

KÊNIA VIÇOSO GOMES LOPES

**PURIFICAÇÃO PARCIAL, PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E
CINÉTICAS DE α -AMILASES DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus
zeamais* RESISTENTES E SUSCEPTÍVEL A PIRETRÓIDES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L864p
2008

Lopes, Kênia Viçoso Gomes, 1976-
Purificação parcial, propriedades bioquímicas e cinéticas
de α -amilases de populações de *Sitophilus zeamais* resis-
tentes e susceptível a piretróides / Kênia Viçoso Gomes
Lopes. – Viçosa, MG, 2008.
x, 73f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 53-73.

1. Enzimas - Purificação. 2. Amilase. 3. Resistência aos
inseticidas. 4. Gorgulho. 5. Cinética enzimática.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

KÊNIA VIÇOSO GOMES LOPES

**PURIFICAÇÃO PARCIAL, PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DE
 α -AMILASES DE POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais* RESISTENTES E
SUSCEPTÍVEL A PIRETRÓIDES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de abril de 2008.

Prof. Joel Antônio de Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Sebastião Tavares de
Rezende

Prof^a. Valéria Monteze de Rezende

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

Prof^a Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Presidente da Banca)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida mãe, Araci, pelo apoio e a Larinha, minha filha, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar me abençoando, protegendo toda minha família e as pessoas que estão à minha volta e ao meu protetor especial, São Jorge, que abre sempre meus caminhos, salve!

Aos meus queridos pais, José e Araci, e meus irmãos, Gustavo e Michelle, que sempre me cobriram de muito amor e companheirismo durante todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do doutorado.

Tenho que fazer um agradecimento muito especial ao meu tão estimado orientador, Raul Narciso Carvalho Guedes, que depositou confiança em mim, sendo sempre compreensivo nos momentos difíceis, me dando a orientação e o incentivo necessários para seguir em frente e conquistar tudo que conquistei.

Devo também muitos agradecimentos à minha co-orientadora Maria Goreti de Almeida Oliveira, que teve uma grande participação na realização deste trabalho, me dando apoio, sugestões e sendo sempre amiga e companheira em todos os momentos.

Ao co-orientador Joel Antônio de Oliveira pela colaboração, amizade e apoio.

A todos os demais professores pelos conhecimentos e ajuda nos momentos necessários.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial, ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela atenção, dedicação e amizade.

A todos os funcionários do BIOAGRO e professores da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO e do Laboratório de Ecotoxicologia, obrigada pela convivência tranqüila e cordial.

Às grandes amigas Luciana, Angélica, Fabrícia e Liliane que não mediram esforços para me ajudar na realização do meu trabalho.

Ao Sr. Fausto Sant'Anna pela amizade e colaboração com o Laboratório de Enzimologia.

Enfim, agradeço a todos aqueles que conviveram comigo durante esta etapa importante de minha vida e me ajudaram a crescer como pessoa.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>S. zeamais</i> : Importância econômica e resistência	4
2.2. Família α -amilase	11
2.3. Inibidores de α -amilases	18
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivos Gerais	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Reagentes utilizados	23
4.2. Populações de <i>S. zeamais</i>	23
4.3. Determinação da atividade de amilase.....	24
4.4. Determinação da concentração de proteína	24
4.5. Purificação das α -amilases de <i>S. zeamais</i>	25
4.6. Eletroforese em gel de poli(acrilamida).....	26
4.7. Caracterização bioquímica e cinética das α -amilases das populações de <i>S. zeamais</i>	27
4.7.1. Efeito do pH sobre a atividade da enzima.....	27
4.7.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima	27
4.7.3. Efeito do íon cloreto sobre a atividade da enzima	27
4.7.4. Efeito de inibidores sobre a atividade da enzima.....	28
4.7.4.1. Inibidor Acarbose	28
4.7.4.2. Inibidor <i>Triticum aestivum</i>	28
4.7.5. Determinação do grau de glicosilação da enzima	28

4.7.6. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})	29
4.7.7. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Purificação das α -amilases das populações de <i>S. zeamais</i>	29
5.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α - amilases das populações de <i>S. zeamais</i>	36
5.3. Caracterização bioquímica e cinética das α -amilases purificadas das populações de <i>S. zeamais</i>	39
5.3.1. Efeito do pH	39
5.3.2. Efeito da temperatura	41
5.3.3. Efeito do íon cloreto	42
5.3.4. Efeito de inibidores	43
5.3.5. Grau de glicosilação das enzimas purificadas	46
5.3.6. Parâmetros cinéticos	47
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ABREVIATURA E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
C°	Graus Celsius
CI	Concentração inibitória
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GABA	Ácido γ -aminobutírico
g	Unidade de força centrífuga relativa
kDa	Kilodalton
K _m	Constante de Michaelis-Menten
μ g	Microgramas
mg	Miligramas
μ L	Microlitros
mL	Mililitros
MM	Massa molecular
nm	Nanômetro
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
S	Substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA	Unidade de atividade enzimática
Vo	Velocidade inicial
V _{max}	Velocidade máxima

RESUMO

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008. **Purificação Parcial, Propriedades Bioquímicas e cinéticas de α -amilases de Populações de *Sitophilus zeamais* Resistentes e susceptível a Piretróides.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-orientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Joel Antônio de Oliveira.

Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), destaca-se como a principal praga que ataca o milho armazenado causando grandes prejuízos. O controle deste inseto é feito principalmente por inseticidas, sendo que o uso intensivo desses compostos levou à ocorrência de diversos casos de resistência. A expressão da resistência a inseticidas geralmente induzem efeitos deletérios no inseto. Populações de *S. zeamais* com susceptibilidades distintas a inseticidas podem apresentar maior eficiência na digestão do amido ingerido pela maior atividade de α -amilase em populações resistentes. Isso possibilitaria ao inseto um maior acúmulo de reservas no corpo gorduroso para manutenção de seus aparatos de defesa sem ocasionar prejuízo ao seu crescimento e desenvolvimento. Para obtenção das α -amilases purificadas foram feitas sequencialmente uma precipitação com glicogênio e uma cromatografia de troca iônica. A enzima purificada da população resistente sem custo apresentou uma atividade de α -amilase semelhante à obtida para a população susceptível e maior em relação à população resistente com custo. O perfil de eluição referente a purificação das enzimas das duas populações resistentes evidenciou a presença de mais de um pico com atividade de α -amilase sugerindo a produção de isoformas com pontos isoelétricos diferentes. As α -amilases purificadas das três populações apresentaram uma massa molecular de 53,7 kDa por SDS-PAGE. A maior atividade em todas as populações foi em pH 5,0, numa faixa de temperatura de 30 a 40°C. O inibidor acarbose e o inibidor proteínáceo extraído de trigo se mostraram efetivos em inibir parcialmente as α -amilases, sendo que a α -amilase da população resistente sem custo se mostrou menos vulnerável à inibição. A população resistente sem custo fisiológico associado ao fenômeno da resistência apresentou uma maior atividade e maior produção da enzima quando comparada à população resistente com custo e a população susceptível. A maior produção da enzima estaria possibilitando um maior estoque energético no corpo gorduroso dos insetos permitindo a manutenção dos mecanismos de resistência sem comprometer os demais processos fisiológicos. Dessa forma, os maiores níveis de α -amilase estariam contribuindo para mitigar o custo

fisiológico associado aos mecanismos de resistência na população resistente sem custo de *S. zeamais*.

ABSTRACT

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2008. **Partial purification, kinetic and biochemical properties of α -amilases in pyrethroids-susceptible and -resistants populations of the *Sitophilus zeamais*.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Joel Antônio de Oliveira.

Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), stands out as the main pest that attacks the stored grain causing great damages. The control of this insect is made mainly by insecticides, and the intensive use of those compounds took to the occurrence of several cases of resistance. The expression of the resistance to insecticides usually induces harmful effects in the insect. Populations of *S. zeamais* with susceptibilities different to insecticides can present larger efficiency in the digestion of the starch ingested by the largest α -amylase activity in resistant populations. That would make possible the insect a larger accumulation of nutrients in the fat body for maintenance of their defense components without causing damage to its growth and development. For obtaining of the purified α -amylases were made sequentially a precipitation with glycogen and an ion-exchange chromatography. The purified enzyme of the resistant population without cost presented an α -amylase activity similar to obtained her for the population susceptible and larger in relation to the resistant population with cost. The elution profile regarding purification of the enzymes of the two resistant populations evidenced the presence of more than a peak with α -amylase activity suggesting the isoforms production with isoelectric points different. The purified α -amylases of the three populations presented a molecular mass of 53.6 kDa for SDS-PAGE. The largest activity in all of the populations was in pH 5.0 in a range of temperature from 30 to 40 °C. The inhibitor acarbose and the inhibitor extracted of wheat were shown effective in inhibiting the α -amylases partially and the amylase of the resistant population without cost showed less vulnerable to the inhibition. The resistant population without physiologic cost associate to the phenomenon of the resistance presented a larger activity and larger production of the enzyme when compared to the resistant population with cost and the susceptible population. The largest production of the enzyme would be making possible a larger energy stock in the fat body of the insects allowing the maintenance of the resistance mechanisms without compromise the other physiologic processes. In that way, the largest α -amylase levels would

be contributing to mitigate the physiologic cost associate to the resistance mechanisms in the resistant population without cost of *S. zeamais*.

1. INTRODUÇÃO

O caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), é considerado a principal praga do milho armazenado devido ao seu elevado potencial biótico, capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto em silos, e por sobreviver dentro da massa dos grãos. Dentre os prejuízos causados pela praga, destaca-se a perda da massa e do poder germinativo das sementes infestadas, o que leva a desvalorização comercial dos grãos (Faroni, 1992). Além disso, a presença dos carunchos nos grãos favorece o desenvolvimento de fungos de armazenamento como *Aspergillus flavus* e a conseqüente produção de aflatoxinas (Beti *et al.*, 1995).

Os prejuízos causados por *S. zeamais* ocasionam a aplicação contínua de medidas de controle. No Brasil utilizam-se, principalmente, os inseticidas protetores e fumigantes. Contudo, o uso intensivo de inseticidas tem ocasionado a seleção de populações de insetos resistentes a estes compostos (Lorini, 2001). Guedes *et al.* (1995) detectaram resistência aos inseticidas DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e piretróides em populações de *S. zeamais* provenientes de cinco estados brasileiros. No entanto, foi observado um retrocesso na dispersão da resistência nessas populações (Ribeiro *et al.*, 2003). Esse fenômeno pode estar sendo causado pela ocorrência de uma desvantagem adaptativa dos indivíduos resistentes no ambiente sem inseticidas, já que a evolução da resistência geralmente está associada a um custo adaptativo (Cousteau *et al.*, 2000; Haubruge & Arnaud, 2001).

