -1,4. Essas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo de carboidratos de microorganismos, plantas e animais.

Embora vários seqüenciamentos de α -amilases de insetos sejam conhecidos, foi determinada uma estrutura tridimensional da α -amilase da larva de Tenébrio molitor (Strobl *et al* 1998). Esse modelo estrutural da α -amilase desse inseto, correspondente a uma cadeia polipeptídica constituída de resíduos de aminoácidos, determinou a presença de um íon de cálcio, um íon de cloro e moléculas de água (Strobl *et al* 1998).

A proteína é subdividida em três domínios distintos, denominados A, B e C (figura 2). O domínio A, é a principal unidade estrutural da α -amilase do Tenébrio Molitor é composto por dois segmentos, este domínio contém o sítio catalítico e os resíduos ligantes (Strobl *et al* 1998); o domínio B é globoso e está inserido no domínio A. Ele é formado por diversos segmentos, este domínio constitui uma cavidade contra o domínio A, onde está vinculado o íon cálcio, sendo de fundamental importância para a integridade estrutural da α -amilase e finalmente, o domínio C que está localizado exatamente ao lado oposto do domínio B do outro lado do domínio de A. O domínio C compreende os resíduos do C-terminal (Strobl *et al* 1998).

A estrutura cristalina da α -amilase de Tenébrio Molitor contém um ânion cloreto, onde a presença desse ânion pode ser capaz ativar alostéricamente a α -amilase, devido à sua proximidade com as moléculas de água sendo a nucleofilicidade desta molécula reforçada com a carga negativa do ânion cloreto (Buonocore *et al* 1976). Em Tenébrio Molitor o mecanismo fisiológico do processo digestivo, as α -amilases são sintetizados nas células do intestino médio anterior e secretadas no complexo de Golgi através vesículas secretoras que se fundem, à medida que migram para o ápice da célula digestivas (Cristofolletti *et al* 2001). Ao mesmo tempo, as células sofrem uma desorganização estrutural com o desaparecimento das organelas celulares onde no citoplasma apical uma grande estrutura membranosa contendo a amilase é descarregada no lúmen do intestino médio. Após a extrusão do citoplasma apical a célula permanece aparentemente funcional (Cristofolletti *et al* 2001).



Figura 2. Estrutura tridimensional da α - amilase de *Tenébrio molitor*.

Domínio A (verde), B (vermelho) e C (laranja). A estrutura contém um íon de cálcio (amarelo) e um íon cloreto (azul), fonte: Kraulis *et al* 1991.

3.2 Inibidores de Enzimas Digestivas de Insetos.

Dietas a base de amido são preferencialmente utilizadas pelos insetos como combustíveis para obtenção de energia necessária para garantir sua sobrevivência. Assim sendo a α -amilase é uma das enzimas específica empregada no metabolismo de carboidratos.

Como alguns insetos são extremamente dependentes da α -amilase para sobreviverem, isoformas de α -amilase podem ser encontradas em uma mesma espécie, garantindo a eficiência do processo digestivo (Baker *et al* 1983).

Por proporcionarem um importante papel na sobrevivência dos insetos, as α -amilases podem ser utilizadas como alvo para biopesticidas, utilizando inibidores protéicos, que são um dos mais variados mecanismos de defesa expressos pelas plantas, em resposta ao ataque desses insetos pragas. (Franco *et al* 2002).

Em seu processo evolutivo as plantas de uma maneira geral desenvolveram um certo grau de resistência através da produção de compostos de defesas, que podem ser protéicos ou não protéicos. Os inibidores protéicos de enzimas digestivas impedem a digestão através de sua ação sobre amilases e proteases presente no tubo digestivo do inseto, que desempenham um papel chave na digestão dos amido e proteínas (Silva *et al* 2007).

Esses inibidores protéicos de α -amilase e proteases foram classificados de acordo com sua estrutura terciária em seis diferentes classes: tipo lectina, knotina, cereal, kunitz, γ -puritionina e taumatina, (Richardson *et al* 1991), o inibidor estudado durante este projeto foi o inibidor tipo lectina oriundo de sementes de feijão.

Esses inibidores apresentam variedades estruturais notáveis levando a diferentes mecanismos de inibição e perfis de especificidades distintos contra vários tipos de amilases (Franco *et al* 2002). A especificidade da inibição é uma questão importante como o inibidor instituído não deve prejudicar a própria α -amilase da planta e nem o valor nutricional da cultura (Franco *et al* 2002).

3.3 Inibidores de *Phaseolus vulgaris*.

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) contêm uma família de proteínas de defesa metabolizadas pelas plantas, que inclui fitohemaglutinina (PHA), arcelina, e um inibidor de α -amilase (α -AI). Estas três proteínas possuem mecanismos muito diferentes de ação. PHA é uma lectina que se liga ao glicanos da mucosa intestinal de mamíferos e age como um mitógeno enquanto a arcelina, que também é uma proteína tipo lectina, liga-se a membrana peritrófica de larvas de insectos, impedindo assim a absorção de nutrientes. Enfim, α -AI (uma lectina incompleta) inibe a atividade da α -amilase de certos mamíferos e insetos (Nodan *et al* 1993).

As α -AIs compreendem duas subunidades não covalentemente ligadas a glicopeptídeos e que para chegarem a sua forma ativa são pós-traducionalmente modificadas, onde as α -AI1 são proteóliticamente ativadas. As α -AI2 mostram clivagens semelhantes as das α -AI1, mas com um padrão de glicosilação um pouco diferente.

Ambas isoformas dos inibidores em sua forma madura tem uma estrutura heterotetramérica de duas cadeias α e duas cadeias β (Kasahara *et al* 1996) e são altamente glicosilada (Young *et al* 1999). Alguns trabalhos sugerem que esses diferentes níveis de glicosilação podem não ser responsáveis pela atividade inibitória (Pueyo *et al* 1993).

As α -AIs têm sido purificadas e parcialmente caracterizadas a partir de diferentes variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), incluindo o feijão branco, vermelho e preto. A isoforma mais caracterizada, conhecida como α -AI1, foi clonado e identificado como um inibidor da α -amilase homóloga à fitohemaglutinina (PHA), (Moreno *et al* 1989). A segunda variante de α -AIs, chamada de α -AI2, é encontrado em algumas variedades selvagens

de feijão (Grossi de Sá *et al* 1997). Estas duas isoformas alélicas têm especificidades distintas de inibição.

As mutações nas estruturas primárias das isoformas de α - AIs, determinou uma homologia em torno de 78% de uma variante α -AIs para outra, pelo qual essas mutações são responsáveis por um padrão diferente de especificidade por uma mesma amilase (Grossi de Sá *et al* 1997). A α -AI1 inibem α -amilases de mamíferos e as α -amilases do intestino médio de larvas de *Callosobruchus chinensis* e *Callosobruchus maculatus*, porém não α -amilases de *Zabrotes subfasciatus*. Por outro lado, α -AI2 não inibe as três primeiras α -amilases mencionadas acima, mas inibe a α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* (Ishimoto *et al* 1996). Uma terceira isoforma α -AI3, isolada de *Phaseolus vulgaris* da variedade Rico 23, uma proteína de cadeia simples se apresentou completamente inativa quando testadas em várias α -amilases, como exemplo α -amilases do suco pancreático de suíno (Finardi-Filho *et al* 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colônias de insetos

Os insetos *Alphitobius diaperinus*, utilizados nos experimentos foram mantidos em recipientes de plásticos com ração balanceada de criação de frango de corte e serragem como cobertura para manter a umidade. Todo material foi previamente autoclavados para evitar qualquer tipo de contaminação de campo que viesse a influenciar nos resultados das análises. Os recipientes são cobertos com tecido (filó) e fechados com elástico para evitar a infestação de insetos ou outros tipos de contaminantes. Esses recipientes foram mantidos em estufa com temperatura controlada com a finalidade de se manter a umidade em torno dos 60% e temperatura de 30 °C. Os insetos *Alphitobius diaperinus*, na fase adulta foram fornecidos pelo Centro de Criação Avícola da UFRRJ e mantidos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes do Departamento de Química - ICE - UFRRJ.

4.2 Dosagem de proteínas.

As quantificações de proteínas foram realizadas segundo o método de Lowry (1951), utilizando como padrão uma curva com diferentes concentrações de Albumina.

4.3 Ração

As rações utilizadas como fonte de alimento para obtenção da colônia de *Alphitobius diaperinus* foram fabricadas na fábrica de ração do Centro de Produção Integrada da UFRRJ para utilização no setor de avicultura. Sempre que necessárias pequenas quantidades de ração eram retiradas das sacarias armazenadas no galpão de frangos.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas referência.

| Ingredientes (%) | Inicial | Crescimento | Abate | Postura |
|------------------------------------|---------|-------------|--------|---------|
| Milho (7.59%) | 56.733 | 54.381 | 68.165 | 64.978 |
| Farelo de soja (47.1%) | 37.551 | 37.956 | 26.439 | 22.478 |
| Oleo de soja | 2.315 | 4.253 | 2.455 | 0.445 |
| Fosfato bicálcico | 1.442 | 1.448 | 1.016 | 1.248 |
| Calcário calcítico | 0.884 | 0.879 | 0.760 | 9.795 |
| Cloreto de sódio | 0.481 | 0.482 | 0.444 | 0.384 |
| DL - metionina | 0.215 | 0.218 | 0.226 | 0.122 |
| Suplemento mineral ¹ | 0.100 | 0.100 | 0.207 | 0.400 |
| Suplemento vitamínico ² | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.100 |
| L – lisina HCl | 0.078 | 0.070 | 0.100 | 0.010 |
| Cloreto de colina | 0.050 | 0.050 | 0.049 | 0.040 |
| Salinomicina Salig 120 | 0.040 | 0.042 | 0.000 | 0.000 |
| Colistidina - 80 | 0.010 | 0.020 | 0.000 | 0.000 |
| Total % | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

| Nutrientes | Composição calculada | | | |
|--|----------------------|--------|--------|--------|
| Ácido linoléico | 2.531 | 3.535 | 2.743 | - |
| Arginina Dig. aves (%) | 1.447 | 1.452 | 1.120 | - |
| Arginina total (%) | 1.536 | 1.540 | 1.191 | - |
| Cálcio (%) | 0.819 | 0.819 | 0.638 | 4.150 |
| Cloro (%) | 0.334 | 0.333 | 0.311 | 0.272 |
| Energia Met. Ap. Aves (Kcal/Kg) | 3.000 | 3.100 | 3.150 | 2.760 |
| Fósforo disponível (%) | 0.391 | 0.391 | 0.298 | 0.330 |
| Fósforo total (%) | 0.647 | 0.645 | 0.523 | 0.532 |
| Lisina digestível aves (%) | 1.193 | 1.193 | 1.031 | 0.750 |
| Lisina total (%) | 1.294 | 1.294 | 1.114 | 0.820 |
| Metionina + cistina total (%) | 0.932 | 0.932 | 0.813 | 0.663 |
| Metionina + cistina total digestível (%) | 0.453 | 0.852 | 0.748 | 0.606 |
| Metionina digestível aves (%) | 0.527 | 0.528 | 0.471 | 0.358 |
| Metionina total (%) | 0.558 | 0.529 | 0.495 | 0.380 |
| Proteína bruta (%) | 22.193 | 22.199 | 18.000 | 15.600 |
| Sódio | 0.210 | 0.210 | 0.195 | 0.170 |
| Treonina Dig. aves | 0.777 | 0.776 | 0.667 | - |
| Treonina total | 0.880 | 0.880 | 0.758 | 0.626 |
| Triptofano Dig. Aves | 0.252 | 0.255 | 0.194 | - |
| Triptofano total | 0.280 | 0.281 | 0.216 | 0.189 |

¹ Ferro (min) 60 g/kg; cobre (min) 13 g/kg; manganês (min) 120 g/kg; zinco (min) 100 g/kg; iodo (min) 2.500 mg/kg; selênio (min) 500 mg/kg. ² Vitamina A (min) 7.500.000 UI/kg; vitamina D3 (min) 2.500.000 UI/kg; vitamina E (min) 1.200 mg/kg; vitamina K3 (min) 1.200 mg/kg; tiamina (min) 1.500 mg/kg; riboflavina (min) 5.500 mg/kg; piridoxina (min) 2000 mg/kg; vitamina B12 (min) 12.000 mcg/kg; niacina 35g/kg; panteonato de cálcio (min) 10 g/kg; biotina (min) 67 mg/kg.

4.4 Preparo dos homogeneizados intestinais de *Alphitobius diaperinus*.

4.4.1 Dissecção do Inseto.

As larvas de último instar e adultos foram dissecados. A dissecção foi realizada em solução de NaCl 0.15 M na presença de gelo com o auxílio de pinças e um estereoscópio, de modo que todo o trato intestinal tanto das larvas e adultos fossem removidos íntegros que os demais tecidos estranhos às paredes intestinais, tais como corpo gorduroso e tubos de Malpighi fossem coletados. Os intestinos médios foram acondicionados em tubos criogênicos e estocados em nitrogênio líquido.

- Etapas do Processo de Dissecção.

1º. As larvas de último instar e adultos escolhidos foram imobilizados em gelo, sendo uma forma de anestésiar os animais e também serve para facilitar a dissecção, pois cessam os movimentos;

2º. Sobre um recipiente de cerâmica, foi colocada solução salina na concentração (NaCl 0,15 M) na presença de gelo, Prosseguindo sob estereomicroscópio (lupa) a dissecção;

3º. Utilizando duas pinças finas, fixando firmemente a cabeça e o primeiro segmento torácico;

- 4°. Puxe para os dois lados assim deslocando a cabeça da larva;
- 5°. Desprendendo cuidadosamente os dois últimos segmentos abdominais dos demais;
- 6°. Segurando o corpo puxando os últimos segmentos sem que rompa o intestino;
- 7°. Depois de retirado o intestino médio foi isolado da parte anterior aos Túbulos de Malpighi.

4.4.2 Homogeneização do Tubo Digestivo do Inseto.

Os intestinos foram homogeneizados em água mili-Q, utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem mantido constantemente em banho de gelo. No homogeneizado foi utilizado um volume de 200µL de água mili-Q e dez intestinos médios extraídos de larvas ou adultos de *Alphitobius diaperinus* como padrão para cada experimento. O homogeneizado foi centrifugado a 9000 x g por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para os ensaios enzimáticos e eletroforese.

4.5 Zimograma.

O homogeneizado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (12%), parcialmente desnaturante, sem β - mercaptoetanol de acordo com (Laemmli *et al* 1970), em sistema BioRad Mini-protein I, empregando-se uma voltagem de 120V. Ao término da corrida, o gel foi transferido para uma solução de Triton X-100, 2.5% (p/v) por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir a renaturação das enzimas e diminuir a concentração de Tris no meio. Após a renaturação o gel foi transferido para uma solução de amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM e incubado a 37°C por 30 minutos. Após o tempo de incubação o gel foi ligeiramente lavado com água deionizada para retirar o excesso de amido e a atividade amilolítica foi parada transferindo-se o gel para uma solução de I₂ 1.3% (p/v) e KI 3% (p/v). O iodo interage com o amido gerando uma coloração marrom na parte do gel onde ainda existe amido, e deixando incolores partes do gel nas quais houve atividade amilolítica.

Em paralelo foi corrido um gel nas mesmas condições utilizando como amostra padrões de proteínas de diferentes pesos moleculares, (Miosina - 209 kDa, β - Galactosidase - 117 kDa, Albumina bovina - 97 kDa, Ovalbumina - 55 kDa, Anidrase carbônica- 37 kDa, Inibidor de Tripsina de Soja - 29 kDa, Lisozima - 19 kDa). A o final da corrida o gel foi corado com corante de Coomassie Brilliant Blue, o qual identifica as bandas de proteína. Este segundo gel teve como finalidade determinar o peso molecular da α -amilase. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes do Departamento de Química - ICE - UFRRJ.

4.6 Determinação da atividade de α -amilase.

A atividade de α -amilase foi determinada pela detecção de açúcar redutor (mU/µg de proteína do homogeneizado), utilizando o método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955). Os ensaios foram realizados incubando-se 20µL do homogeneizado com 250µL de amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM a 37°C durante 10 minutos. A reação é parada adicionando-se 250µL de DNS, são acrescentados 2.5mL de água e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro

(Shimadzu–UVmini-1240) a 550 nm. Foi construída uma curva com diferentes concentrações de maltose 60, 120, 180, 240 e 300 mg/mL. Os homogeneizados do trato digestivo utilizados para os experimentos foram extraídos de diferentes repetições. Os ensaios foram realizados em triplicatas, para cada repetição. Em todos os ensaios conduzidos foi utilizado um controle negativo contendo 20µL de água e 250µL do substrato em condições idênticas à de cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes do Departamento de Química – ICE – UFRRJ.

4.7 Purificação parcial do extrato bruto enzimático.

Homogeneizado com 200 intestinos de larvas de *Alphitobius diaperinus*, foi precipitado com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25%, em seguida a solução foi centrifugada a 14.000 x g por 60 minutos à 4°C. Após o processo de centrifugação o sobrenadante foi removido e saturado novamente com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 75% e levado a centrifugação a 14.000 x g por 60 minutos à 4°C, em seguida a proteína precipitada foi coletada e redissolvida em tampão acetato 0.1 M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl_2 0.2 mM e filtrado em membrana de nylon 0.45µm.

Em seguida foi utilizado um mililitro do extrato purificado parcialmente com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25% - 75% e acondicionado em uma coluna cromatográfica Sephadex G (50-80) de 1.6 x 60 cm, eluído com tampão acetato pH 6.0 em um fluxo 20mL/h. Coletados 80 frações de 2 mL cada. Imediatamente cada fração foi subdividida em duas alíquotas de um mililitro pelo qual foi realizado o monitoramento de proteína por absorvância em 280nm e análise da atividade enzimática utilizando o método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955), ambas as análises realizadas por espectrofotometria (Shimadzu–UV mini-1240).

Após o processo de purificação, foram utilizados 15µL do homogeneizado do extrato bruto, 15 µL do homogeneizado do extrato bruto após à precipitação em sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 15µL da fração de maior atividade enzimática após a cromatografia em sephadex G (50-80), foram submetidas em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante de acordo com (Laemmli *et al* 1970). Corado com Coomassie Brilliant Blue para determina os diferentes níveis de purificações.

Para todas as etapas foi realizada dosagem de proteína pelo método de (Lowry) e determinação da atividade enzimática utilizando o método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955).

4.8 Purificação parcial dos inibidores de *Phaseolus vulgaris*.

As sementes de seis variedades de *Phaseolus vulgaris* (Ouro Negro, Feijão xodó, Mulatinho, Kaboom, Aporé e Carioca), foram descascadas e moídas em farinha grossa em um moinho de mão, em seguida, foram pesados 25g de cada variedade e extraídos por agitação durante 1 hora a temperatura ambiente, com 75 ml de solução de cloreto de sódio (1%). Após o processo de agitação todo material foi centrifugado na centrifuga modelo (SIGMA 3K 30) a 27.000 x g por 30 minutos a 4°C. Em seguida o material sobrenadante foi removido e aquecido à 70°C, durante 15 minutos, após o processo de coagulação das proteínas, a solução foi centrifugada a 27.000 x g, por 60 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e dialisado em água à 4°C durante 12 horas. Todo material foi desidratado por liofilização.

Após a liofilização formou-se um pó fino. Foi pesado 10mg de todas as variedades, em seguida diluídos em 300µL de água milli-Q, em seguida foi quantificada a proteína pelo método de Lowry (1951). Os ensaios de inibição foram realizados pré-incubando 10µL do homogeneizado de intestino de *Alphitobius diaperinus* em 10µg do inibidor, testado durante

10 minutos a uma temperatura de 37°C, em seguida foi adicionado 250µL de amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1 M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM à 37°C por 10 minutos. Foi utilizado um controle negativo, no qual a quantidade de homogeneizado fora substituído por água milli-Q para cada inibidor e um controle positivo sem a presença de inibidores.

4.9 Determinação da temperatura ótima da atividade da α -amilase.

Os ensaios para determinar a temperatura ótima de ação da α -amilase (Larvas e Adultos) foram realizados incubando-se 20µL do homogeneizado com 250µL de amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM por 10 minutos nas seguintes temperaturas: 4, 10, 25, 35, 37, 40, 45, 50, 60 e 80 °C. Foi utilizado um controle negativo para cada temperatura.

4.10 Inativação Térmica da Atividade da α -amilase.

O homogeneizado (Larvas e Adultos) foi mantido a 100°C por 0, 2, 5, 20, 40, 60 minutos, imediatamente resfriado. A atividade residual foi determinada incubando-se 20µL do homogeneizado com amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1M, NaCl 20 mM, CaCl₂ 0.2 mM, pH 5.6 a 37°C por 10 minutos.

4.11 Determinação do pH ótimo na atividade da α -amilase.

Os ensaios para determinar o pH ótimo de ação da enzima foram realizados incubando-se 20µL do homogeneizado com amido 1% (p/v) em tampão 0.1M contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM a 37 °C por 10 minutos. Utilizando os seguintes tampões Acetato, Fosfato, Tris e Citrato.

Os pHs utilizados nos ensaios para determinação do pH ótimo da atividade enzimática do intestino de *Alphitobius diaperinus* (Larvas e Adultos) foram: (3.5, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5).

4.12 Avaliação do efeito da concentração de CaCl₂ na atividade da α -amilase.

Os ensaios para avaliar o efeito da concentração de CaCl₂ no meio reacional na ação da enzima foram realizados incubando-se 20µL do homogeneizado com 175 µL de amido 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5.6, contendo NaCl (20 mM) na presença de 50 µL de EGTA a 1 mM a uma temperatura de 37°C por 10 minutos, contendo 25 µL de CaCl₂ nas seguintes concentrações: (0.005, 0.02, 0.5, 2, 10, 50, 250)mM. Foi utilizado o programa Ca-EGTA Calculator v1.3 para determinar a concentração de metal livre na presença de quelantes.

4.13 Avaliação da atividade da α - amilase do extrato bruto e do tecido epitelial do tubo digestivo de *Alphitobius diaperinus* em relação a os tratamentos com as respectivas rações para frango de corte e postura.

As larvas de *Alphitobius diaperinus* foram submetidas a diferentes tipos de tratamentos. As rações utilizadas foram às mesmas consumidas pelos frangos nas fases: inicial,

crescimento e abate de frangos de corte e uma ração de galinha em postura. Essas rações foram utilizadas no ensaio para determinar o comportamento e o seu efeito sobre a atividade enzimática das larvas de *Alphitobius diaperinus* quando alimentadas nos diferentes tipos de tratamentos.

As larvas foram submetidas a um jejum de 48 horas. Após esse período foram alimentadas durante 48 horas nos diferentes tipos de rações formuladas.

Para determinar a atividade enzimática da α -amilase das larvas de *Alphitobius diaperinus*, foram utilizados para os ensaios homogeneizados contendo todo trato digestivo das larvas e homogeneizados somente do tecido epitelial do tubo digestivo das larvas, pelo qual foram alimentadas com os diferentes tipos de rações. Para cada ensaio foram utilizadas 15 larvas para cada tipo de ração.

5 RESULTADOS

Após determinar a concentração de proteína, foi determinada e caracterizada a presença de atividade de α -amilase no homogeneizado do trato digestivo do *Alphitobius diaperinus*. Essa atividade enzimática foi determinada pelo método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955), experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes do Departamento de Química – ICE – UFRRJ (figuras 3, 4 e 5).

Foi determinada a temperatura ótima de atividade da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*. Para isso, o homogeneizado foi incubado com o substrato por 10 minutos nas seguintes temperaturas: 4, 10, 25, 35, 37, 40, 45, 50, 60 e 80 °C, juntamente com um controle negativo para cada temperatura (figura 6). Embora a temperatura ótima para α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, foi de 50°C a enzima se mostrou ativa entre 10 – 60°C, mas em temperaturas abaixo de 25°C apresentou uma atividade abaixo de 20% e a temperaturas acima de 60°C perdeu atividade enzimática.

Foi determinada a inativação térmica do extrato enzimático. Para isso as amostras de intestinos de larvas e adultos foram mantidas a 100°C por diferentes tempos e sua atividade residual foi determinada. A amostra perdeu mais de 70% de sua atividade em cerca de dois minutos a temperatura de 100 °C (Larvas e Adultos). Em um intervalo de tempo acima de cinco minutos, esta foi completamente inativada tanto em larvas e adultos (Figura 7).

Foi determinada a atividade da α -amilase de intestino de *Alphitobius diaperinus* em diferentes pH em larvas e adultos pelo qual foi verificado uma faixa de atividade enzimática da α - amilase entre os pHs 4.5 e 6.5 onde foi observado dois picos distintos de atividade ótima de atividade enzimática da α -amilase tanto nas larvas como nos adultos de *Alphitobius diaperinus* na curva de pH, em pHs 5.0 e 5.6 respectivamente. Em pHs abaixo de 4.5 e acima de 6.5 foi determinado uma diminuição da atividade enzimática da α -amilase em cerca de 70 %, quando comparados com os picos máximo de atividade (figura 8).

Neste trabalho foi observado o efeito do cálcio sobre a atividade α -amilase de *Alphitobius diaperinus* em diferentes concentrações CaCl_2 para determinar a modulação do íon Ca^{+2} . Nas concentrações de 0.005 à 0.02 mM de CaCl_2 a enzima apresentou atividade enzimática. Sendo que na concentração de 0.02 mM, apresentou maior nível de atividade enzimática. Em contraste com concentrações entre 0.5 mM à 250 mM a atividade foi inibida (figura 9).

Para caracterizar a atividade enzimática de uma α -amilase nos diferentes níveis de purificações e determinar o seu peso molecular, primeiramente foi extraído todo trato digestivo (larvas e adultos) de *Alphitobius diaperinus*. Está reportado na literatura que grande parte das atividades enzimáticas envolvidas no processo digestivo, encontra-se no lúmen (intestino médio) dos insetos (Terra *et al* 1996). O trato digestivo foi diluído, homogeneizado e centrifugados, após a centrifugação, as impurezas formaram um pellet no fundo do tubo de ensaio e o sobrenadante foi removido e utilizado nos ensaios enzimático. Duzentos e trinta mg/mL de proteína foi determinada no homogeneizado formado pelo trato digestivo de *Alphitobius diaperinus*. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o método de (Lowry *et al* 1951).

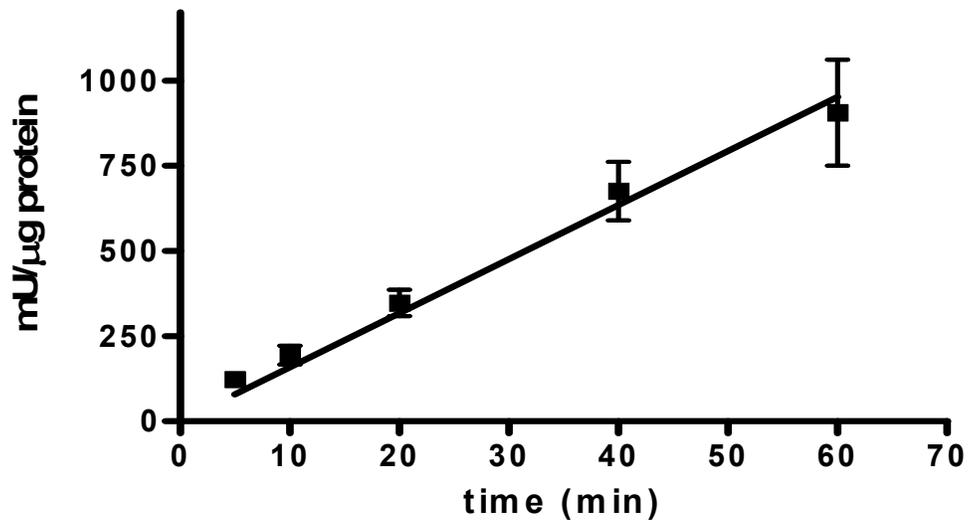


Figura 3. Curso temporal da atividade de α -amilase de intestino de *Alphitobius diaperinus*.

Atividade medida ao incubar a amostra com o substrato a 37 °C nos seguintes tempos: 5, 10, 20, 40 e 60 min. 1U de atividade enzimática equivale a 1 μ mol de produto formado. As barras verticais representam o erro de três ensaios independentes. Fonte: (LBBMA – ICE – UFRRJ).