A adaptação de indivíduos a um novo ambiente irá depender da expressão de genes específicos que, apesar de conferirem resistência, também estão associados a um custo adaptativo. Assim, em um ambiente livre de inseticidas, indivíduos que possuem esses genes podem apresentar desvantagens em relação a outros fenótipos que foram moldados por pressões de seleção independentes (Cousteau *et al.*, 2000, Berticat *et al.*, 2002).

A expressão da resistência geralmente causa efeitos deletérios aos insetos, já que a manutenção dos mecanismos destoxificativos ocasiona um

aumento na taxa metabólica, o que provoca um eventual desequilíbrio nas trocas gasosas. Se não houver um incremento no metabolismo energético, a realocação de energia para os mecanismos de resistência pode comprometer os demais processos fisiológicos do organismo, como o desenvolvimento e a reprodução (Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999; Cousteau *et al.*, 2000). No entanto, exceções já foram observadas. Fragoso *et al.* (2005) verificaram que populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides não apresentaram custo em relação a seu desempenho reprodutivo, quando comparadas a populações susceptíveis em um ambiente livre de inseticidas. Esse fato foi confirmado posteriormente por Oliveira *et al.* (2007) que submeteram essas mesmas populações resistentes a experimentos de competição direta com a população susceptível de *S. zeamais*.

Estudos também demonstraram a inexistência de custos fisiológicos associados à resistência em outras espécies de insetos-praga, como o besouro vermelho das farinhas *Tribolium castaneum* e o mosquito *Culex pipiens* (Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001). A diminuição do custo é associado a presença de genes modificadores que tem efeito dominante, cuja expressão suprime o custo. Porém, o processo fisiológico envolvido ainda não foi elucidado (Chevillon *et al.*, 1997).

No intuito de fornecer maiores evidências da existência ou não de um custo fisiológico associado à resistência em populações de *S. zeamais*, Guedes *et al.* (2006) realizaram estudos sobre a morfologia do corpo gorduroso desses insetos, que reflete maior ou menor disponibilidade de reservas para a manutenção do organismo, e análises sobre variações na taxa respiratória média dos insetos, que contribuem para a detecção de possíveis custos associados à resistência em ambientes livres de inseticidas.

Os experimentos mostraram que a população resistente, coletada no município de Juiz de Fora – MG, apresentava uma taxa respiratória, massa corporal e área de trofócitos superiores a população susceptível, proveniente do município Sete Lagoas - MG. Porém, o seu desenvolvimento foi inferior. A realocação de energia para suprir os mecanismos de defesa nessa população poderia estar prejudicando o desenvolvimento normal dos indivíduos, constituindo um custo fisiológico associado ao fenômeno da resistência. No entanto, outra população resistente avaliada (proveniente do município de

Jacarezinho - PR) apresentou melhores resultados em todos os parâmetros testados indicando que a maior alocação de energia armazenada no corpo gorduroso estaria sendo utilizada tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção dos mecanismos envolvidos na resistência do inseto promovendo, assim, a mitigação do custo fisiológico associado ao fenômeno.

Suspeitando-se que o custo da resistência a inseticidas nessas populações poderia se correlacionar com alterações na atividade de enzimas importantes do metabolismo energético, Araújo *et al.* (2008) realizaram ensaios com extratos enzimáticos dos insetos provenientes da população resistente com custo (Juiz de Fora), da resistente sem custo (Jacarezinho) e da população susceptível a inseticidas (Sete Lagoas).

A alta atividade das enzimas trealase e lipase observadas na população com custo estaria ligada a uma menor acumulação de energia e, conseqüentemente, a um menor peso corporal, já que o estoque de nutrientes estaria sendo realocado para manter o alto nível de resistência a piretróides em detrimento da manutenção dos processos fisiológicos básicos dos insetos. No entanto, a população resistente sem custo fisiológico aparente demonstrou uma maior atividade de amilase, sugerindo uma maior eficiência na obtenção de energia a partir do amido, o que estaria possibilitando uma maior estocagem de reservas e uma maior obtenção de energia imediata para manter os processos fisiológicos e os mecanismos de resistência.

A intensa seleção exercida sobre a população resistente (sem custo) pelo uso intenso e prolongado de inseticida deve ter favorecido a seleção de genes modificadores, cuja expressão estaria mitigando o custo. A mitigação do custo associado à resistência pode estar minimizando a necessidade de alta mobilização de energia em favor do armazenamento devido a maior eficiência da digestão do amido (Araújo *et al.*, 2008).

Em insetos, somente α -amilases (α -1,4-glicano-hidrolase; EC 3.2.1.1) têm sido encontradas hidrolizando ligações glicosídicas α -(1→4) do amido ou glicogênio (Baker, 1983; Terra & Ferreira, 1994). A atividade de α -amilase já foi descrita em várias ordens de insetos, incluindo: Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hemiptera (Baker & Woo, 1985; Baker, 1987; Terra *et al.*, 1988; Zeng & Cohen, 2000).

Sitophilus spp., como várias outras pragas que se alimentam de uma dieta rica em carboidratos durante seus estágios larval e adulto, dependem especialmente da atividade de α -amilase para sobreviver (Baker, 1983; Baker & Woo, 1985). A enzima atua convertendo o amido da dieta em maltose e maltotriose que, posteriormente, são hidrolisadas em glicose pela ação das α -glicosidases. As moléculas de glicose produzidas podem ser armazenadas na forma de glicogênio e trealose ou, então, serem oxidadas enzimaticamente pelo processo de respiração celular com produção de energia, que será utilizada para suprir os processos metabólicos do organismo (Lehninger *et al.*, 2000).

A alta atividade de α -amilase em populações resistentes a inseticidas que não possuem um custo associado, pode estar sustentando as bases fisiológicas dos mecanismos de mitigação desse custo nas populações resistentes a piretróides (Araújo *et al.*, 2008). Assim, a purificação e a caracterização das α -amilases têm sua importância em relação aos mecanismos de resistência em *S. zeamais*, já que elas possuem relação direta com o metabolismo energético por promover a obtenção de energia, através da quebra do amido, que será utilizada nos processos fisiológicos básicos e na manutenção dos mecanismos de resistência a inseticidas.

Assim, a presente pesquisa objetivou purificar e caracterizar α -amilases de duas populações resistentes a inseticidas piretróides e de uma população susceptível de *S. zeamais*. As populações resistentes utilizadas são as de Juiz de Fora (com custo associado à resistência) e de Jacarezinho (sem custo) e a população susceptível foi obtida no município de Sete Lagoas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Sitophilus zeamais*: Importância econômica e resistência

A cultura do milho ocupou, em 2006, uma área de 13 milhões de hectares, responsável por uma produção de cerca de 44,7 milhões de

toneladas de grãos, de acordo com a Conab. O milho tem grande importância como base da alimentação humana e animal. Com o crescimento populacional há a necessidade de se aumentar a produção de grãos e minimizar as perdas de grande parte das safras agrícolas decorrentes de falhas na colheita, transporte e armazenamento. Vários fatores, como: métodos incorretos de armazenagem, estruturas armazenadoras impróprias e ataque de pragas, influenciam nessas perdas. No Brasil, as perdas devido ao ataque de pragas chegam a 20% da produção total do grão, demandando a necessidade de novas pesquisas e tecnologias (Gallo *et al.*, 2002).

Em condições tropicais, os insetos assumem particular importância como pragas dos grãos armazenados porque se desenvolvem muito bem na massa dos grãos, pois são adaptados a uma dieta a base de material vegetal seco. A ação contínua dos insetos, além dos prejuízos causados pela redução severa de peso, deprecia também o valor comercial e nutricional dos grãos, favorece a atuação de fungos e provoca a deterioração do produto armazenado pelo aumento da umidade e da temperatura na massa de grãos devido ao metabolismo dos insetos (Faroni, 1992).

Segundo Gallo *et al.* (2002), *Sitophilus* spp. são as pragas mais importantes dos grãos armazenados no Brasil e a sua infestação é favorecida por algumas características importantes como: elevado potencial biótico, praga de profundidade, apresentam infestação cruzada e tanto as larvas como os adultos danificam os grãos. *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) e *Sitophilus granarius* (Linnaeus) são pragas extremamente destrutivas e possuem ampla distribuição em todo mundo, sendo *S. granarius* comumente encontrado em regiões mais frias e as outras duas espécies são típicas de áreas tropicais e subtropicais (Wakefield *et al.*, 2005). Classificam-se como insetos primários internos porque rompem o grão e alimentam-se do seu conteúdo interno (Lima *et al.*, 1979). São também polívoros, tendo a capacidade de atacar diversos produtos: *Sitophilus zeamais* ocorre em milho e arroz, mas também se desenvolve muito bem em sorgo (Faroni, 1992).

O caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), é uma praga cosmopolita que se destaca dentre os demais insetos que atacam o milho (*zea mays*) por ser o mais destrutivo, podendo ocasionar perdas que atingem até 30 % dos grãos armazenados em fazendas

(Miranda *et al.*, 1995). O controle dessa praga é realizado, principalmente, através do uso de inseticidas. Porém, a forma inadequada de aplicação tem contribuído para a seleção de populações de insetos resistentes.

A resistência a inseticidas em populações de *S. zeamais* tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de falhas no controle dessa espécie (Guedes *et al.*, 1995; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). No início dos anos noventa, Guedes *et al.* (1995) relataram resistência aos inseticidas DDT e piretróides em populações de *S. zeamais* provenientes de cinco Estados brasileiros. Posteriormente, resistência a piretróides foi detectada novamente em populações de *S. zeamais* recolhidas em diferentes localidades do Brasil (Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003).

A resistência ao DDT e piretróides é um tipo de resistência cruzada (onde um mesmo mecanismo confere resistência a dois ou mais compostos) conhecida como “knockdown resistance”- *kdr*. Esse termo é usado para descrever casos de resistência ao DDT e piretróides em artrópodes, sendo causada pela sensibilidade reduzida dos canais de Na⁺ no sistema nervoso (Soderlund & Knipple, 2003).

Piretróides são ésteres derivados das piretrinas naturais, cuja estrutura química é a base para a síntese de uma variedade de inseticidas piretróides sintéticos como a permetrina, deltametrina e cipermetrina. Esses compostos são utilizados no controle de vários grupos de insetos (Shafer *et al.*, 2005).