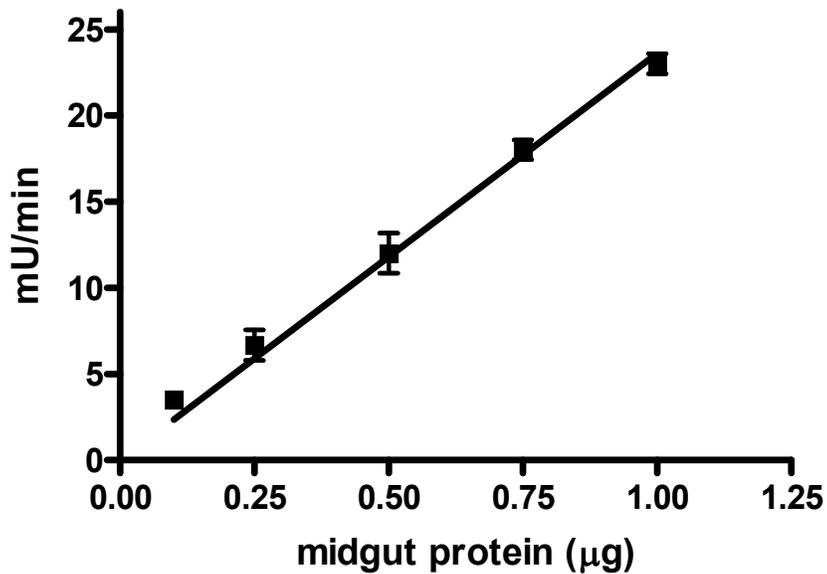


Figura 4. Efeito da concentração de proteínas do intestino de *Alphitobius diaperinus* na atividade de α -amilase.

Atividade medida ao incubar a amostra com o substrato a 37 °C nas seguintes concentrações de proteínas da amostra no meio: (0.1, 0.25, 0.50, 0.75 e 1.0) $\mu\text{g}/\text{mL}$. 1 U de atividade enzimática equivale a 1 μmol de produto formado por minuto. As barras verticais representam o erro de três ensaios independentes. Fonte: (LBBMA – ICE – UFRRJ)

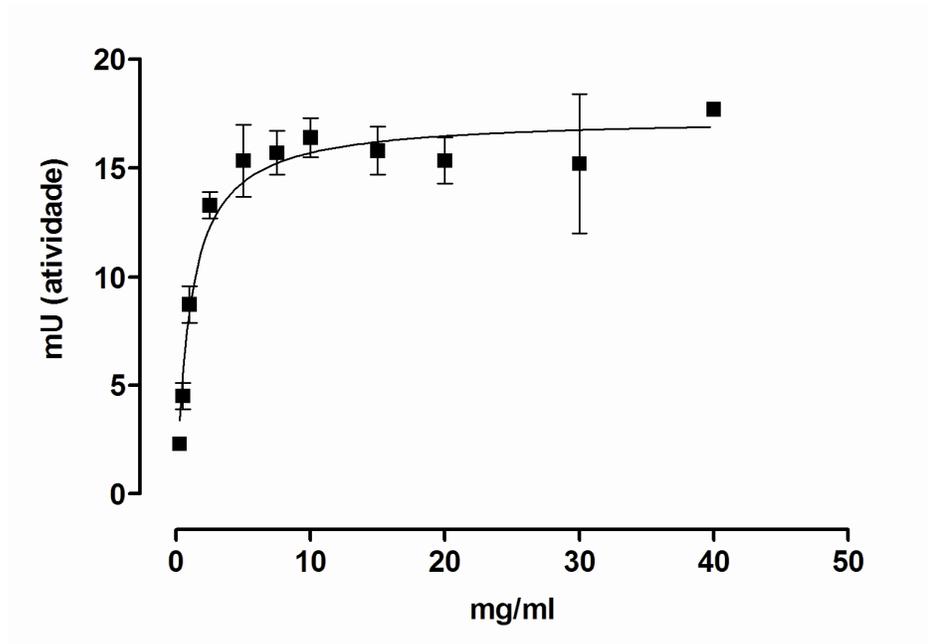


Figura 5. Efeito da concentração do substrato na atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus*.

Atividade medida ao incubar a amostra a 37 °C por 30 min com as seguintes concentrações de substrato: 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20, 30 e 40 mg/mL. 1 U de atividade enzimática equivale a 1 μ mol de produto formado por μ g de proteína por minuto. As barras verticais representam o erro de quatro ensaios independentes. Fonte: (LBBMA – ICE – UFRRJ).

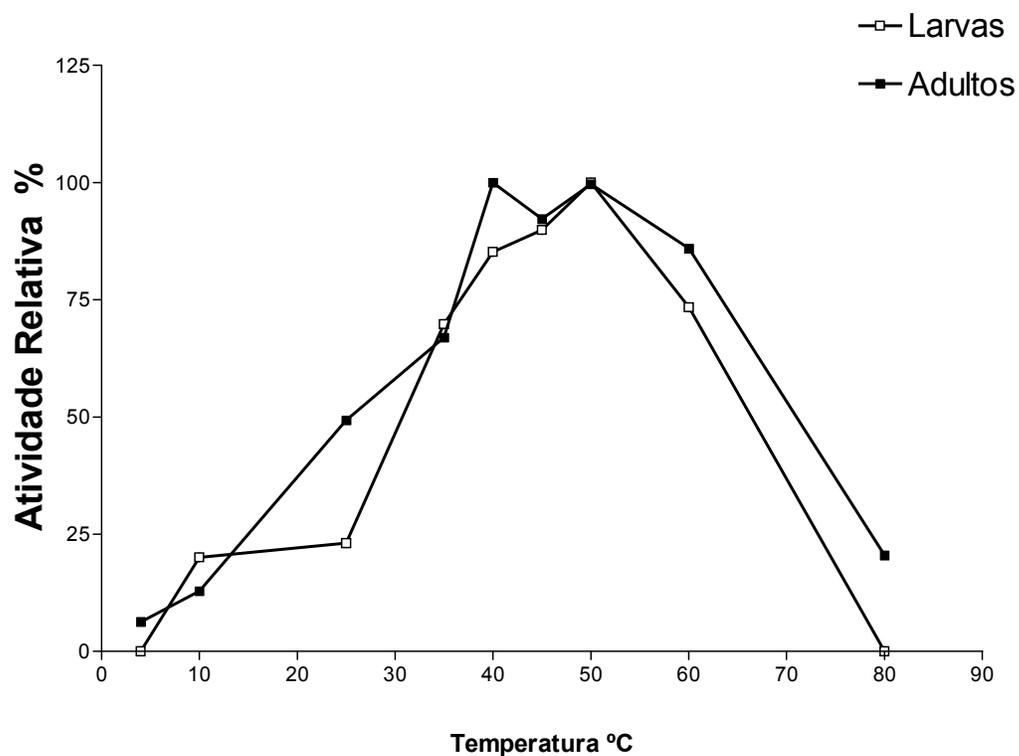


Figura 6. Temperatura ótima da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* (Larvas e adultos).

Atividade medida ao incubar as amostras com o substrato por 10 min nas seguintes temperaturas; 4, 10, 25, 35, 40, 45, 50, 60 e 80 °C e sua atividade residual determinada. Os dados correspondem à média de três ensaios independentes com um erro menor que 10%.

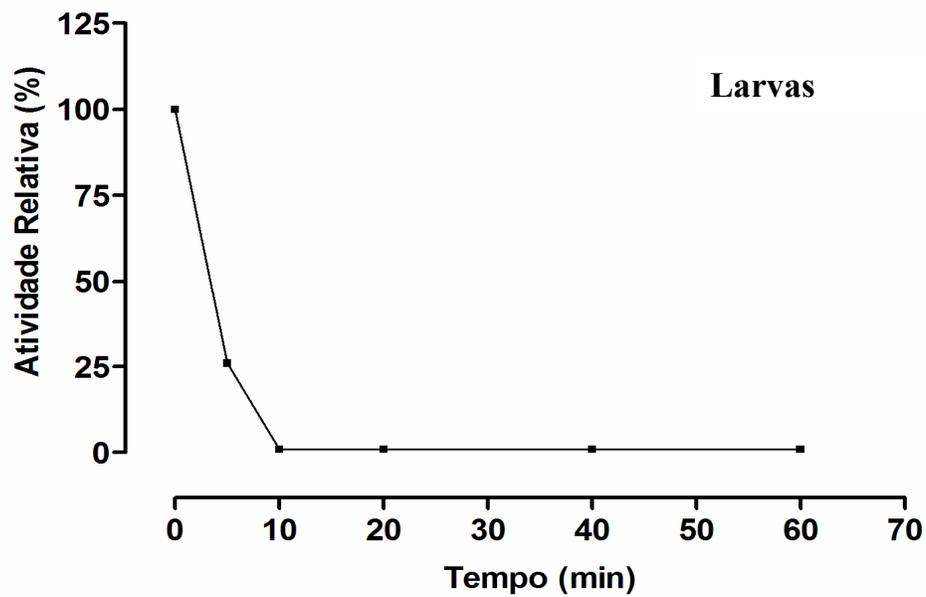
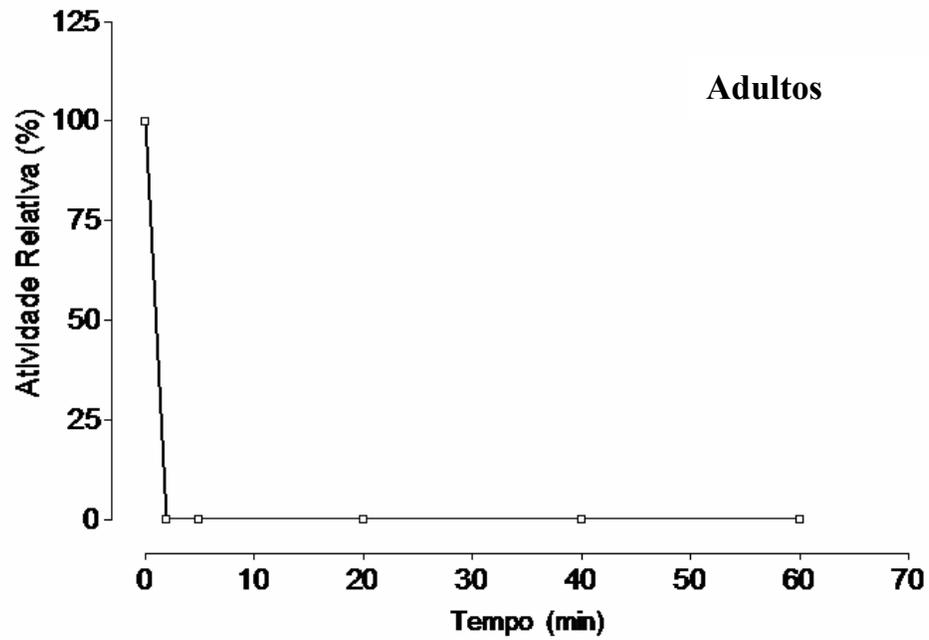


Figura 7. Inativação térmica a 100 °C da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* (Larvas e Adultos).

A amostra foi mantida a 100 °C por 2, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos e sua atividade residual determinada. Os resultados estão expressos em % da atividade em relação à atividade a no tempo 0 min.

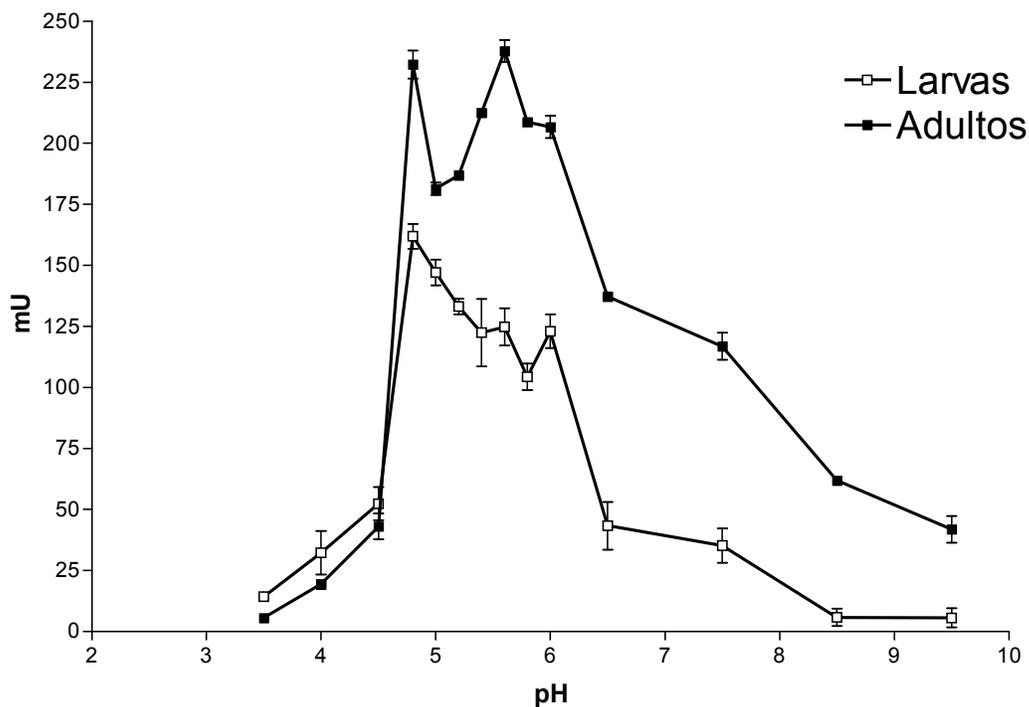


Figura 8. pH ótimo da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* (Larvas e Adultos).

Atividade medida ao incubar as amostras com o substrato a 37 °C em diferentes faixas de pH. Os tampões e as respectivas faixas de pH utilizados foram os seguintes: Acetato, Fosfato, Tris e Citrato – pHs (3.5, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5). 1 U de atividade enzimática equivale a 1 μ mol de produto formado por μ g de proteína por minuto.

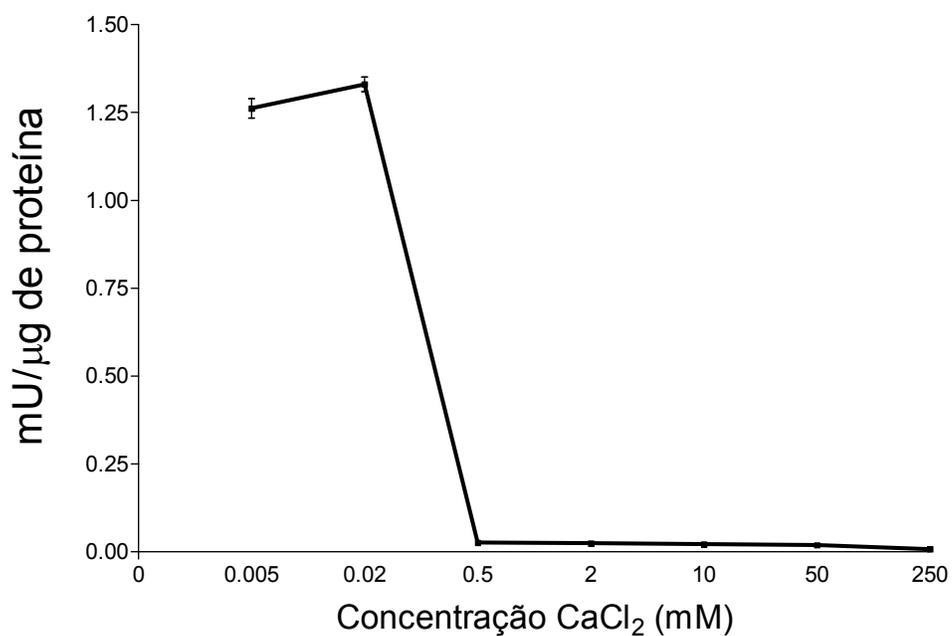


Figura 9. Efeito da concentração de CaCl_2 sobre atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus*.

Atividade medida ao incubar a amostra com o substrato a 37 °C por 10 minutos, nas seguintes concentrações de CaCl_2 : (0.005, 0.02, 0.5, 2, 10, 50 e 250)mM, na presença de EGTA 1mM.

Também foram realizados processos de purificação no homogeneizado do trato digestivo, por consequência da presença de diferentes tipos de proteínas no trato digestivo de *Alphitobius diaperinus* (Terra *et al* 1996), pelo qual após esses processos se obteve α -amilase parcialmente purificada. A primeira etapa de purificação o homogeneizado foi precipitado em sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25% - 75%, onde foi observado uma purificação de aproximadamente duas vezes, pelo qual houve um aumento de quase 100 % na atividade específica da α -amilase em (U/mg), em relação ao extrato bruto (figura 10). Na segunda etapa de purificação, 1 mL do homogeneizado parcialmente purificado em sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foi adicionado em uma coluna cromatográfica sephadex G (50-80) - $(1,6 \times 60 \text{ cm})$, eluída em tampão acetato 20 mM, pH 6.0. Foram recolhidas 80 frações contendo 2.0 mL cada, em um fluxo de aproximadamente 20mL/hr. Em seguida todas as frações coletadas foram submetidas a análise da atividade da α -amilase, onde as frações 9, 10 e 11 foram que as apresentaram maiores níveis de atividade enzimática (figura 11).

Foi feito ensaio em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, corado com comassie blue contendo as amostras das diferentes etapas de purificações, pelo qual foram obtidos diferentes perfis das proteínas. A figura 12, linha A representa o perfil das proteínas do extrato bruto; A figura 12, linha B representa o perfil das proteínas, após a precipitação com sulfato de amônio 25% - 75% e a figura 12, linha C representa a fração 10 da coluna cromatográfica (sephadex G 50-80), de maior atividade enzimática. Foi observada uma única banda, caracterizando o enriquecimento da atividade da α -amilase, onde foi confirmada por ensaios de atividade enzimática. Na segunda etapa de purificação houve um aumento de mais de 200% na atividade específica da atividade da α -amilase, quando comparada com as etapas anteriores, extrato bruto e precipitado em sulfato de amônio (Tabela 2). Foi observado um aumento na purificação de 7.2 vezes quando comparado com o extrato bruto (Tabela 2).

O peso molecular da α -amilase foi determinado em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante. Após a corrida em gel do homogeneizado do trato digestivo, a atividade da α -amilase revelou uma banda de aproximadamente 30 kDa, quando corado com iodo. Pelo qual ficou bem caracterizada a presença da atividade da α -amilase (figura 13, linha B). Uma amostra com pesos padrões correu paralelamente, após a corrida o gel foi corado com comassie blue, revelando bandas com diferentes pesos moleculares (figura 13, linha A1). O peso molecular da α -amilase foi de aproximadamente de 30 kDa, quando comparado com os padrões. Os padrões utilizados foram, (Miosina - 209 kDa, β -Galactosidase - 117 kDa, Albumina bovina - 97 kDa, Ovalbumina - 55 kDa, Anidrase carbônica - 37 kDa, Inibidor de Tripsina de Soja - 29 kDa, Lisozima - 19 kDa). Foi também caracterizado o perfil de proteínas presente no extrato bruto das larvas de *Alphitobius diaperinus* (figura 13 - A2).

Foi caracterizado o perfil dos inibidores α -AIs de *Phaseolus vulgaris*, quando os insetos (larvas e adultos) de *Alphitobius diaperinus*, foram alimentados na presença do inibidor na ração (farinha de *Phaseolus vulgaris*) da variedade Ouro Negro onde o controle foi somente a ração sem a farinha do inibidor. Em seguida foi feito um gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, dos diferentes extratos, que revelou duas bandas distintas, (figura 14 - A), a banda apresentou um arrasto quando o extrato enzimático (trato digestivo) das larvas alimentadas na presença do inibidor na ração (farinha de *Phaseolus vulgaris*) da variedade Ouro Negro, quando comparada ao controle que revelou somente a banda representando atividade enzimática da α -amilase (figura 14 - B).

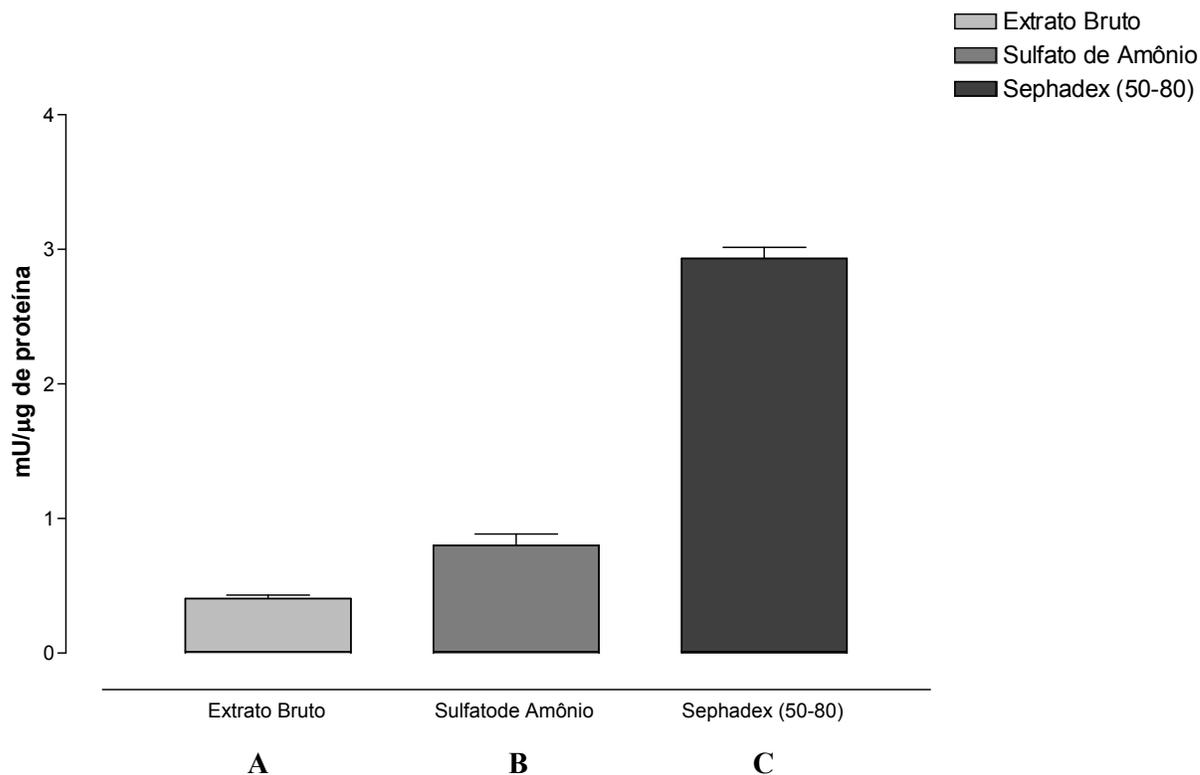


Figura 10. Determinação da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* pelo método 3,5-dinitrosalicílico alcalino (DNS) de Bernfeld (1955) nos diferentes níveis de purificações.

A – Determinação da atividade enzimática do Extrato bruto dos intestinos médio de *Alphitobius diaperinus*; **B** - Atividade enzimática, após o extrato bruto ser parcialmente purificado com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25% - 75%; **C** - Atividade enzimática específica proveniente da purificação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25% - 75%; e posterior passagem em coluna cromatográfica Sephadex G (50-80). (n = 3; desvpad = 1.359; erro = 0.7847).

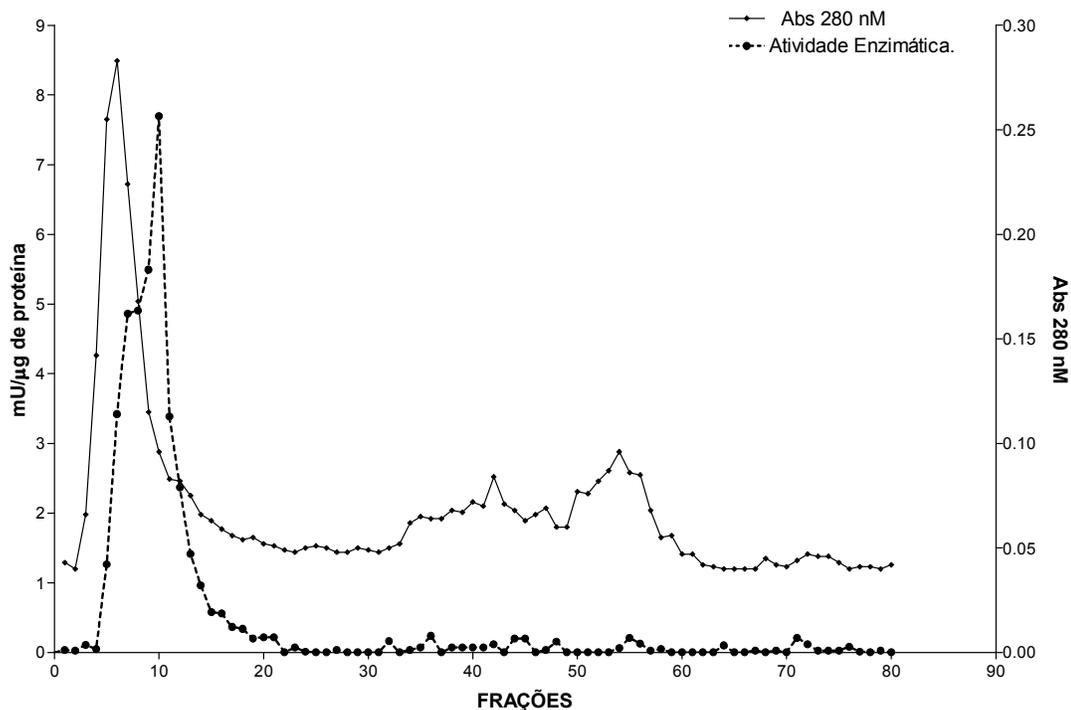


Figura 11. Perfil de eluição da atividade enzimática de *Alphitobius diaperinus* após ciclo de cromatografia em coluna cromatográfica de Sephadex G (50- 80).

Um mililitro de extrato enzimático parcialmente purificado com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do intestino médio de larvas de *Alphitobius diaperinus*, (4.628 mg de proteína / mL) foi carregado em uma coluna de cromatografia sephadex G (50-80) - $(1.6 \times 60 \text{ cm})$, equilibrada com tampão acetato pH 6.0 - 20 mM. 80 Frações (cada 2,0 mL) foram coletadas e separadas em duas aliquotas de 1ml para serem analisadas imediatamente a presença de proteínas e a outra aliquota determinar a atividade enzimática. Foi utilizado espectrofotômetro Shimadzu-UVmini-1240 para as análises, nos comprimentos de onda de 280 nm para análise de proteínas e 550 nm para determinação da atividade enzimática.

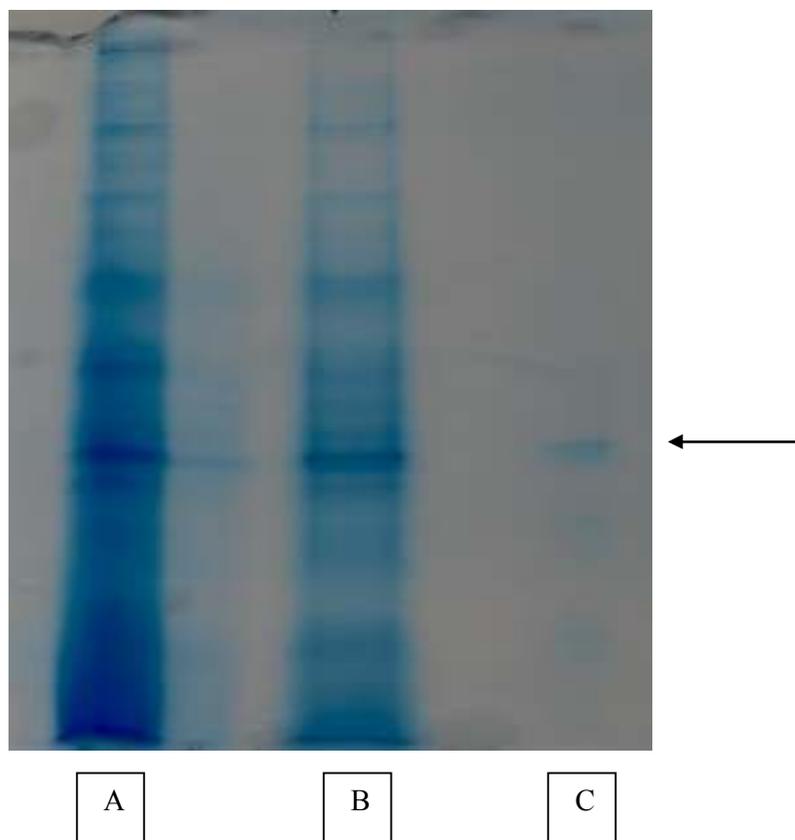


Figura 12. Ensaio em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, corado com comassie blue.