O modo de ação dos piretróides é similar ao do DDT. Basicamente, a molécula do inseticida se liga a proteína associada ao canal de Na⁺ impedindo seu fechamento. Como consequência, o neurônio não consegue retornar à condição de repouso (-70mV) ocorrendo um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos. A ação inseticida primária é a inativação do canal de Na⁺ levando a repetidas descargas elétricas, atividade convulsiva e eventual paralisia que culmina na morte do inseto (Bloomquist, 1999; Soderlund & Knipple, 2003).

A base molecular da knockdown resistance ao DDT e piretróides já foi investigada em várias espécies de insetos como: *Drosophila melanogaster* (Amichot *et al.*, 1992), *Musca domestica* (Williamson *et al.*, 1996), *Heliothis virescens* (Taylor *et al.*, 1993), *Blattella germanica* (Dong & Scott, 1994) e *Haematobia irritans* (Guerrero *et al.*, 1997), o que permitiu identificar pontos de

mutação em vários genes associados à expressão da resistência. Assim, mutantes *kdr* possuem alterações estruturais nos resíduos de aminoácidos das proteínas que formam os canais de Na⁺. O efeito principal dessas mutações é o aumento da taxa de dissociação do complexo canal de Na⁺- piretróide impedindo, assim, a ação do inseticida (Feyereisen, 1995; Soderlund & Knipple, 2003). Diferentemente da resistência causada pelo aumento da atividade de enzimas detoxificativas, knockdown resistance não é afetada pelo emprego de sinergistas que inibem esterases e monooxigenases de insetos (Soderlund & Knipple, 2003).

Uma população composta por organismos resistentes desenvolve-se a partir da sobrevivência e da reprodução de indivíduos que possuem alterações no genoma responsáveis pela expressão de um ou mais mecanismos que permitam a sobrevivência após a exposição ao inseticida (Roush & Daly, 1990; McKenzye, 1996).

Os mecanismos que conferem resistência a inseticidas são, segundo McKenzye (1996), divididos em: (i) Mecanismos comportamentais, que conferem ao inseto a capacidade de evitar a dose letal do inseticida, o que depende da capacidade de aprendizado do inseto, de modificações genéticas nos receptores periféricos de estímulos ou nos sistemas centrais de processamento de estímulos; (ii) Mecanismos fisiológicos, que podem conferir uma redução da penetração da toxina pela cutícula do inseto, sequestro, onde ocorre o isolamento do composto tóxico em estruturas insensíveis ou quimicamente inertes e, pode haver também, um aumento da taxa de excreção do inseticida inalterado pelo inseto; (iii) Mecanismos bioquímicos, os quais geram um aumento na detoxificação metabólica, principalmente pela ação de enzimas detoxificativas, sendo as principais: monooxigenases dependentes do citocromo P450, esterases e glutadiona S-transferases.

A atuação das enzimas detoxificativas promove a inserção de um grupo polar reativo no xenobiótico lipofílico tornando-o mais solúvel em água, o que facilita seu processo de excreção. Outro tipo de mecanismo bioquímico relacionado à resistência a inseticidas é a redução da afinidade pelo sitio de ação causada por alterações estruturais, como ocorre na enzima acetilcolinesterase (alterando a afinidade a carbamatos e fosforados), na

knockdown resistance e nos receptores GABA (alterando a afinidade por ciclodienos) (Feyereisen, 1995; Soderlund & Knipple, 2003).

Resistência é a capacidade de uma população de suportar doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da espécie. A resistência deve ser vista como um fenômeno de pré-adaptação, isto é, o inseticida não induz as mudanças hereditárias, mas somente seleciona, em cada geração, os genes responsáveis pela resistência que são encontrados em uns poucos indivíduos (Roush & Daly, 1990; McKenzie, 1996).

O fenômeno de resistência a inseticidas está associado a modificações genéticas que ocorrem no inseto capacitando-o a uma melhor adaptação quando submetido a condições desfavoráveis (Liu *et al.*, 2000). No entanto, modelos relacionados à evolução da resistência geralmente compartilham a suposição de que a expressão da resistência está associada a um custo adaptativo (Cousteau *et al.*, 2000).

Várias explicações funcionais de custo têm sido propostas e testadas. Tipicamente, a superexpressão de um receptor específico ou de uma enzima detoxificativa deve desviar energia necessária a outras funções relacionadas ao desempenho do organismo. Ou seja, para expressar os mecanismos de defesa haverá custo (Feyereisen, 1995; Cousteau *et al.*, 2000).

Ainda assim, há relatos de ausência de custo adaptativo em algumas espécies-praga resistentes a inseticidas (Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001). Fragoso *et al.* (2003) relataram que, num ambiente livre de inseticidas, populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides não apresentaram custo, em relação ao seu desempenho reprodutivo, quando comparadas com populações susceptíveis. Modificações alélicas e seleção de genes modificadores podem estar envolvidas com um menor custo adaptativo relacionado à resistência a inseticidas (Cousteau *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002). Porém, as bases dos processos fisiológicos ligados a diminuição do custo ainda não foram esclarecidas.

Whittehead *et al.* (1985) afirmaram que, para que uma população de insetos resistentes a inseticidas ser desfavorecida adaptativamente, na ausência de inseticidas, é necessário que a magnitude do custo associado seja

suficiente para alterar o desenvolvimento da população, principalmente nos genótipos heterozigotos quando a resistência é dominante.

Fragoso *et al.* (2005), utilizando avaliações demográficas, constataram que a população resistente a inseticidas de *S. zeamais*, proveniente do município de Jacarezinho, possuía um desempenho semelhante à população susceptível proveniente de Sete Lagoas. A população de Jacarezinho, no passado, foi submetida a uma intensa exposição ao DDT durante um longo período. O desenvolvimento da resistência ao DDT nessa população levou a resistência cruzada a piretróides devido à redução da sensibilidade do sítio de ação nos canais de Na⁺, que é o principal mecanismo de resistência a piretróides nessa população (Fragoso *et al.*, 2003). No entanto, a população de Jacarezinho vem sendo mantida a mais de uma década na ausência de inseticidas sem ocorrer redução da resistência, o que sugere que a resistência já se encontra fixada nessa população e que a expressão dos genes responsáveis não mais acarretam um desfavorecimento adaptativo.

O longo período de seleção para resistência a um determinado inseticida pode ocasionar modificações nos genes responsáveis pela expressão da resistência, reduzindo seus custos fisiológicos associados. Adicionalmente, genes de resistência com menores custos adaptativos, podem substituir os primeiros genes que conferiam resistência ao DDT em virtude da dificuldade de manutenção, nas populações portadoras, dos genes com custo associado (Chevillon *et al.*, 1997; Boivin *et al.*, 2003).

A expressão da resistência a inseticidas não representa uma vantagem num ambiente livre desses compostos, já que a manutenção dos aparatos detoxificativos requer gastos adicionais de energia, o que pode comprometer o desempenho dos indivíduos resistentes quando comparados aos susceptíveis (Chevillon *et al.*, 1999; Cousteau *et al.*, 2000).

Fragoso *et al.* (2003), investigando a atividade enzimática *in vitro* de glutadiona S-transferases e de fosfotriesterases em populações de *S. zeamais* mantidas livres de inseticidas, puderam constatar que as populações resistentes apresentavam uma atividade maior dessas enzimas em relação a população susceptível. A maior atividade de detoxificação enzimática está relacionada a uma maior taxa de respiração nos indivíduos resistentes, o que pode levar a um desequilíbrio nas trocas gasosas refletindo num custo

fisiológico causado pela realocação de energia de outros processos metabólicos básicos para o organismo (Chown & Gaston, 1999; Harak *et al.*, 1999).

Guedes *et al.* (2006), avaliando variações nas taxas respiratórias médias dos insetos, que reflete custos adaptativos associados à resistência a inseticidas e, avaliando também modificações na morfologia do corpo gorduroso, que reflete a disponibilidade e mobilização de reservas para a manutenção do organismo, puderam constatar que a população resistente de Jacarezinho apresentou melhores resultados em todos os parâmetros avaliados. Isso evidencia que a realocação de energia nessa população estaria sendo feita de modo mais eficiente, suprindo os mecanismos de defesa sem prejudicar seu desenvolvimento e desempenho reprodutivo. Assim, a maior taxa metabólica apresentada pela população de Jacarezinho estaria relacionada à mitigação do custo fisiológico tornando esses insetos capazes de produzirem seus aparatos de defesa sem comprometer os outros processos fisiológicos.

A população resistente de Juiz de Fora, mesmo apresentando resultados superiores à população susceptível de Sete Lagoas em relação à taxa respiratória, massa corporal e área de trofócitos, mostrou desempenho inferior frente às outras duas populações. Esse resultado suporta a hipótese de que a realocação de energia necessária a manutenção dos mecanismos de defesa a inseticidas estaria prejudicando o desenvolvimento da população evidenciando, assim, a existência de um custo adaptativo (Guedes *et al.*, 2006).

A mitigação do custo fisiológico associado à expressão da resistência permite a manutenção dos mecanismos detoxificativos sem comprometer os demais processos fisiológicos do inseto (Guedes *et al.*, 2006). No intuito de prover maiores esclarecimentos a respeito dos processos fisiológicos que estariam sendo alterados para suprir o custo associado à resistência, Araújo *et al.* (2008) realizaram ensaios *in vitro* com as principais enzimas envolvidas no metabolismo energético das três populações de *S. zeamais* citadas. Determinou-se também o nível de resistência a piretróides nas três populações.

A população resistente que apresenta custo (Juiz de Fora) mostrou um nível de resistência duas vezes maior quando comparado a outra população resistente (Jacarezinho), que não demonstra custo fisiológico associado à

resistência. Além disso, a população resistente com custo apresentou uma atividade maior de trealase, que hidrolisa trealose, e lipase, que hidrolisa lipídios, sugerindo uma maior mobilização de reservas no corpo gorduroso desses insetos para o fornecimento de energia. A alta atividade dessas duas enzimas estaria ligada a uma menor acumulação de energia e, conseqüentemente, a um menor peso corporal, já que o estoque de nutrientes estaria sendo realocado para manter o alto nível de resistência a piretróides em detrimento da manutenção dos processos fisiológicos básicos nessa população (Araújo *et al.*, 2008).