Caracterização das proteínas presentes no Extrato bruto dos intestinos médio de *Alphitobius diaperinus* (**linha A**); Caracterização das Proteínas de *A. diaperinus*, parcialmente purificado com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 25% - 75% (**linha B**); Purificação da α -amilase, após a cromatografia em Sephadex G (50-80), sua pureza enzimática foi confirmada por ensaios de atividade pelo método de Bernfeld (1955) (**linha C**). A seta indica a enzima parcialmente purificada.

Tabela 2. Resumo das Etapas de Purificação da α – Amilase de *Alphitobius diaperinus*.

| Etapa de Purificação | Atividade Total (U) | Proteína Total (mg) | Atividade Específica (U/ mg) | Purificação (vezes) | Rendimento (%) |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Extrato Bruto | 93.53 | 230.88 | 0.405109 | 1 | 100 |
| Precipitação com Sulfato de Amônio | 74.12 | 92.56 | 0.800836 | 1.97 | 79.2 |
| Cromatografia Sephadex (50-80) | 3.66 | 1.25 | 2.93193 | 7.2 | 3.9 |

Os resultados da tabela de purificação para a amilase digestiva de *Alphitobius diaperinus*, demonstra que aproximadamente 79% da atividade da amilase inicial foi recuperado na fração de 25 - 75% sulfato de amônio. Em seguida após a separação dos picos na etapa de cromatografia a atividade enzimática aumentou 7.2 vezes em relação a o extrato bruto.

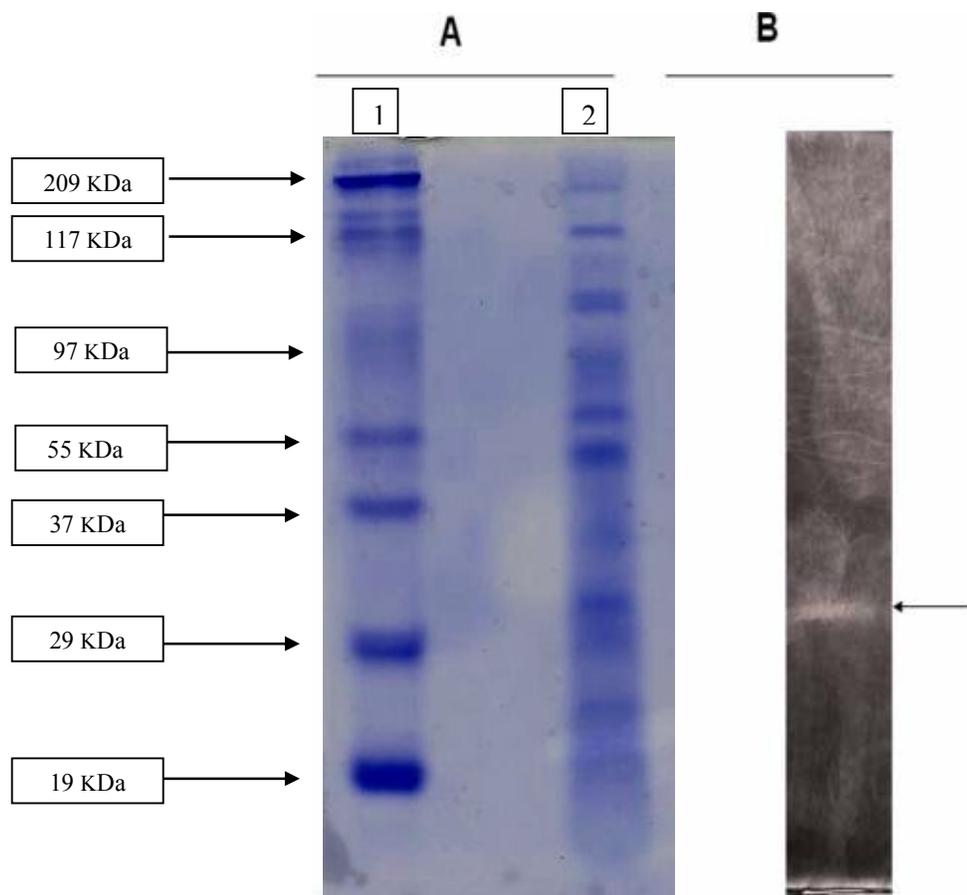


Figura 13. Determinação do peso molecular da α -amilase em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, corado com comassie blue.

A-1 Gel corado com comassie blue contendo padrões de proteína 10 μ g. As setas indicam os pesos moleculares dos padrões, de cima pra baixo: (Miosina - 209 kDa, β -Galactosidase - 117 kDa, Albumina bovina - 97 kDa, Ovalbumina - 55 kDa, Anidrase carbônica - 37 kDa, Inibidor de Tripsina de Soja - 29 kDa, Lisozima - 19 kDa) ; **A- 2** Perfil de proteínas do extrato bruto. **B**-Gel corado com Iodo após o ensaio de atividade de α -amilase. A seta indica uma banda com 30 kDa que apresenta atividade amilolítica.

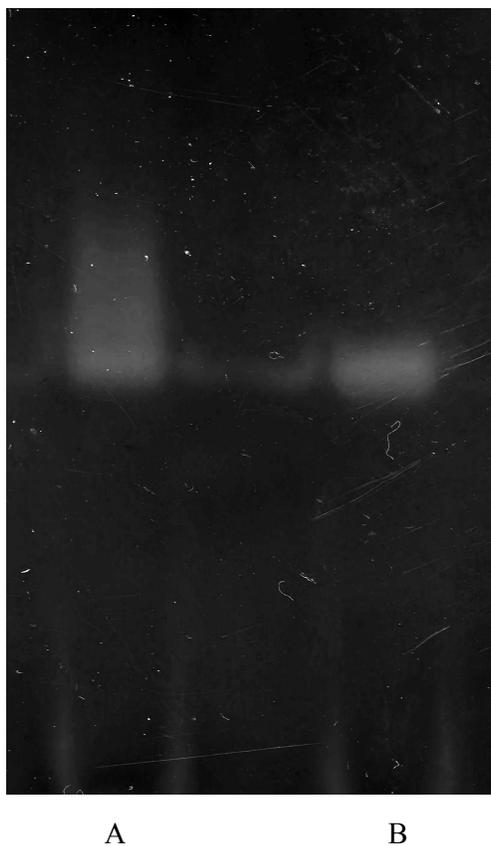


Figura 14. Determinação da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* na presença da (α -AIs), em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante.

A- Extrato enzimático de (*Alphitobius diaperinus*), extraídos das larvas alimentadas em dieta contendo farinha do inibidor (90 % Ração + 10% Farinha de *Phaseolus vulgaris*); **B** - O extrato enzimático de (*Alphitobius diaperinus*), extraídos das larvas alimentadas em dieta na ausência da farinha do inibidor, gel corado com Iodo após o ensaio de atividade de α -amilase.

Foi caracterizado o perfil dos inibidores α -AIs parcialmente purificados de *Phaseolus vulgaris*, quando pré-incubadas, com extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus*, foram realizados em tampão acetato pH 5.6 e uma temperatura de 37°C durante 10 minutos. O gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, revelou um arrasto na banda na presença do inibidor quando pré - incubado ao extrato enzimático (figura 15 - A), semelhantes ao arrasto revelado no gel de quando os insetos foram alimentados na presença da farinha de *Phaseolus vulgaris*, o que não acontece no controle (figura 15 - B), somente a banda representando atividade enzimática da α -amilase. Na figura 15C e D, gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante dos insetos (larvas) de *Alphitobius diaperinus*, alimentados na presença do inibidor na ração (farinha de *Phaseolus vulgaris*) da variedade Ouro Negro onde o controle foi somente a ração sem a farinha do inibidor.

A purificação parcial do inibidor das diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* foi alcançada na utilização de métodos convencionais como o tratamento térmico (necessário pra destruir traços de atividades amilolíticas endógenas), em seguida todo material foi dialisado e liofilizado dando origem a um pó fino pelo qual foi hidratado em água mili-Q, para posteriores ensaios.

Foi analisado o potencial inibitório das variedades das sementes de *Phaseolus vulgaris* (Ouro Negro, Xodó, Aporé, Kaboom, Carioca e Mulatinho) sobre a atividade enzimática da α -amilase. Os inibidores de α -AIs parcialmente purificados de *Phaseolus vulgaris*, foram pré-incubados, com extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus*. Os ensaios foram realizados em pH 5.6 a uma temperatura de 37°C por 10 minutos. Todas as variedades testadas apresentaram diferentes níveis de inibição sobre a α -amilase de *Alphitobius diaperinus* em relação ao controle (figura 16).

A variedade Ouro Negro apresentou maior grau de inibição em torno de 62 %, seguidas pelas variedades, Xodó 54 %, Aporé 43 %, Kaboom 39 %, Carioca 32 % e Mulatinho 27 % (figura 16). Em seguida foi feito um gel de poliacrilamida - SDS (12%) parcialmente desnaturante (figura 17), onde foi observado a interação dos inibidores α -AIs das variedades de *Phaseolus vulgaris* com a α -amilase de *Alphitobius diaperinus*. Quando os inibidores foram pré - incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus*, as bandas revelaram um arrasto característico na presença do inibidor para todas as variedades, quando comparado ao controle (figura 17 - linha 1).

Foi determinado o potencial inibitório em diferentes concentrações do α -AIs (2.5, 5, 10, 15, 30) μ g de *Phaseolus vulgaris* parcialmente purificado da variedade Ouro Negro. Diferentes concentrações do inibidor de *Phaseolus vulgaris*, foram pré-incubados 10 μ L do extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* com aproximadamente 20 μ g de proteínas. Os resultados mostraram que um aumento gradativo da concentração do α -AIs da variedade Ouro Negro determinou a diminuição da atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*. Nas concentrações de 10 μ g e 30 μ g do inibidor (α -AIs), quando pré - incubado com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* com 20 μ g de proteína, observou-se uma capacidade inibitória de 55% e 78%, respectivamente em relação controle (Figura 18).

Em seguida foi feito um gel de poliacrilamida - SDS (12%) parcialmente desnaturante, onde foi caracterizado o perfil do inibidor α -AIs nas diferentes concentrações da variedade Ouro Negro de *Phaseolus vulgaris*, quando pré - incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* (Figura 19), as bandas revelaram um arrasto característico na presença do inibidor para todas as concentrações e uma diminuição na expressão nas bandas com o aumento da concentração quando comparado ao controle (figura 19 - A).

Fomos verificar a estabilidade do inibidor de α -amilase quando aquecidos a 100 °C em diferentes tempos (0, 2, 5, 10, 20 e 30 minutos). Os resultados demonstraram que os inibidores da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, presente nas sementes de *Phaseolus vulgaris*, após 5 minutos aquecidos a 100°C e posteriormente pré – incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus*, os inibidores de α -amilase apresentaram maior potencial inibitório, inibindo cerca de 100% da atividade enzimática, ativando o inibidor (figura 20).

Diferentemente quando o extrato inibitório aquecido a 100°C, durante 30 minutos e em seguida pré – incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* ao determinar a atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, ocorreu à diminuição do potencial inibitório, inibindo aproximadamente 30% da atividade enzimática, quando comparado ao controle. Esses resultados indicam que o potencial inibitório do extrato purificado parcialmente do inibidor de *Phaseolus vulgaris* é diminuído gradativamente quando expostos em altas temperaturas ao longo do tempo (figura 20).

Larvas de *Alphitobius diaperinus*, no último instar foi submetido a um jejum pleno durante 48 horas, após esse período as larvas foram divididas e alimentadas com os diferentes tipos de rações durante 48 horas, pelo qual as concentrações dos diferentes constituintes de cada ração preparadas, estão diretamente relacionados nas diferentes etapas do desenvolvimento das aves.

Após o período de alimentação, o trato digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*, foram extraídos e analisados a atividade enzimática da α -amilase, pelo qual foi observada uma diminuição gradativa da atividade enzimática da α -amilase, nos conteúdos do trato digestivo, quando estas foram alimentadas com as diferentes rações, sendo os menores valores obtidos quando se utilizou ração de frango para o abate e ração de postura, onde a ração de postura se diferencia especialmente quanto à porcentagem de Cálcio elevado, 4.15% já as demais rações contêm em média 1% de Cálcio. Pelo qual as larvas alimentadas na ração inicial (1° - 21°) dias, apresentaram maiores níveis de atividade enzimática da α -amilase, quando comparadas a atividade enzimática da α -amilase nas outras rações. Considerando 100 % o nível de maior atividade enzimática da α -amilase, ocorreu uma diminuição de aproximadamente 50 % quando comparada na atividade enzimática da α -amilase das larvas alimentadas em ração de postura (figura 21).

Também foi determinada a atividade enzimática da α -amilase, no tecido epitelial do tubo digestivo das larvas de *Alphitobius diaperinus*. As larvas foram alimentadas nos mesmo tipos de rações e nas mesmas condições apresentadas no experimento anterior.

Em todas as análises no tecido epitelial do tubo digestivo do *Alphitobius diaperinus*, quando alimentados nos diferentes tipos de rações a atividade enzimática da α -amilase apresentou diferentes níveis de atividades, pelo qual houve uma diminuição de aproximadamente 70 % da atividade, quando comparado a atividade enzimática da α -amilase de todo trato digestivo do *Alphitobius diaperinus*, em todas as rações utilizadas. (figura 21).

A B C D



Figura 15. Determinação da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* na presença da α -AIs, em gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante.

***In vitro*:** (linha A) Extrato enzimático de (*Alphitobius diaperinus*) pré-incubado com inibidor (*Phaseolus vulgaris*), parcialmente purificado (10 μ L Extrato enzimático + 10 μ L Inibidor); (linha B) Extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* como controle pré-incubado com água (10 μ L Extrato enzimático + 10 μ L água); ***In vivo*:** (linha C) Extrato enzimático de (*Alphitobius diaperinus*), extraídos das larvas alimentadas em dieta na ausência da farinha de *Phaseolus vulgaris* com o inibidor; (linha D) Extrato enzimático de (*Alphitobius diaperinus*), extraídos das larvas alimentadas em dieta contendo farinha de *Phaseolus vulgaris* com o inibidor (90 % Ração + 10% Farinha de *Phaseolus vulgaris*).

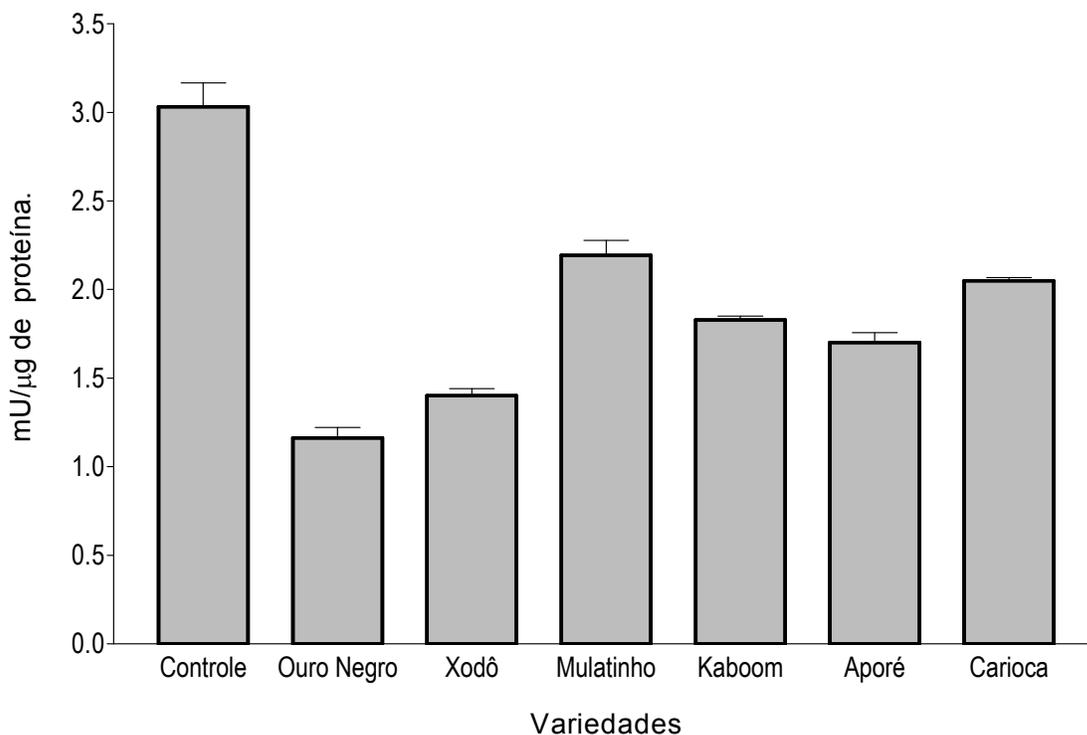
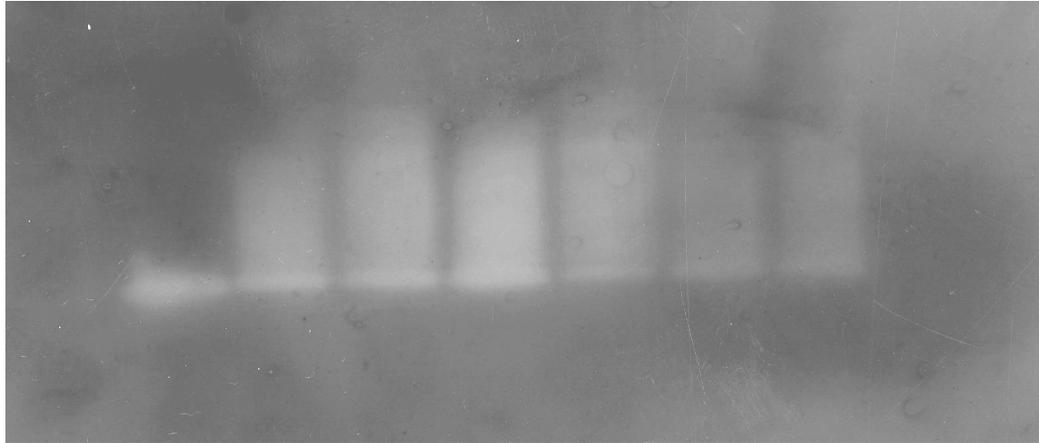


Figura 16. Perda da atividade da α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus*, do inibidor de α -amilase (α -AIs) de *Phaseolus vulgaris* em diferentes variedades.

Os ensaios de inibição foram realizados pré-incubando 10 μ L do homogeneizado de intestino de *A. diaperinus* em 10 μ g do composto protéico dos inibidores, durante 10 minutos a uma temperatura de 37 °C, em seguida é adicionado 250 μ L de amido 1% (p/v) em tampão acetato 0.1 M, pH 5.6 contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0.2 mM a 37°C por 10 minutos. Foi utilizado um controle negativo, no qual a quantidade de homogeneizado fora substituído por água milli-Q para cada inibidor e um controle positivo sem a presença de inibidores. (n = 3; desvpad = 0.6090; erro = 0.2302).



1 2 3 4 5 6 7

Figura 17. Determinação da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* do inibidor de α -amilase (α -AIs) de *Phaseolus vulgaris* em diferentes variedades.

Os ensaios de inibição foram realizados pré-incubando 10 μ L do homogeneizado de intestino de *A. diaperinus* em 10 μ g do composto protéico dos inibidores, durante 10 minutos a uma temperatura de 37°C. Em seguida as amostras pré-incubadas com cada variedade foram submetidas em gel de poliacrilamida - SDS (12%) parcialmente desnaturante: **1** Controle; **2** Ouro Negro; **3** Xodó; **4** Mulatinho; **5** Kaboom; **6** Aporé; **7** Carioca.

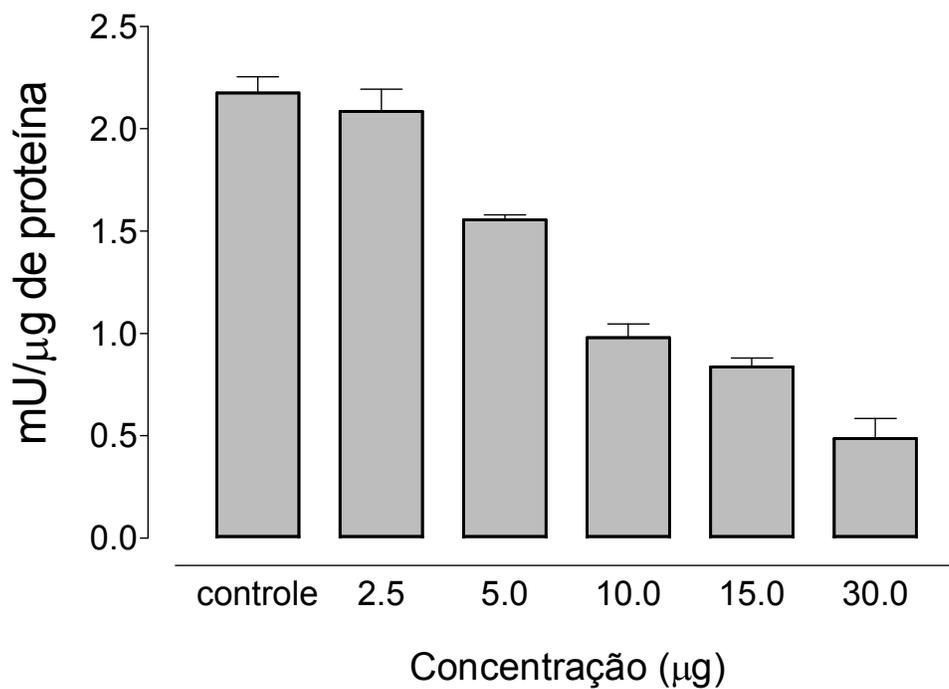
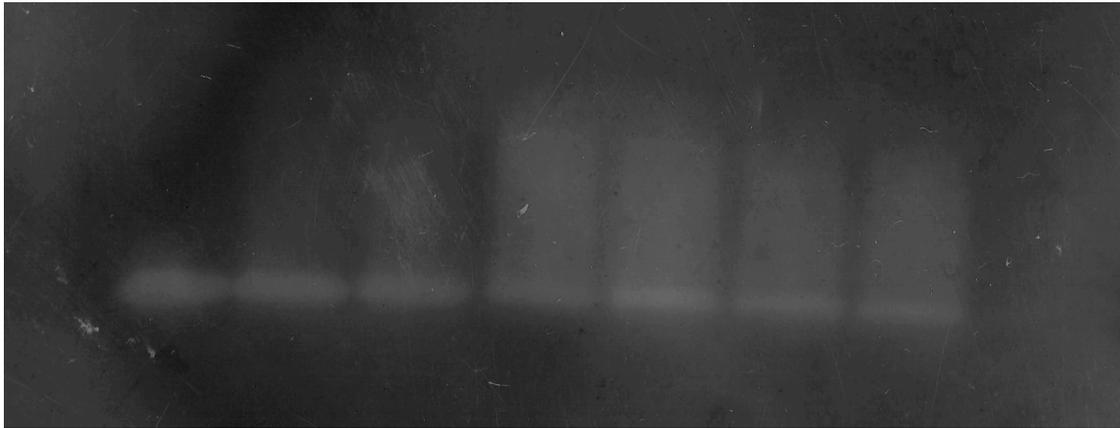


Figura 18. Perda da atividade da α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus*, do inibidor de α -amilase (α -AIs) de *Phaseolus vulgaris* na presença de diferentes concentrações.

Composto protéico do inibidor de α -amilase (α -AIs), nas concentrações 2.5μg, 5.0μg, 10.0μg, 15.0μg, 30.0μg, em 10μL de extrato enzimático do intestino de *Alphitobius diaperinus*: Variedade utilizada para o ensaio (Ouro Negro). (n = 3; desvpad= 0.6937; erro = 0.2832).



A B C D E F G

Figura 19. Determinação da atividade α -amilase do intestino de *Alphitobius diaperinus* com inibidor de α -amilase (α -AIs) de *Phaseolus vulgaris* em diferentes concentrações.

Os ensaios de inibição foram realizados pré-incubando 50 μ g de proteína do homogeneizado de intestino de *A. diaperinus* em diferentes concentrações do composto protéico do inibidor (α -AIs) da variedade Ouro Negro, durante 10 minutos a uma temperatura de 37°C. (A - controle; B- 2.5 μ g; C – 5.0 μ g; D – 10 μ g; E – 15 μ g; F- 20 μ g; G- 30 μ g). Em seguida as amostras pré-incubadas com cada concentração foram submetidas em gel de poliacrilamida - SDS (12%) parcialmente desnaturante.

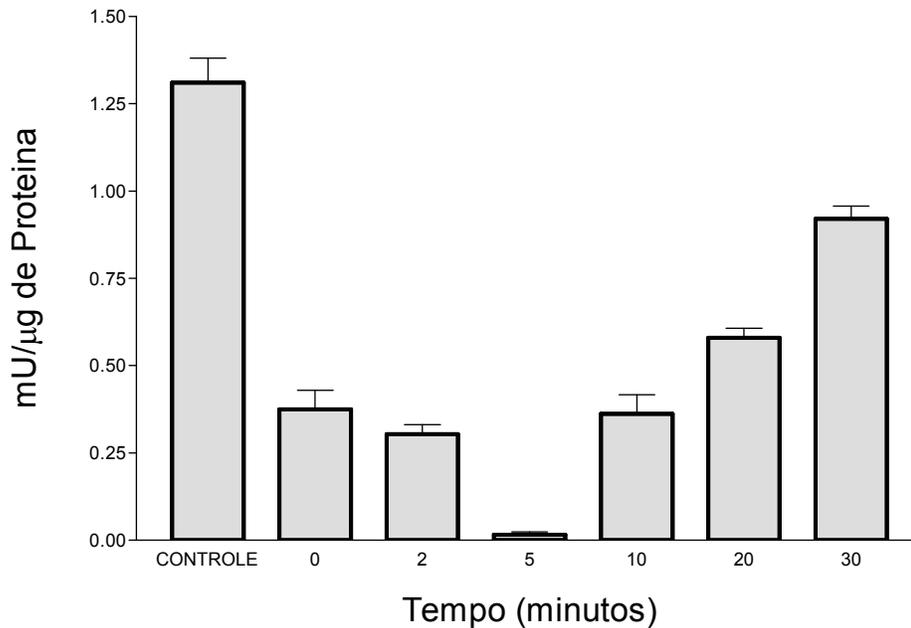


Figura 20. Inativação térmica a 100°C do inibidor de α -amilase (α -AIs) de *Phaseolus vulgaris* em função do tempo.