A população resistente sem custo adaptativo obteve uma maior atividade de α -amilase em relação às outras duas populações. Isso sugere uma maior eficiência na obtenção de energia dos açúcares, possibilitando uma maior estocagem de reservas e maior quantidade de energia imediata para manter os processos fisiológicos básicos bem como os mecanismos detoxificativos. A intensa seleção promovida pela abusiva aplicação de inseticidas deve ter favorecido a seleção de genes modificadores cuja expressão estaria mitigando o custo nessa população. A mitigação do custo associado à resistência pode estar minimizando a necessidade de alta mobilização de energia em favor do armazenamento devido a maior eficiência na digestão do amido (Araújo *et al.*, 2008).

2.2. Família α -amilase

Comparações entre as seqüências de aminoácidos das glicosídeo-hidrolases e transglicosilases permitiram a construção de um esquema de classificação que se baseia na estrutura das enzimas, não levando em consideração as especificidades. De acordo com o esquema, essas enzimas foram agrupadas em mais de 80 famílias. Os membros de uma família devem compartilhar uma estrutura tridimensional comum e um mesmo mecanismo de ação, tendo de algumas a muitas similaridades na seqüência de aminoácidos (Henrissat, 1991; Henrissat *et al.*, 1996).

As famílias 13, 70 e 77 reúnem enzimas correlacionadas funcionalmente e estruturalmente que catalisam a hidrólise ou a transglicosilação de glicanos

α -ligados, gerando produtos com essa mesma configuração anomérica. A α -amilase, assim como a grande maioria das enzimas que fazem parte dessas famílias, atua sobre o amido e representa o membro da família 13 mais bem estudado. Por isso, o grupo formado pelas famílias 13, 70 e 77 é frequentemente reconhecido como Família α -amilase, apesar de incluir enzimas com diversas especificidades (Macgregor *et al.*, 2003).

Em alguns casos, as especificidades das diferentes enzimas da família α -amilase se sobrepõem e isso, juntamente com as similaridades na seqüência de aminoácidos, tem causado confusões na identificação de algumas delas. Hehre & Genghof (1971), por exemplo, relataram a capacidade de α -amilases catalisarem fracamente a transglicosilação α -(1 \rightarrow 4) em adição a sua função principal. Também há relatos de α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* catalisando a hidrólise de ligações α -(1 \rightarrow 6) (Sakano *et al.*, 1983) e de pullulanases de termófilos hidrolisar, não somente ligações α -(1 \rightarrow 6) mas também ligações α -(1 \rightarrow 4) (Mathupala *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994). Esses fatos evidenciam que a relação entre enzima e sua reação substrato-específica não é totalmente fixa.

As enzimas que fazem parte da família α -amilase são multidomínios proteicos que compartilham um domínio catalítico comum formado por um $(\beta/\alpha)_8$ -barril, ou seja, um domínio composto por 8 folhas- β envolvidas por 8 α -hélices, conhecido como domínio A (Figura 1).

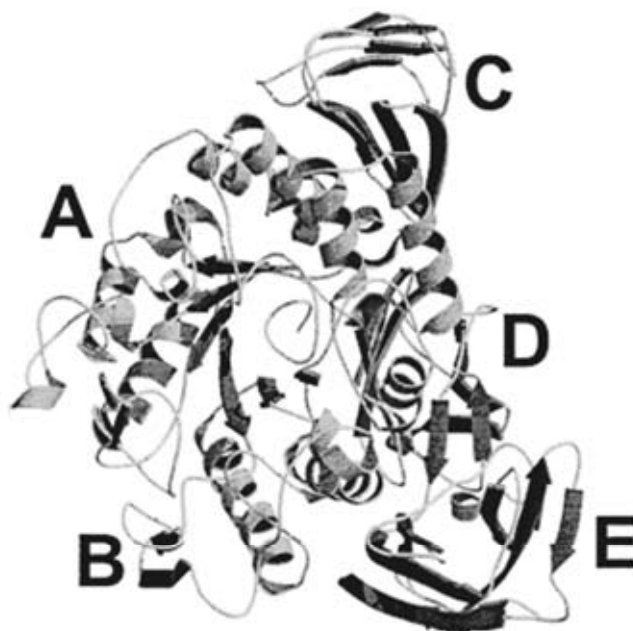


Fig. 1. Um modelo em fita ilustrando os domínios individuais em ciclodextrina glicano-transferase (CGTase). (Lawson *et al.*, 1994).

Geralmente, as “alças” que unem as folhas- β às α -hélices adjacentes abrigam os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima. Similaridades na seqüência de aminoácidos têm levado a predição de que muitas enzimas pertencentes a essa família possuem um mesmo domínio catalítico (Jespersen *et al.*, 1991; Janecek, 1997; Janecek *et al.*, 1997), que também tem sido evidenciado por cristalografia de raio-X (Matsuura *et al.*, 1984; Qian *et al.*, 1993; Machius *et al.*, 1995; Katsuya *et al.*, 1998; Strobl *et al.*, 1998; Przylas *et al.*, 2000).

Inserido dentro do domínio A, entre a terceira folha- β e a terceira α -hélice, está o domínio B. Este se caracteriza por ter uma estrutura irregular que varia de uma enzima pra outra. Em α -amilases, o domínio B forma uma cavidade que se dispõe do lado oposto ao $(\beta/\alpha)_8$ -barril do domínio A, onde se encontra inserido um íon cálcio. Esse cátion é de fundamental importância para a manutenção da estrutura e integridade das α -amilases (Violet & Meunier, 1989; Machius *et al.*, 1995; Strobl *et al.*, 1998).

A grande maioria dos membros da família possui também um domínio C localizado logo após $(\beta/\alpha)_8$ -barril catalítico. Este domínio, por se posicionar bem acima das folhas- β , está relacionado com a estabilização do domínio catalítico por proteger os resíduos hidrofóbicos do domínio A da ação de solventes. Dauter *et al.* (1999) também sugeriu a participação do Domínio C na ligação da amilase de *Bacillus stearothermophilus* com seu substrato. No entanto, em algumas amilomaltases esse domínio não foi detectado, o que mostra que nem sempre ele é necessário para a atividade e estabilidade das enzimas (Przylas *et al.*, 2000). Em ciclodextrina glicano-transferase (CGTase) de *Bacillus stearothermophilus*, um domínio D formado exclusivamente por folhas- β foi descrito por Dauter *et al.* (1999). Porém, sua função ainda não foi determinada.

Geralmente em α -amilases, o domínio A se localiza na parte N-terminal da enzima. Porém, vários outros membros da família também possuem um domínio N que precede o domínio catalítico na porção N-terminal da cadeia

polipeptídica. O papel desse domínio ainda não foi totalmente estabelecido, além de não ser idêntico em todas as enzimas. Há suposições de que em isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata*, o domínio N, devido ao seu posicionamento próximo ao domínio A, participe do sítio catalítico da enzima (Katsuya *et al.*, 1998). No entanto, Kamitori *et al.* (1999) observaram que na α -amilase do tipo II de *Thermoactinomyces vulgaris*, o domínio N se localiza muito distante do domínio A para participar da atividade da enzima.

Seis tipos de enzimas pertencentes à família 13 podem possuir um domínio adicional cuja função é se ligar ao amido, conhecido como domínio E ou SBD (starch-binding domain). São elas: α -amilase, maltotetrahidrolase, maltopentahidrolase, acarviose, transferase, α -amilase-maltogênica e ciclodextrina-glicanotransferase (CGTase) (Janecek *et al.*, 2003). O domínio E é formado por folhas- β e se localiza na parte C-terminal da cadeia da enzima. A função desse domínio é interagir com a cadeia polipeptídica do substrato para facilitar a reação. O domínio E também já foi observado em algumas β -amilases (família 14) e em glicoamilases (família 15) (Jepersen *et al.*, 1991). A presença do domínio E está, no entanto, condicionada a origem da enzima. Somente alguns microorganismos, dentre fungos e bactérias, possuem enzimas amilolíticas com esse tipo de domínio (Janecek *et al.*, 2003).

Na família α -amilase, o mecanismo de ação e os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise são provavelmente os mesmos em todas as enzimas (Kuriki *et al.*, 1991; Svensson, 1994). A α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Taka amilase A), que foi a primeira α -amilase a ser examinada por cristalografia de raio-X, evidenciou três resíduos de aminoácidos, um ácido glutâmico (Glu 230) e dois ácidos aspárticos (Asp 206 e Asp 297), no centro do sítio ativo da enzima (Matsuura *et al.*, 1984). Estudos mutacionais posteriores comprovaram que os resíduos mencionados são essenciais para a catálise (Janecek, 1997; Svensson, 1994).

O mecanismo enzimático das α -amilases é muito complexo e ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que a reação de hidrólise ocorra por um mecanismo de deslocamento duplo (Figura 2).

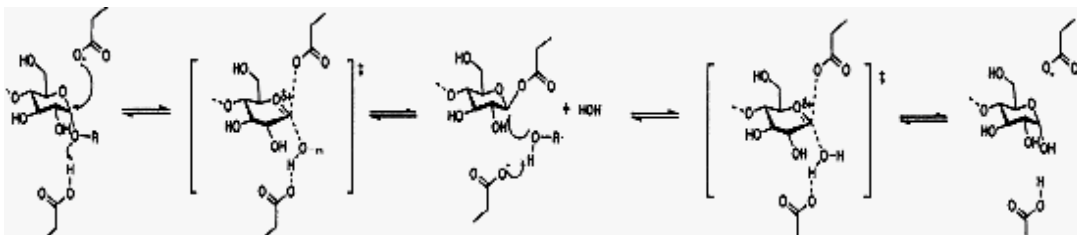


Fig. 2. Mecanismo catalítico de clivagem de uma ligação O-glicosídica (MacGregor *et al.*, 2001).

Durante o primeiro deslocamento, um grupo ácido da enzima protona o oxigênio do centro anomérico, o que leva a cisão da ligação C1-O e a formação de um estado de transição oxocarbônico íon-like. Um grupo ácido nucleofílico da enzima ataca o centro anomérico do açúcar gerando um intermediário β -glicosil, enquanto a parte aglicona do substrato deixa o sítio ativo. Durante o segundo deslocamento, uma molécula de água ativada pelo carboxilato atua como doadora de prótons. Esse segundo estágio da reação se processa via um estado de transição íon-like como antes, e gera produtos com configuração α e a reprotonação do grupo ácido original (Bzozowski & Davies, 1997, MacGregor *et al.*, 2001). Na transglicosilação, o ataque do substrato no segundo deslocamento da reação é realizado por uma hidroxila livre (Uitdehaag *et al.*, 1999).