A amostra contendo somente o inibidor foi mantida a 100°C, nos tempos determinados de (0, 2, 5, 10, 20, 30) minutos, em seguida pré-incubada com extrato enzimático, durante 10 minutos a 37°C. Após a pré-incubação foi determinada a atividade extrato enzimática do *Alphitobius diaperinus*. A figura representa a perda da capacidade inibitória das (α -AIs), em relação aos diferentes tempos de pré – incubação a 100° C. Os resultados estão expressos mU/μg da atividade enzimática; Controle (10μL Extrato enzimático + 10μL água); Tempos 0, 2, 5, 10, 20 e 30 minutos (10μL Extrato enzimático + 10μL Inibidor). (n = 2; desvpad = 0.4336; erro = 0.1639)

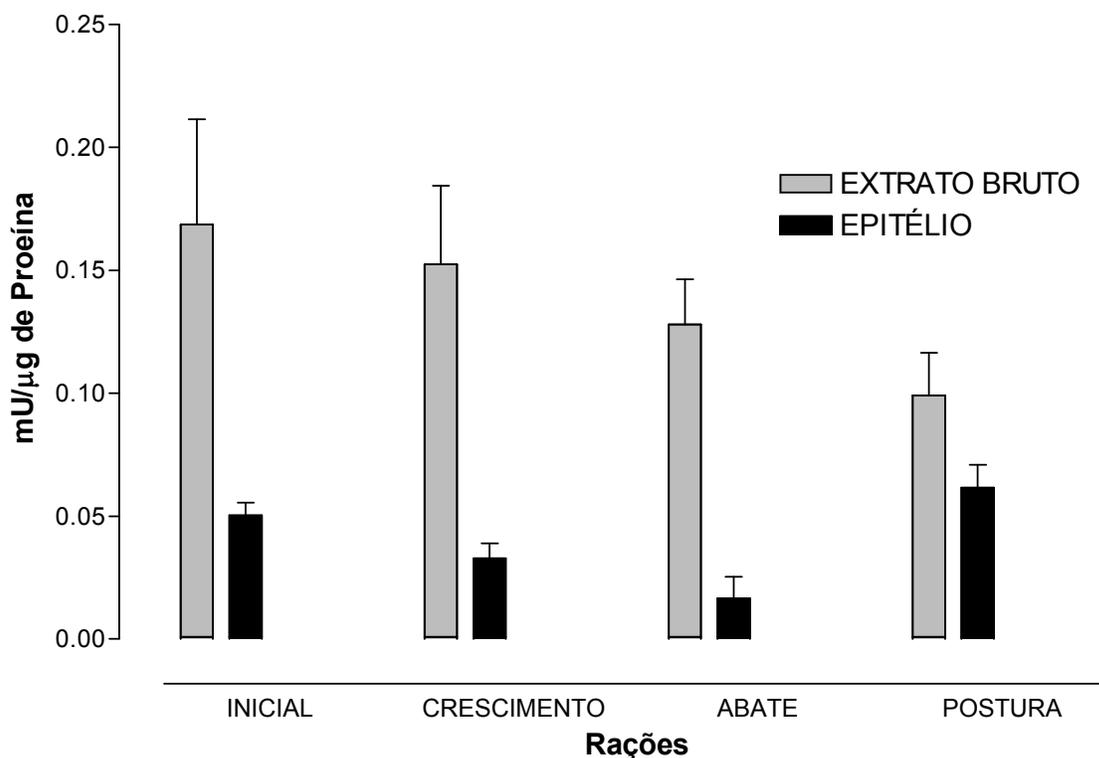


Figura 21. Determinação da atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus* em relação aos tratamentos com as respectivas dietas formuladas para produção em frango de corte.

Para determinar as atividades enzimáticas das larvas nos diferentes tipos de dietas, foram utilizados para os ensaios homogeneizados contendo todo trato digestivo das larvas e homogeneizados somente do tecido epitelial do tubo digestivo de *Alphitobius diaperinus*. Extrato Bruto (n = 2; desvpad = 0.0303; erro = 0.0151), Epitélio (n = 2; desvpad = 0.0197; erro = 0.0098).

6 DISCUSSÃO

A atividade enzimática de uma α -amilase foi claramente observada nos extratos brutos, de qualquer das larvas ou adultos de *Alphitobius diaperinus* (figura 2, 3 e 4). Foi observado que, essencialmente, grande parte da atividade da α -amilase foi localizada no intestino médio, através de testes em extratos de intestino médio isolado, quando comparados aos resultados da atividade enzimática da α -amilase em extratos do tecido epitelial do tubo digestivo de *Alphitobius diaperinus*. Este sugere claramente um papel importante das atividades enzimáticas e a presença de uma microbiota no sistema digestivo dos insetos. As α -amilases desempenham um papel fundamental no metabolismo de carboidratos de diversos insetos, como os gorgulhos que se alimentam especialmente de sementes ricas em amido e pragas de feijão como bruchídeos, responsáveis por produzir graves danos em grãos armazenados, são altamente dependentes da α -amilase para sua sobrevivência (Franco *et al* 2002).

Embora a temperatura ótima para α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, foi de 50°C a enzima foi ativa em uma ampla faixa de 10 – 60°C e completa inativação acima de 80°C, em consonância com outras espécies de *Coleoptera* (Dojnov *et al* 2008). Em algumas espécies tem sido observada mais de uma isoforma de α -amilase que apresentam diferentes taxas de estabilidade térmica. (Silva *et al* 1999). Similarmente a α -amilase de *Mytilus galloprovincialis* apresentou uma atividade ótima em temperaturas de até 50°C (Lombraña *et al* 2005). Ao contrário do que acontece na α -amilase de outros insetos, que apresenta um patamar de atividade ótimo 40 a 45°C, mas em temperaturas acima de 60°C foram completamente desnaturada (Podoler *et al* 1971).

Quanto a α -amilase de intestino de *Alphitobius diaperinus*, a curva de pH apresentou dois picos distintos de atividade amilolítica um em pH 5.0 e outro em pH 5.6, o que é muito interessante e pode ser indício da existência de duas isoformas. Esta faixa ligeiramente ácida de pH ótimo está de acordo com dados publicados sobre o pH de diferentes partes do canal digestivo do *Alphitobius diaperinus*. A glândula labial, esôfago e intestino-médio apresentam pH 6.1. O intestino-posterior e os túbulos de Malpighi apresentem pH 6,4 (Sarin *et al* 1973). Outras espécies de *Coleoptera* também apresentam faixas ligeiramente ácidas de pH ótimo de amilases como *Callosobruchus maculatus* (Silva *et al* 1999) e *Morimus funereus* (Dojnov *et al* 2008), assim como acontece com as larvas de *Zabrotes subfasciatus* que apresentam três isoformas de α -amilase e duas destas ocorrem como heterodímeros (Silva *et al* 2001).

Análises realizadas neste trabalho observaram a atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus* em diferentes concentrações CaCl_2 para determinar a modulação do íon Ca^{+2} . Nas concentrações (0.005 – 0.02 mM) a enzima apresentou atividade enzimática. Em contraste concentrações acima de 0.5 mM a atividade foi inibida. Fenômeno semelhante ocorreu com atividade enzimática das larvas de *Morimus funereus* (Coleoptera), em concentrações acima de 1 mM de Ca^{+2} , ocorreu a diminuição da atividade enzimática (Božić *et al* 2003). Resultados semelhantes foram relatados para α -amilase de folhas de ervilhas (Ziegler *et al* 1988).

Endo-amilases presentes em salivas humanas, pâncreas de suínos em *Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae*, tiveram caracterizada a presença de Ca^{+2} (Vallee *et al* 1959). Outro fator importante que as α -amilase de insetos são dependentes do íon Ca^{+2} (Terra *et al* 1996), o íon de cálcio é de fundamental importância para a manutenção da estrutura e integridade das α -amilases (Violet *et al* 1989). Segundo Strobl *et al* 1998, íon Ca^{+2} é importante para a atividade enzimática devido ao seu contato com um

resíduo de histidina pelo qual esta vinculada ao sítio ativo e vai interagir com o substrato.

Em termos de massa molecular da α -amilase do *Alphitobius diaperinus* (figura 12) se assemelha ao de duas isoformas de α -amilases com massas de (36 e 33 kDa) caracterizada a partir do intestino médio de *Callosobruchus Maculatus*, (Campos *et al* 1989), também apresentou similaridade em massa molecular com α -amilase de (31 kDa) do *Morimus funereus* e α -amilases com pesos entre (35 kDa e 28 kDa) foram encontrados em *Rhagium inquisitor* (Chipoulet *et al* 1985) e em *Zabrotes subfasciatus* (Lemos *et al* 1990), respectivamente.

A purificação parcial do inibidor das diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* foi alcançada na utilização de métodos convencionais como o tratamento térmico (necessário pra destruir traços de atividades amilolíticas endógenas), em seguida todo material foi dialisado e liofilizado dando origem a um pó fino pelo qual foi hidratado em água milli-Q, para posteriores ensaios.

Procedimentos alternativos para purificação do inibidor envolvem na imobilização α -amilase em coluna por afinidade de ligação, porém esse método é pouco prático, usado apenas para purificar pequenas quantidades de inibidores, à necessidade de pré-incubação da enzima e inibidor em temperaturas elevadas, outra desvantagem do método é que a afinidade é destrutiva em tampões de pH baixos quando eluídos na coluna para a recuperação do inibidor, destruindo a α -amilase imobilizada. A presença de compostos como a Fitohemaglutinina um aglutinador de hemácias humana, no extrato bruto obtido de sementes de *Phaseolus vulgaris*, (Honavar *et al* 1962), e a utilização desses inibidores de α -amilase como agentes terapêuticos e dietéticos (Marshall *et al* 1975), levou a necessidade de que esses inibidores sejam obtidos e testados em sua forma pura. Essas características levaram a realizações de estudos na utilização dessas proteínas com propriedades inseticidas na prevenção do ataque de insetos em semente suscetíveis (Ishimoto *et al* 1996).

Os ensaios com os inibidores α -AIs, parcialmente purificados de *Phaseolus vulgaris* quando pré-incubadas, com extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* foram realizados em pH 5,6 e uma temperatura de 37°C.

Segundo Marshall e Lauda o pH ótimo de 5.5 determinou maior potencial inibitório da α -AIs purificados de feijão branco contra α -amilase de suco pancreático de suínos, resultados semelhantes foram encontrados por Lajolo e Finardi-Filho que encontrou maior atividade inibitória da α -AIs purificados de feijão preto em pH ótimo de 4.5 contra α -amilase de pâncreas humanos. Marshall e Lauda relatou um aumento no desempenho da atividade do inibidor de α -amilase, quando a temperatura da reação foi elevada de 25° para 37°C.

Nas análises com gel de poliacrilamida-SDS (12%) parcialmente desnaturante, quando revelados as bandas na presença do inibidor α – AIs, observou - se um arrasto característico, quando os insetos (larvas), foram alimentados na presença do inibidor na ração (farinha de *Phaseolus vulgaris*) (figura 13), quando os inibidores das variedades de *Phaseolus vulgaris* foram pré-incubados ao extrato enzimático (figura 16) e quando diferentes concentrações dos inibidores da variedade Ouro Negro foram pré-incubados ao extrato enzimático (figura 18). Estes resultados sugerem a formação de um complexo enzima-inibidor estabelecendo a inibição da atividade enzimática, outra alternativa é a presença de lectinas que tem a capacidade de se ligar a carboidratos específicos. As α -AIs e Arcelinas são lectinas incompletas (Rouge *et al* 1993).

O mecanismo de inibição foi representado pelos dados produzidos pela difração de raios X do complexo (inibidor – PPA). Na estrutura cristalina, o inibidor (I) liga-se a

duas moléculas de α -amilase (E), formando um complexo EI₂, (C. Bompard *et al* 1996).

Além disso, os resultados dos estudos utilizando em gel-filtração e técnicas de escaneamento de luz, aplicada à análise da mistura (E + I) pré-incubada, levou à caracterizar dois complexos, EI₂ e EI (K. Kasahara *et al* 1996). Esta discrepância deduzida com os complexos EI e EI₂, a partir da cinética de inibição pode ser explicado pelo seguinte: quando E e I são misturadas, a primeira reação elementar corresponde à formação do complexo (EI). Então, a formação do complexo depende da concentração do inibidor (I), em relação à concentração da α -amilase (E) utilizada.

Análises do potencial inibitório das variedades das sementes de *Phaseolus vulgaris* sobre a atividade enzimática da α -amilase foram realizadas. Todas as variedades testadas apresentaram diferentes níveis de inibição sobre a α -amilase de *Alphitobius diaperinus* em relação ao controle, onde a variedade Ouro Negro, apresentou maior grau de inibição em torno de 62 %. Outros trabalhos relataram através de análises comparativas em modelos estruturais do complexo enzima – inibidor que a presença de alguns aminoácidos nos inibidores α -AIs, pode ser responsável por determinada especificidade (Franco *et al* 2000). No entanto as proteínas α -AIs no seu estado ativo apresentam diferentes propriedades físicas e químicas (Ho M. F. *et al* 1993). Tem sido sugerido que os α -AIs, podem ter diferentes pesos moleculares, nos valores de ponto isoelétrico, no conteúdo de carboidratos, em números de subunidades e ligações específicas com diferentes α -amilases (Ho M. F. *et al* 1994); através de análises genômicas do DNA por PCR em algumas variedades de *Phaseolus Vulgaris*, estas demonstraram padrões de bandeamento semelhantes em gel e o tamanho para as seqüências dos genes putativos α -AIs foram semelhantes. No entanto, as α -AIs a partir dos diferentes tipos de grãos apresentam especificidade, propriedades químicas e físicas bastante diferentes. Estudos relatados por Pueyo *et al* 1993 demonstraram que a ativação da α -AIs de *Phaseolus vulgaris* requer processamento proteolítico da pró-proteína. Além disso, algumas variedades de grãos, como o feijão preto, são conhecidos por conter diferentes isoformas de α -AIs. (Frels *et al* 1984).

O aumento gradativo da concentração do composto protéico (α -AIs), proporcionalmente determinou a diminuição da atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus* caracterizando uma curva tipo dose – resposta, segundo K.Kasahara *et al* 1996 a estequiometria molecular dos inibidores α -AIs, apresenta uma proporção 1:2, onde uma molécula de α -AIs, através de dois sítios de ligações independentes liga-se e inibe duas moléculas da amilase de pâncreas de suínos (PPA). Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos onde a estequiometria do complexo inibidor – enzima quando analisado por raio-x, indicaram a presença de duas moléculas de amilases de pâncreas suínos interagindo com um único dímero de α -AIs (C. Bompard *et al* 1996) estas descobertas contrastam com alguns resultados relatados anteriormente que referiam uma estequiometria 1:1 para o complexo inibidor – enzima (Marshall *et al* 1975).

A inibição da α -amilase de suco pancreático de suíno por α -AIs pode ser interpretado com base em um mecanismo não-competitivo misto do tipo abortivo conforme relatado anteriormente para o complexo α -amilase de pâncreas suíno e acarbose (inibidor não protéico), (M. Alkazaz *et al* 1996). Este tratamento assume que a interação enzima-inibidor não é irreversível. Estes resultados não estão em plena concordância com os de Marshall e Lauda que anteriormente relataram uma inibição não-competitiva para α -AIs de feijão vermelho.