Há evidências de que o resíduo de ácido glutâmico atue como doador de prótons e que o primeiro dos dois ácidos aspárticos, que fazem parte do sítio ativo, atue como o nucleófilo. O papel do segundo ácido aspártico ainda não foi bem definido, mas acredita-se que ele esteja envolvido na estabilização do estado de transição e também com a manutenção do ácido glutâmico no estado correto de protonação para a atividade (Bzozowski & Davies, 1997; Uitdehaag *et al.*, 1999).

O sítio ativo de uma enzima pertencente à família α -amilase é formado por certo número de subsítios onde, em cada um deles, ocorre interação com um resíduo monossacarídico (Feese *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2003), como é ilustrado na Figura 3.

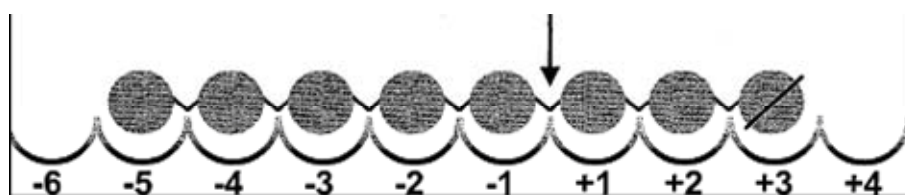


Fig. 3. Arranjo esquemático dos subsítios presentes no sítio catalítico da α -amilase. Resíduos monossacarídios ocupam os subsítios -5 até +3. A clivagem ocorre entre os subsítios -1 e +1, como indicado pela seta. O grupo não-redutor do açúcar está ligado ao subsítio +3 (MacGregor *et al.*, 2001).

Esses subsítios são formados por resíduos de aminoácidos constituintes das “alças” que conectam a parte C-terminal das folhas- β com a parte N-terminal das α -hélices do domínio catalítico. Feese *et al.* (2000) relataram que, no caso da malto-oligosiltealose e da trealohidrolase, um α - β loop (junção de uma hélice com a folha- β adjacente no barril) é caracteristicamente longo, o que deve influir na especificidade do sítio ativo. Como a arquitetura dos α - β loops varia de uma enzima pra outra, o número e a natureza dos subsítios também são variáveis sendo particular para cada enzima (MacGregor *et al.*, 2003).

As várias enzimas que fazem parte da família α -amilase atuam sobre diversos substratos e a única característica em comum que esses substratos devem compartilhar é possuir, em sua estrutura, um resíduo de glicose α -ligado para interagir com o subsítio -1 do sítio catalítico, já que a clivagem ocorre entre os subsítios -1 e +1 (Figura 3). Assim, espera-se encontrar sempre similaridades entre os resíduos que compõem esses subsítios nas enzimas da família α -amilase (Janecek, 1997; MacGregor *et al.*, 2003).

Em Taka-amilase A, Janecek (1997) relatou que o doador de prótons da reação (Glu 230), o nucleófilo catalítico (Asp 206), o segundo ácido aspártico conservado (Asp 297) e dois resíduos de histidina (His 122 e His 296) são importantes constituintes do subsítio -1. Esses cinco resíduos ocorrem próximos às terminações das folhas- β 3, 4, 5 e 7 do β/α -barril e são encontrados fazendo parte de 4 seqüências curtas que são reconhecidas como regiões conservadas nas enzimas da família. As conservações nessas seqüências são relacionadas com a manutenção da estrutura, enquanto que

variações dentro desses segmentos são responsáveis pela especificidade de cada enzima (Takata *et al.*, 1992; Janecek, 1997).

As diferentes enzimas dessa família exibem diferentes especificidades. Algumas atuam apenas sobre ligações α -1,4 entre resíduos de glicose, outras atuam somente em ligações α -1,6 e algumas em ambos os tipos de ligações. Algumas podem clivar sacarose e outras podem hidrolisar ou formar ligações inter-glicose na trealose (Nakajima *et al.*, 1986; Janecek, 1997). No entanto, para todas elas, a atividade irá depender da ligação de um resíduo de glicose no subsítio -1, enquanto que a natureza da porção do substrato que se liga nos subsítios +1 e +2 pode variar com a especificidade da enzima, particularmente no que diz respeito ao tipo de ligação que deve ser formada ou quebrada (α -1,4 ou α -1,6). Portanto, espera-se que os resíduos de aminoácidos que compõem os subsítios +1 e +2 de uma enzima variem com sua especificidade (Janecek, 1997; MacGregor *et al.*, 2003).

Geralmente, α -amilases são definidas como enzimas endo-ativas. No entanto, são enzimas que hidrolisam o amido gerando produtos com a configuração α , sendo que, a maioria delas atua preferencialmente nas pontas das cadeias gerando pequenos oligossacarídeos. Assim, a maior parte se comporta como exoamilases e não como endoamilases (Macgregor *et al.*, 2003).

Algumas passaram a ser identificadas na Enzyme Commission por números distintos daquele que identifica a α -amilase endo-ativa (EC 3.2.1.1). São elas: amilase maltogênica (3.2.1.133), maltotriohidrolase (3.2.1.116), maltotetrahidrolase (3.2.1.60) e maltohexahidrolase (3.2.1.98), que produzem α -maltose, maltotriose, maltotetraose e maltohexose, respectivamente. Essas enzimas não podem ser diferenciadas das α -amilases endo-ativas tomando por base os resíduos de aminoácidos presentes nas regiões de seqüências conservadas (Yoshioka *et al.*, 1997). Ou seja, nas enzimas da família 13 não é possível prever quais são os resíduos nos membros exo-ativos responsáveis pela exo-atividade.

A verdadeira α -amilase atua somente em ligações α -1,4-glicosídicas, catalisando a hidrólise do amido ou a transglicosilação com pequenos oligossacarídeos que são substratos “pobres” para as demais enzimas. Enquanto exo- α -amilases produzem um único oligossacarídeo por atuar na

ponta não redutora de um polissacarídeo, as endo- α -amilases rendem geralmente grandes quantidades de maltose e maltotriose por atuarem preferencialmente dentro da cadeia, próximo da parte final (Macgregor *et al.*, 1992).

As endoamilases, como α -amilases de mamíferos e algumas α -amilases de insetos e bactérias, possuem, geralmente, 5 importantes subsítios no sítio ativo (-3 até +2). Além disso, são enzimas caracterizadas pela tendência de realizar múltiplos ataques, ou seja, catalisar mais de uma ligação glicosídica durante um único encontro com o substrato rendendo grandes quantidades de produto. Assim, a habilidade de se ligar a cadeias polissacarídicas longas com cinco resíduos de glicose internos interagindo diretamente com a enzima é o que caracteriza uma endoamilase (Aghajari *et al.*, 1998; Fujimoto *et al.*, 1998; Strobl *et al.*, 1998; Nahoum *et al.*, 2000).

Em insetos, várias seqüências primárias de α -amilases são conhecidas (Grossi de Sá & Chrispeels, 1997; Strobl *et al.*, 1997; Titarenko & Chrispeels, 2000). Porém, somente a estrutura tridimensional da α -amilase de *Tenebrio molitor* foi determinada por cristalografia de raio-X. Sua estrutura consiste de uma única cadeia polipeptídica de 471 resíduos de aminoácidos associada a um íon cálcio, um cloro e 261 moléculas de água (Strobl. *et al.*, 1998).

A enzima assume uma conformação em que se pode identificar a presença de três domínios distintos (A, B e C). O domínio A é a maior unidade estrutural onde está localizado o sítio catalítico da enzima e os resíduos que interagem com o substrato. Os domínios B e C são unidades essenciais para a atividade, estabilidade e o dobramento correto da enzima (Strobl. *et al.*, 1998).

2.3. Inibidores de α -amilases

Em geral, plantas possuem um determinado grau de resistência contra o ataque de insetos, o que é refletido pelo limitado número de insetos capazes de atacá-las. A resistência nas plantas é representada por um conjunto de mecanismos de defesa desenvolvidos durante a evolução (Schuler, 1998). Recentemente, muitos compostos químicos pertencentes ao metabolismo

secundário têm sido associados à defesa, tendo sua síntese estimulada em resposta ao ataque de uma praga ou patógeno (Rausher, 2001).

A ação do sistema de defesa das plantas tem o potencial para diminuir o desempenho e/ou preferência dos predadores sobre elas, pois atuam provocando uma diminuição na qualidade da fonte alimentar para os herbívoros, o que reflete numa queda do número de insetos pertencentes a uma população local. Porém, essas defesas são incompletas, visto que alguns insetos são capazes de se alimentar de sementes e dos diferentes tecidos vegetais, apesar da presença dos compostos de defesa (Agrawal *et al.*, 1999, Rausher, 2001).

Assim como plantas desenvolvem defesas, seus agressores desenvolvem meios para driblar esses mecanismos, o quê caracteriza o fenômeno da coevolução parasita-hospedeiro descrito por Erlich & Raven (1964). Dentre os meios desenvolvidos pelas pragas para acompanhar a evolução dos mecanismos de defesa das plantas, estão a destoxificação ou excreção dos metabólitos ingeridos, variações comportamentais e morfológicas bem como adaptação do inseto a novas estratégias de vida (Rausher, 2001).

Os componentes de defesa produzidos pelas plantas incluem alcalóides, taninos, terpenos e algumas proteínas. As proteínas são representadas por quitinases, lectinas, arcelinas, vicilinas, sisteminas e enzimas inibidoras de hidrolases (Ryan, 1990; Sales *et al.*, 2000). Esses inibidores atuam inibindo as proteases e as α -amilases do sistema digestivo dos insetos. Vários tipos de inibidores de α -amilases e proteases presentes nas plantas atuam como mecanismo de defesa contra insetos herbívoros (Frels & Rupnow, 1984; Chen *et al.*, 1992; García-Casado *et al.*, 1994; Rekha *et al.*, 2004).

Existem duas classes de inibidores de α -amilases: os proteináceos e os não-proteináceos. A classe dos inibidores não-proteináceos contém diversos tipos de compostos orgânicos como acarbose, isoacarbose, acarviosina-glicose, ácido hibisco purificado de *Hibiscus sabdariffa* e ciclodextrinas. A atividade inibitória desses componentes é causada em parte por sua estrutura cíclica semelhante aos substratos das α -amilases podendo, então, ligar-se ao sítio catalítico da enzima (Kim *et al.*, 1999; Hansawasdi *et al.*, 2000).

A acarbose é um tetrassacarídeo particular derivado da trestatina (composto originalmente isolado da espécie *Streptomyces*) que funciona como

um potente inibidor reversível de α -amilases (Brzozowski & Davies, 1997). Sua estrutura é formada por um pseudo-dissacarídeo não-redutor, formado por uma unidade de valinamina ligada a um 4-amino-4,6-dideóxi- α -D-glicose, o qual é ligado a uma molécula de maltose (Figura 4).

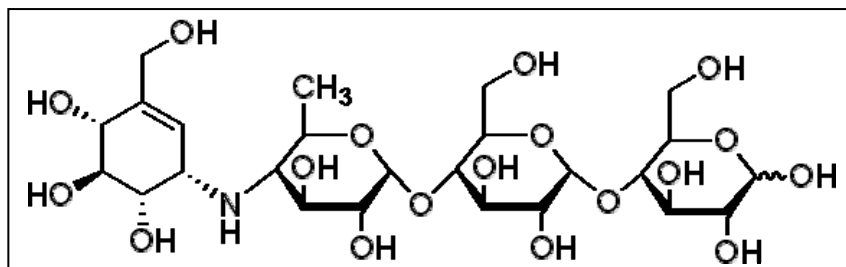


Fig.4. Estrutura molecular do inibidor acarbose (Brzozowski & Davies, 1997).

O alto poder de inibição conferido pela acarbose é atribuído a ligação da valinamina que tem uma conformação que mimetiza a distorção do substrato no estado de transição da reação. A ligação glicosídica adjacente é N-ligada, o que previne a hidrólise enzimática. Em todos os estudos, a acarbose é encontrada ligada ao estado de transição mimetizando o anel glicosídico no subsítio -1 do sítio ativo da enzima (Brzozowski & Davies, 1997).

Recentemente, vários estudos cinéticos têm sido realizados para elucidar o tipo de inibição causada pela acarbose. Para isso, substratos de tamanhos variados foram usados, tais como: amilose, maltodextrina e maltopentose. (Brzozowski & Davies, 1997; Al Kazaz *et al.*, 1998, Ferey-Roux *et al.*, 1998; Oudjeriouat *et al.*, 2003). Trabalhos utilizando a α -amilase pancreática suína (PPA) e a amilase pancreática humana (HPA) evidenciaram que a inibição provocada por acarbose é do tipo não-competitiva mista envolvendo uma ou duas moléculas do inibidor, se o substrato for maltopentose ou amilose, respectivamente. Quando amilose é utilizada como substrato, duas moléculas de inibidor se ligam tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato. Na reação, a molécula de amilose se liga ao sítio ativo da enzima e a molécula de acarbose irá se ligar a um sítio de ligação de carboidratos (Al Kazaz *et al.*, 1998; Koukiekolo *et al.*, 1999).

Em plantas, inibidores proteínáceos podem ser encontrados em cereais como trigo (Buonocore *et al.*, 1980; Feng *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 2000), centeio (García-Casado *et al.*, 1994), cevada (Abe *et al.*, 1993), arroz (Feng *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1998) e milho (Blanco-Labra *et al.*, 1995), mas também em leguminosas como o feijão (Frels & Rupnow, 1984; Kasahara *et al.*, 1996).

Em geral, inibidores de α -amilases presentes nos cereais conferem proteção contra o ataque de insetos. Porém, alguns insetos são capazes de detoxificar esses compostos ou aumentar a atividade de α -amilase, como foi relatado em *Tribolium confusum* contra inibidores de α -amilase presentes no trigo (Warchalewski *et al.*, 2001).

Os inibidores proteínáceos do trigo possuem baixo peso molecular e atuam como um inibidor reversível de α -amilases (Buonocore *et al.*, 1980). α -amilases de *Sitophilus* spp. são particularmente sensíveis a inibidores presentes nos grãos de trigo (Baker, 1988; Baker *et al.*, 1991). Os mecanismos envolvidos na inibição provocada por esses inibidores em *Sitophilus* spp. não foram totalmente esclarecidos. Baker (1988) indicou que um dos prováveis fatores que influenciam na atividade total de α -amilase em *Sitophilus* spp. seria a inativação das amilases já secretadas por inibidores presentes naturalmente na composição dos grãos.

Cinco-Moroyoqui *et al.* (2006) reportaram que a alta concentração de inibidores em certas variedades de trigo limitou significativamente a utilização do amido em *Rhyzopertha dominica*, levando a uma maior biossíntese de α -amilases para compensar o efeito inibitório. Assim, a ingestão dos inibidores pode inativar as enzimas já secretadas ou estimular a biossíntese de α -amilases ou, de alguma forma, modular a atividade catalítica prejudicando os processos digestivos do inseto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Os objetivos gerais desse trabalho foram purificar e caracterizar α -amilases de duas populações resistentes e de uma população susceptível a inseticidas de *S. zeamais*. Dentre as populações resistentes utilizadas, uma apresenta um custo adaptativo associado à expressão da resistência e a outra não.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade de α -amilases no extrato obtido a partir de insetos adultos das três populações de *S. zeamais*.
- Obter α -amilases parcialmente purificadas utilizando precipitação com glicogênio e cromatografia de troca iônica.
- Determinar o grau de pureza da enzima por eletroforese.
- Determinar o efeito do pH, da temperatura, de diferentes concentrações de NaCl e de inibidores na atividade da enzima.
- Determinar os parâmetros cinéticos das α -amilases parcialmente purificadas obtidas das três populações de *S. zeamais*.
- Determinar o grau de glicosilação das α -amilases purificadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e Peptídios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária

(BIOAGRO) e no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

4.1. Reagentes utilizados

Da Sigma Chemical Company (EUA) foram obtidos os reagentes: Coomassie Brilliant Blue G, albumina sérica bovina (BSA), acetato de sódio, carbonato de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), fosfato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, ácido cítrico, β -mercaptoetanol, etilenodiaminotetracético (EDTA), Tris (hidroximetil) aminometano, glicogênio, inibidor acarbose, inibidor de *Triticum aestivum*, amido e marcadores moleculares.

O Kit para determinação de atividade de amilase foi obtido da BIOCLIN, QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

A resina cromatográfica DEAE-Sephacel foi obtida da Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden.

Da Merk S. A. Indústrias Químicas foram obtidos os seguintes reagentes: glicose, tartarato de sódio e potássio e cloreto de potássio.

4.2. Populações de *S. zeamais*

Três populações de *S. zeamais* foram utilizadas no presente trabalho. A população padrão de susceptibilidade é proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo – CNPMS), localizado no município de Sete Lagoas/MG. Esta população é considerada como padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides e vem sendo mantida em condições de laboratório por aproximadamente vinte anos (Guedes *et al.* 1994, 1995, Ribeiro *et al.* 2003). As outras duas populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas foi coletada em moinho de grãos no município de Juiz de Fora/MG, no início de 1999 e foi estabelecida em laboratório a partir de 500 indivíduos. Esta população apresenta um desempenho inferior em um ambiente sem inseticida (Fragoso *et al.*, 2003; 2005). A segunda população resistente foi coletada originalmente em unidades armazenadoras de sementes

de milho em Jacarezinho/PR no final da década de 80. esta população possui alta resistência a DDT e piretróides, porém não apresenta desempenho inferior na ausência do inseticida (Fragoso *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007).

As três populações foram criadas em potes contendo grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (LD 12:12h).

4.3. Determinação da atividade de amilase

Os ensaios para determinação da atividade de amilase foram feitos em triplicata utilizando kit da BIOCLIN (referência: K003, QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), contendo substrato e reagente de cor. A reação é baseada na cinética de tempo fixo (Caraway, 1955). Os ensaios foram realizados incubando 5 μL de amostra enzimática com 250 μL de substrato de amido ($0,4\text{g.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,0) a 37°C . Após 7 minutos e meio, a reação foi paralisada pela adição do reagente de cor (solução de iodo) e diluída em 2000 μL de água destilada. A leitura foi feita em comprimento de onda de 620 nm. Uma unidade de enzima é a quantidade que hidrolisa 10 mg de amido em 30 minutos à 37°C . A atividade foi expressa em Unidades de Amilase.dL⁻¹.

4.4. Determinação da concentração de proteína

Para determinar o teor protéico das amostras enzimáticas foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). Para os ensaios foram utilizados 100 μL da amostra enzimática (diluída 10x), 700 μL de água destilada e 200 μL do reagente de Bradford 5X. Após 15 min de reação foi feita a leitura a 595 nm e os valores de absorvância foram convertidos em concentração de proteína utilizando uma curva padrão feita com 0 a 20 μg de BSA (albumina sérica bovina). O teor de proteína foi expresso em mg de proteína por mL de amostra enzimática.

O reagente de Bradford 5X, foi preparado misturando-se 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido

fosfórico 85% (v/v). A mistura foi deixada sob agitação e, após a solubilização, o volume foi completado para 200 mL e a solução filtrada em papel Whatman nº1. O método baseia-se no desenvolvimento da cor, em função da ligação da proteína com o pigmento Comassie Brilliant Blue G-250.

4.5. Purificação das α -amilases de *S. zeamais*

Para obtenção do extrato bruto (EB), foram pesados 10,5 gramas de insetos adultos não-sexados de cada população. Os insetos foram imobilizados com nitrogênio líquido e macerados. Em seguida, adicionou-se tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0, contendo 20 mM de NaCl e 0,1 mM de CaCl_2 na proporção de 3 mL para cada 1 g de inseto, conforme descrito por Baker & Woo (1985). O extrato foi filtrado em gaze e centrifugado a 5300 g por 40 minutos. O sobrenadante foi então recentrifugado para facilitar a eliminação da porção lipídica.

O extrato bruto obtido foi submetido a diálise em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0, contendo 20 mM de NaCl e 0,1 mM de CaCl_2 durante 20 horas a 4 °C. Após diálise, a amostra foi centrifugada novamente a 5300 g por 30 minutos. O sobrenadante (extrato solúvel) foi submetido a uma precipitação com glicogênio conforme procedimento de Loyter & Schramm (1962). *In vitro*, a enzima hidrolisa as ligações α -1,4 do glicogênio, mas não atua sobre as ligações α -1,6 responsáveis pela estrutura altamente ramificada da molécula. Além disso, as ramificações prejudicam a atividade da α -amilase por impedir seu acesso às ligações α -1,4 presentes. Assim, a precipitação é fundamentada na alta especificidade de ligação e na reduzida atividade catalítica da enzima sobre o glicogênio a 4 °C. A enzima se liga ao substrato formando um complexo que se precipita em solução 40% etanol. Dessa forma, grande parte das proteínas presentes na solução, mas que não possuem afinidade pelo glicogênio, é eliminada no processo.