Foram realizadas análises no potencial de inibição dos inibidores da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, quando expostos a altas temperaturas. Os resultados

demonstraram que os inibidores da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*, presente nas sementes de *Phaseolus vulgaris*, após 5 minutos a 100 °C e posteriormente pré – incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* onde apresentou a diminuição da atividade enzimática para 2% quando comparado a atividade enzimática do controle, o potencial inibitório foi de aproximadamente 98% (figura 19). Diferentemente quando o extrato inibitório após 30 minutos exposto a 100 °C e pré – incubados com o extrato enzimático de *Alphitobius diaperinus* para determinar a atividade enzimática, ocorreu o aumento da atividade enzimática para 70% quando comparado ao controle e a respectiva diminuição do potencial inibitório para aproximadamente 30% (figura 19). Esses resultados indicam que o potencial inibitório do extrato purificado parcialmente do inibidor de *Phaseolus vulgaris* é diminuído gradativamente quando expostos em altas temperaturas ao longo do tempo. Trabalhos realizados com inibidores do gênero *Phaseolus* *peã* quando expostos durante 10 minutos a 80 °C destruiu a atividade biológica do inibidor (Giri *et al* 1996).

Quando larvas de *Alphitobius diaperinus*, foram expostas aos diferentes tipos de rações, (inicial, crescimento, abate e postura), os extratos dos intestinos médios extraídos das larvas utilizados para determinar qualquer efeito das rações sobre a atividade enzimática. Foi observado um aumento da atividade enzimática da amilase no *Alphitobius diaperinus*, em resposta ao aumento da concentração de proteína bruta, têm sido relatados resultados semelhantes em gorgulhos de arroz e besouro vermelho de farinha (Feng *et al* 1996). Em contraste com as variações vistas em *Zabrotes subfasciatus* alimentados com diferentes rações, onde não foi observado um aumento da atividade enzimática da amilase (Silva *et al* 2001).

7 CONCLUSÕES

- Todas as variedades de *Phaseolus vulgaris*, apresentaram potencial inibitório contra a atividade enzimática da α -amilase de *Alphitobius diaperinus*.

- Foi observado quando o extrato inibitório de *Phaseolus vulgaris*, exposto a 100°C em relação ao tempo, perde gradativamente o potencial inibitório.

- Os resultados demonstraram que o aumento gradativo da concentração do extrato inibitório de *Phaseolus vulgaris*, determinou a diminuição da atividade enzimática de *Alphitobius diaperinus*.

- O tipo de ração de aves utilizado na alimentação do inseto influenciou na atividade enzimática do mesmo, o que pode ser útil no entendimento do ciclo biológico e controle do *Alphitobius diaperinus* em galpões comerciais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDS, J.J. Control, management of the litter beetle. *Poultry Digest*, v.44, p.172-176, (1987).
- ALKAZAZ, M.; DESSEAUX, V.; MARCHIS-MOUREN, G.; PAYAN, F.; FOREST, E.; SANTIMONE, M. The mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase. Kinetic evidence for two additional carbohydrate-binding sites. *European Journal Biochemistry*, 241, 787-796, (1996).
- AXTELL, R. C. Department of Entomology, **North Carolina State University**, Raleigh, NC 2., p. 7695-7613, (1999).
- BAKER, J. E. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochemistry*, 13: p.421-428, (1983).
- BERNFELD, P. Amylase α and β . **Methods in Enzymology** 1 p.149–158, (1955).
- BOOTH, R. G.; COX, M. L.; MADGE, R. B. II Guides to insects of importance to man. 3. Coleoptera. Londres, **International journal Entomology**: 384p, (1990).
- BOŽIĆ, N.; VUJČIĆ, Z.; NENADOVIĆ, V.; IVANOVIĆ, J. Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**: 134B, p. 231–234, (2003).
- BUONOCORE, V.; POERIO, E.; PACE, W.; PETRUCCI, T.; SILANO, V.; TOMASI, M. Interaction of *Tenebrio molitor* L. α -amylase with wheat our protein inhibitor. **FEBS Letters**: 67, p. 202 - 206, (1976).
- C. BOMPARD-GILLES.; P. ROUSSEAU.; P. ROUGE.; F. PAYAN. Substrate mimicry in the active center of a mammalian alpha-amylase: structural analysis of an enzyme–inhibitor complex, **Structure**: v.4, p.1441– 1452, (1996).
- CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the Bruchid beetle *Callosobruchos maculatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**: 92B, p. 51-57, (1989).
- CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Revista brasileira de Zoologia**: V.18 (2): p. 351 – 363, (2001).
- CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. Exigências Térmicas, Período de Desenvolvimento e Sobrevivência de Imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**: 30 (3) p.365-368, (2001).

CHERNAKI-LEFFER, A.M.; LAZZARI, F. A.; LAZZARI, S. M. N.; ALMEIDA, L. M. Controle do cascudinho. **Avicultura Industrial**: 1094: p. 22-25, (2001).

CHIPOULET, J.M.; CHARARAS, C. Survey and Electrophoretical Separation of the Glycosidases of *Rhagium inquisitor* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**: 80B: p. 241–246, (1985).

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W. R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**: 47: p. 143-155, (2001).

DE LAS CASAS, E.; POMEROY, B. S.; HAREIN, P. K. Infection and quantitative recovery of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius Diaperinus* (Panzer). **Poultry Science**: 47(6): p. 1871-5, (1968).

DOJNOV, B. Purification and properties of midgut α -amilase isolated form from *Morimus funereus* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 149, p.153-160, (2008).

DUNFORD, J. C.; KAUFMAN, P. E. Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera): Service, **Institute of Food and Agricultural Sciences**: University of Florida. Published March, Revised: June (2006).

EIDSON, C.S.; SCHMITTLE, S. C.; LAL, J. B.; GOODE, R. B. The role of darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) in the transmission of acute leukosis in chickens. **Poultry Science** : 44: p. 1366-1367, (1965).

F.M. LAJOLO.; F. FINARDO FILHO. Partial characterization of the amylase inhibitor of black beans (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23, **Journal of Agricultural Food Chemistry**: 33, p.132–138, (1985).

FALOMO, A. The Pheromone Biology of the Lesser Mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer), (Coleoptera: Tenebrionidae). Thesis, **University of Wisconsin-Madison**: (1986).

FENG, G. H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M. S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T. D.; AND REECK, G. R. α -amylase inhibitors from wheat: sequences and patterns of inhibition of insects and human α -amylases. **Insect Biochemistry: Mol. Biol.**26 (5): p. 419–426, (1996).

FINARDI-FILHO, E.; MIRKOV, M. J.; CHRISPPEELS, A. Putative precursor protein in the evolution of the bean α -amylase inhibitor. **Phytochemistry**: 43, p. 57-62, (1996).

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH J. R. C.; SILVA, C. P.; GROSSI DE SÁ, M. F. Activity of wheat α - amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal Biochemistry**: 267 (8), p. 1466-1473, (2000).

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI DE SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases, **European Journal Biochemistry**: 269, p. 397–412, (2002).

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; MENDES, P. A.; PAES, N. S.; YOKOYAMA, M.; COUTINHO, M. V.; BLOCH JR, C.; GROSSI DE SÁ. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* α -amylases and their inactivation by wheat inhibitors, **J. Journal of Agricultural Food Chemistry**: 53, p. 1585–1590, (2005).

FRELS, J. M.; RUPNOW, J. H. Purification and partial characterization of two α -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus Vulgaris*). **Jounal of Agricultural Food Chemistry**: 8, p. 281-301,(1984).

GIRI, P. A.; KACHOLE, S. M. Detection of electrophoretically separated amylase inhibitors in starch – polyacrylamide gels. **Journal of Chromatography A**: 752, p. 261-264, (1996).

GOODWIN, M. A.; WALTMAN, W. D. Transmission of Eimeria, viruses and bacteria to chicks: darkling beetles *Alphitobius diaperinus* as vector of pathogens. **Journal of Applied Poultry Research**: 5, p. 51-55, (1996).

GROSSI DE SÁ, M. F.; MIRKOV, T. E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K. S.; CHRISPEELS, M. J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**: 203, p. 295–303, (1997).

HO, M. F.; WHITAKER, J. R. Purification and partial characterization of white kidney beans (*Phaseolus Vulgaris*) α -amylase inhibitors from two experimental cultivars. **Journal Food Biochemistry**: 17, p. 15 – 33, (1993).

HO, M. F.; YIN, X.; FILHO, F. F.; LAJOLO, F.; WHITAKER, J. R. Naturally occurring α -amylase inhibitors: Structure/function relationships. In *Protein Structure-Function Relationships in Foods*; Yada, R. Y.; Jackman, R. L.; Smith, J. L.; Eds.; **Bishopbriggs, Blackie, Academic and Professional**: Glasgow, Scotland, pp 89-119, (1994).

HONAVAR, P. M.; SHIH, C. V.; LIENER, I. E. Inhibition of the Growth of Rats by Purified Hemagglutinin Fractions Isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Department of Agricultural Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota*, **Journal Nutrition**: 77, p. 109-114, (1962).

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. Protective mechanisms of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**: 111, p. 393-401, (1996).

JANECEK, S. Structural Features and Evolutionary Relationships in the α -Amylase Family. In: *Glycoenzymes* (Eds. M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Ishijima, T. Kuriki), pp. 19-54, **Japan Scientific Societies Press**: Tokyo, (2000).

- KASAHARA, K.; HAYASHI, K.; ARAKAWA, T.; PHILO, J. S.; WEN, J.; HARA, S.; YAMAGUCHI, H. Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic α -amylase of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans, **Journal Biochemistry**: 120, p. 177–183, (1996).
- KRAULIS, P. J. Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**: 24, p. 946 – 950, (1991).
- LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**: 227, p. 680–685, (1970).
- LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**: 56, 219–227, (1990).
- LESCHEN, R. A. B.; STEELMAN, C. D. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larve and adult mouthparts. **Entomological News**: v. 99, n. 4, p. 221-224, (1988).
- LOMBRAÑA, M.; SUÁREZ, P.; SAN JUAN, F. Two forms of α -amylase in mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: purification and molecular properties of form II. **Comparative Biochemistry Physiology**: 142B, 56–66, (2005).
- LOMÔNACO, C.; PRADO, A. P. Estrutura comunitária e dinâmica populacional da fauna de dípteros e seus inimigos naturais em granjas avícolas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**: 23 (I), p 71-80, (1994).
- LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L.; RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent - **Journal Biological Chemistry**: 265-275, (1951).
- MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal Biological Chemistry**: 250, p. 8030-8037, (1975).
- MORENO, J.; CHRISPPEELS, M. J. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: USA 86, p. 7885-7889, (1989).
- NODAN, R O.; TSAI, S. M.; GILBERTEON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean 2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theor. Appl. Genet**: 85, p. 513-520, (1993).
- PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors, **Biochimica et Biophysica Acta**: 1696, p. 171-180, (2004).
- PODOLER, H.; APPLEBAUM, S.W.; The α -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. **Biochemistry Faculty of Agriculture**: The Hebrew University, Rehovot, Israel, 121, p. 321–325, (1971).

PREISS, F. J.; DAVIDSON, J. A. Characters for Separating Late-Stage Larvae, Pupae, and Adults of *Alphitobius diaperinus* and *A. laevigatus* (Coleoptera: Tenebrionidae) Source: **Annals of the Entomological Society of America**: Volume 63, Number 3, 15, pp. 807-808, May (1970).

PUEYO, J. J.; HUNT, D. C.; CHRISPPEELS, M. J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. **Plant Physiology**: 101, p. 1341-1348, (1993).

RICHARDSON, M. Seed storage protein: the enzyme inhibitor, In: **Methods in Plant Biochemistr**: New York: Acad Press, v. 5 p. 295 – 305, (1991).

ROUGE, P.; BARRE, A.; CAUSSE, H.; CHATELAIN, C.; PORTHE, G. Arcelin and α -amylase inhibitor from the seeds of common bean (*Phaseolus Vulgaris*) are truncated lectins. **Biochemical Systematics and Ecology**: 21, p. 695-703, (1993).

SARIN, K. Digestive enzymes in immature and adult stages of *Alphitobius diaperinus*. **Entomological society of Japan**: 41, p. 10-17, (1973).

SILVA C. P.; TERRA W. R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI DE SÁ, M. F.; LOPES, A. R.; PONTES, E. G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 29, p. 355–366, (1999).

SILVA D. P.; CASADO-FILHO, E. L.; CORREA, A. S.; FARIAS L. R.; BLOCH J. R. C.; GROSSI-DE-SÁ M. F.; MENDES P. A.; QUIRNO B. F.; NORONHA E. F.; FRANCO O. L.; Identification of an α -amylase inhibitor from *Pterodon pubescens* with ability to inhibit cowpea weevil digestive enzymes, **Journal Agricultural Food Chemistry**: 55,4382–4387, 2007.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ISEJIMA, E. M.; DAMATTA, R. A.; MIGUENS, F. C.; BIFANO, T. D.; Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -mylases in response to different diets. **Insect Biochemistry and Insect Molecular Biology**: 31, p. 41–50, (2001).

SIVAKUMAR, S.; MOHAN, M.; FRANCO, O. L.; THAYUMANAVAN, B. Inhibition of insect pest α -amilase by little and finger millet inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**: v. 85, n. 3, p. 155-160,(2006).

SNEDEKER, C. F. K.; MOULTHROP, I. M. Some studies on the infectious bursal agent. **Avian diseases**: n. 11, p.519-528, (1967).

STROBL, S.; MASKOS, K.; BETZ, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RUÈ TH, F. X.; GLOCKSHUBER, R. Crystal structure of yellow mealworm α -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**: 278, p. 617-628, (1998).

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzyme: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B** 109: p. 1-62, (1994).

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B. P.; DILLON, R. J. Digestive enzymes. In: *Biology of the Insect Midgut*. Edited by Lehane, M. J.; Billingsley, P. F. **Chapman and Hall**: London, pp. 153–194, (1996).

VALLEE, B. L.; STEIN, E. A.; SUMERWELL, W. N.; FISCHER, E. H. Metal content of α -amylase of various origins. **Journal Biological Chemistry**: 234, p. 2901–2905, (1959).

VIOLET, M.; MEUNIER, J. C. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* α -amylase. **Biochemical journal**: v. 263, p. 665-670, (1989).

WILSON, T. H.; MINNER, F. D. Influence of temperature on development of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Kansas Entomology Society**: 42, p. 294-303, (1968).

YOUNG, N. M.; THIBAUT, P.; WATSON, D. C; CHRISPEELS, M. J. Post-translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **FEBS Letters**: 446, p. 203-206, (1999).

ZIEGLER, P. Partial purification and characterization of the major endo amylase of mature pea leaves. **Plant Physiology**: 86, p. 659–666, (1988).