Inicialmente, foi preparada uma solução contendo 40% de etanol com o extrato solúvel. Sob agitação, para cada 1000 μL dessa amostra, adicionou-se 180 μL de tampão acetato de sódio, 200 μL de solução 2% de glicogênio e 240 μL de etanol 95% para que se formasse um complexo glicogênio-amilase que é

insolúvel em solução 40% etanol a 4 °C. Após centrifugação (5000 g por 6 minutos), o precipitado contendo o complexo glicogênio-amilase foi ressuspenso em 700 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo 0,1 mM de CaCl₂ e incubado a 37 °C por 1 hora para remover o glicogênio por hidrólise.

A amostra proveniente da precipitação foi então submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (10 x 2 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo 0,1 mM de CaCl₂. As proteínas da amostra que não se ligaram a resina foram eluídas com 30 mL do mesmo tampão, seguidas por um gradiente salino formado por 40 mL do tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo 0,1 mM de CaCl₂ e 40 mL do mesmo tampão acrescido de 0,4 M de NaCl. A cromatografia foi realizada a 4 °C, com fluxo de 0,5 mL.minuto⁻¹. Frações de 1,5 mL foram coletadas e monitoradas com leitura de Abs a 280 nm. Frações próximas que apresentaram atividade de α-amilase foram reunidas.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo SDS e β-mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 mol.L⁻¹, pH 8,8 para o gel separador, e tampão Tris/HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 6,8 para o gel empilhador, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, a 220 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Co. As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β-mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), gliceraldeído-3P-desidrogenase (36 kDa),

anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa).

As proteínas presentes nos géis foram reveladas, por 2 horas, com a seguinte solução corante: 0,5 g de Coomassie Brilliant Blue R 0,025%, 225 mL de metanol, 50 mL de ácido acético glacial e 225 mL de água destilada. Em seguida, o gel foi deixado em solução descolorante (60 mL de metanol, 145 mL de ácido acético e 10 mL de água destilada) por 24 horas.

4.7. Caracterização bioquímica e cinética das α -amilases das populações de *S. zeamais*

4.7.1. Efeito do pH sobre a atividade da enzima

O efeito do pH sobre a atividade das α -amilases foi verificado utilizando soluções de amido $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ em tampão Mcllvaine (Mcllvaine, 1921) nos valores de: 3,0; 3,6; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6; 7,0 e 7,6. Utilizou-se também soluções $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de amido em tampão Tris-HCl 50 mM nos valores de pH 8,0 e 8,5. A amostra enzimática (5 μL) foi incubada com 250 μL das soluções de amido por 7 minutos e meio a 37°C . A reação foi paralisada pela adição de 250 μL do reagente de cor e diluída com 2000 μL de água destilada.

4.7.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima

O efeito da temperatura sobre a atividade das α -amilases foi determinada realizando ensaios utilizando o kit de amilase nas mesmas condições já descritas. O ensaio enzimático foi realizado nas temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 $^\circ\text{C}$.

4.7.3. Efeito do íon cloreto sobre a atividade da enzima

O efeito de concentrações crescentes do íon Cl^- na atividade da enzima foi verificado. Para isso 5 μL da amostra enzimática foi incubada com 250 μL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo as seguintes concentrações de

NaCl: 0,0; 0,25; 5,0; 10; 15; 20; 25 e 30 mM. Após 20 minutos de reação adicionou-se 250 μL da solução de amido $0,4\text{g.L}^{-1}$ com concentrações de NaCl correspondentes. Após 7 minutos e meio, a reação foi paralisada pela adição de 250 μL do reagente de cor e diluída com 1750 μL de água destilada. Leitura feita a 620 nm.

4.7.4. Efeito de inibidores sobre a atividade da enzima

4.7.4.1. Inibidor acarbose

O ensaio de inibição da atividade de amilase foi realizado incubando 5 μL da amostra enzimática com 250 μL da solução de amido do kit contendo as seguintes concentrações crescentes do inibidor: 0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 mM. Após 7 minutos e meio, a reação foi paralisada pela adição de 250 μL do reagente de cor e diluída com 2000 μL de água destilada.

4.7.4.2. Inibidor *Triticum aestivum*

A determinação da atividade de amilase na presença desse inibidor foi realizada da mesma forma como descrita acima. Entretanto, as concentrações do inibidor utilizadas foram: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5 μg de proteína mL^{-1} .

4.7.5. Determinação do grau de glicosilação da enzima

Para verificar se as α -amilases purificadas das populações de *S. zeamais* possuíam polissacarídeos associados a sua estrutura protéica, foi estimado o grau de glicosilação da enzima seguindo procedimento descrito por Dubois *et al.* (1956). No ensaio foram utilizados 400 μL de amostra enzimática, 200 μL de solução fenol 5% e 1000 μL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura de reação foi incubada a 28 °C por 15 minutos. A leitura da amostra foi feita em 490 nm e os valores de absorvância foram convertidos em

concentração de açúcar utilizando uma curva padrão feita com 0 a 70 μg de glicose.

4.7.6. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{\max})

Os valores de K_M e V_{\max} para as α -amilases das três populações de *S. zeamais* foram obtidos pela incubação de 5 μL da amostra enzimática em 250 μL tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo amido nas seguintes concentrações: 0,04; 0,08; 0,12; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 g.L^{-1} . Após 7 minutos e meio a reação foi paralisada pela adição de 250 μL do reagente de cor (iodo). Os ensaios foram diluídos pela adição de 2000 μL de água destilada para proceder à leitura de absorbância (620nm). Os valores de absorbância foram convertidos em UA.dL^{-1} e os dados foram analisados utilizando-se o programa Sigma Plot (SPSS, 2000).

4.7.7. Análise Estatística

Os dados da concentração dos inibidores que promovem 50% de inibição (CI 50) foram sujeitos à análise de PROBIT utilizando o procedimento PROCPROBIT do SAS (SAS Institute, 2001). Os dados dos parâmetros cinéticos (K_M e V_{\max}) foram submetidos à análise de variância de variância (ANOVA), seguido por teste de média (Fisher).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação das α -amilases das populações de *S. zeamais*

No presente estudo, as α -amilases de três populações de *S. zeamais* que diferem em relação à susceptibilidade a inseticidas piretróides foram

purificadas e caracterizadas. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação pode ser observado na Tabela 1.

Tab. 1: Etapas da purificação de α -amilases de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente sem custo e resistente com custo) de *S. zeamais*.

Fração	População	Proteína (mg/dL)	Atividade (UA/dL)	Atividade específica (UA/dL/mg ptn)	Volume Final (dL)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	Susceptível	0,0761	470	6176	0,230	1,00	100
	Resistente sem custo	0,0822	477	5803	0,240	1,00	100
	Resistente com custo	0,0694	416	5994	0,220	1,00	100
Extrato solúvel	Susceptível	0,0496	473	9536	0,190	1,54	83
	Resistente sem custo	0,0468	467	9979	0,210	1,72	86
	Resistente com custo	0,0431	457	10603	0,200	1,77	100
Precipitação Glicogênio	Susceptível	0,0031	348	112258	0,180	18,18	58
	Resistente sem custo	0,0044	367	83409	0,190	14,37	61
	Resistente com custo	0,0040	274	68500	0,140	11,43	42
DEAE-Sephacel	Susceptível	0,0011	509	462727	0,045	74,92	21
	Resistente sem custo	0,0014	543	387857	0,045	66,85	21
	Resistente com custo	0,0005	383	766000	0,045	127,79	19

Durante todas as etapas, a atividade da enzima foi determinada utilizando amido como substrato, conforme descrito no item 4.3 e, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, como descrito no item 4.4.

Pela análise da tabela, podemos observar que houve diferenças na atividade e na atividade específica das α -amilases purificadas das três populações de *S. zeamais*.

A precipitação com glicogênio feita no extrato solúvel obtido dos insetos pertencentes a população susceptível à piretróides resultou num fator de purificação de 18,18 vezes, um rendimento de 58% com uma atividade de 348 UA.dL⁻¹ e atividade específica de 112258 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹. O fator de purificação obtido da precipitação realizada no extrato solúvel da população resistente sem custo foi de 14,37 vezes, com um rendimento de 61%, atividade de 367 UA.dL⁻¹ e uma atividade específica de 83409 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹. Na população resistente com custo adaptativo, a precipitação com glicogênio gerou um fator de purificação de 11,43 vezes, com um rendimento de 42%, uma atividade de α -amilase de 274 UA.dL⁻¹ e uma atividade específica de 68500 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹ (tabela 1).

Outros trabalhos, que utilizaram a precipitação de glicogênio como uma das etapas do processo de purificação, obtiveram resultados semelhantes aos encontrados para as α -amilases das três populações de *S. zeamais* em relação ao rendimento e fator de purificação. Baker & Woo (1985), ao purificar α -amilases de *S. oryzae*, obtiveram um rendimento de 70% e um fator de purificação de 20,8 vezes. Baker (1991) purificou α -amilases de *Rhizopertha dominica* e encontrou um rendimento de 53% e um fator de purificação de 11 vezes.

Comparações em relação às atividades de α -amilases das populações de *S. zeamais* com outros trabalhos não foram possíveis, uma vez que a definição de uma unidade de enzima varia conforme o método utilizado para se avaliar a atividade. Neste trabalho, uma unidade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa totalmente 10 mg de amido em 30 minutos a 37 °C. Na purificação da α -amilase de *C. chinensis*, uma unidade da enzima foi definida como a quantidade que produz 1 mg de maltose em 10 minutos a 37 °C (Podoler & Applebaum, 1971) e, na purificação de α -amilases de *R. dominica*, uma unidade foi considerada como sendo a quantidade de enzima que produz 1 mg de maltose por minuto a 30 °C (Baker, 1991).

O sobrenadante obtido da precipitação com glicogênio foi submetido à cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel, equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo 0,1 mM de CaCl₂. O perfil de eluição da enzima da população susceptível evidencia um único pico simétrico com atividade de α -amilase (frações 24 a 26) (figura 5). Nessa etapa houve um

acréscimo no fator de purificação de 74,92 vezes em relação ao extrato bruto. O rendimento foi de 21% com uma atividade de 509 UA.dL⁻¹ e uma atividade específica de 462727 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹.

A população resistente sem custo, em seu perfil de eluição, apresentou três picos protéicos com atividade de α -amilase (figura 6), sendo utilizado como fonte da enzima, para os ensaios posteriores, somente as frações responsáveis pelo pico de maior atividade (frações 37 a 39), já que os demais picos apresentaram uma atividade de amilase muito baixa. O rendimento foi igual ao da população susceptível (21%), com um fator de purificação de 66,85 vezes, atividade total de 543 UA.dL⁻¹ e uma atividade específica de 387.857 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹.

O perfil de eluição obtido da amostra enzimática da população resistente com custo é mostrado na figura 7. Podemos observar dois picos protéicos bem separados que apresentaram atividade de α -amilase, sendo que somente as frações responsáveis pelo pico de maior atividade (33 a 35) foram utilizadas como fonte da enzima purificada para realizar os ensaios subseqüentes. O rendimento obtido foi de 19%, com uma atividade de 383 UA.dL⁻¹, uma atividade específica de 766000 UA.dL⁻¹.mg ptn⁻¹ e um fator de purificação de 127,79 vezes.

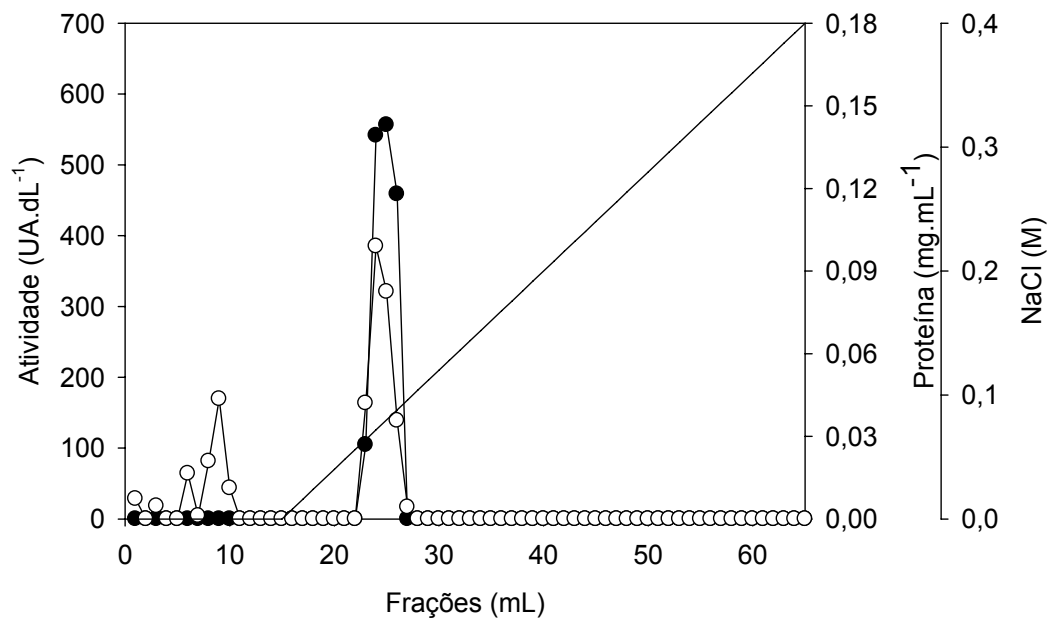


Fig. 5: Perfil cromatográfico de eluição da fração submetida à precipitação com glicogênio contendo atividade de α -amilase da população de *S. zeamais* susceptível a piretróides em resina DEAE-Sephacel. (●) Atividade de amilase, (○) concentração de proteína e (—) gradiente crescente de NaCl (0 a 0,4M).

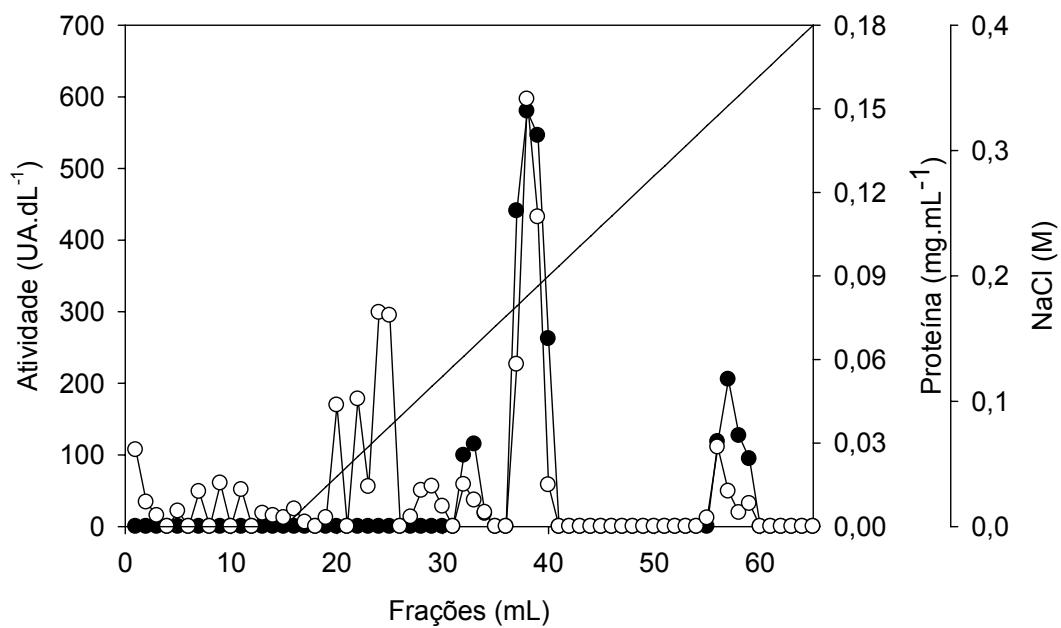


Fig. 6: Perfil cromatográfico de eluição da fração submetida à precipitação com glicogênio contendo atividade de α -amilase da população de *S. zeamais* resistente a piretróides (sem custo) em resina DEAE-Sephacel. (●) Atividade de amilase, (○) concentração de proteína e (-) gradiente crescente de NaCl (0 a 0,4M).

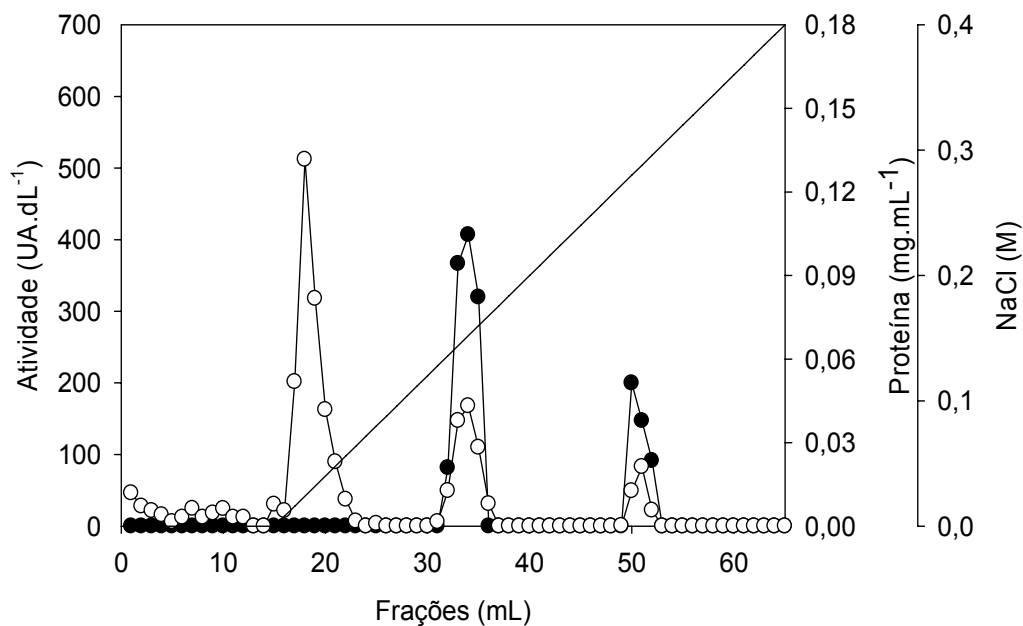


Fig. 7: Perfil cromatográfico de eluição da fração submetida à precipitação com glicogênio contendo atividade de α -amilase da população de *S. zeamais* resistente a piretróides (com custo) em resina DEAE-Sephacel. (●) Atividade de amilase, (○) concentração de proteína e (—) gradiente crescente de NaCl (0 a 0,4M).

A capacidade de um organismo em expressar mais de uma forma de α -amilase é um fato que pode ser facilmente observado na literatura (Baker, 1983; Nagaraju & Abraham, 1995; Yáñez *et al.*, 1998). Essas formas múltiplas da enzima, chamadas de isoenzimas, podem ocorrer na mesma espécie, no mesmo tecido e até na mesma célula. Diferentes isoenzimas são codificadas por diferentes genes e, modificações pós-traducionais em cada uma delas, originam as várias isoformas. (Lenhinger, 2000)

O perfil de eluição das amostras enzimáticas obtidas das duas populações resistentes evidenciou a presença de mais de um pico com atividade de α -amilase. Esse fato sugere que, nessas populações, pode estar ocorrendo a produção de isoformas da enzima que possuem cargas líquidas diferentes e que, por isso, eluíram de forma diferenciada. Baker (1987), por análise de zimogramas de α -amilases, já havia relatado a existência de variações na composição de isoformas de α -amilases entre populações de

Sitophilus spp. provenientes de várias regiões. No entanto, não foi detectada nenhuma correlação aparente entre origem geográfica e padrão de isoformas expressadas nas populações.

Durante o processo de eluição, a obtenção de um único e simétrico pico com atividade de α -amilase não significa necessariamente a presença de uma única isoforma da enzima. Num mesmo pico podem estar presentes mais de uma forma de α -amilase que não puderam ser separadas pelo processo cromatográfico utilizado. Esse fato foi relatado por Baker & Woo (1985) na purificação de duas α -amilases de *S. oryzae* que foram eluídas juntas, já que possuíam valores de pontos isoelétricos muito próximos (3,70 e 3,76). Assim, é possível que haja mais de uma isoforma de α -amilase nos picos protéicos obtidos de cada população. Para comprovar esse fato, seria necessária a realização de uma focalização isoelétrica nas frações recolhidas da coluna que apresentaram atividade.

Nagajaru & Abraham (1995) reportaram a existência de cinco isoformas de α -amilase no extrato bruto de *Antheraea mylitta* pela análise dos padrões de banda formados em eletroforese em gel nativo. Após três passos de purificação, eles obtiveram dois picos com atividade de α -amilase. O pico protéico com maior atividade amilásica foi submetido a uma eletroforese em gel nativo e a uma focalização isoelétrica que evidenciaram a presença de cinco bandas no gel, indicando que aquele pico proteico continha todas as isoformas de α -amilase que foram antes detectadas no extrato bruto.

A presença de diferentes isoenzimas de α -amilases tem sido reportada em outras espécies de insetos como *T. castaneum* (Chen *et al.*, 1992), *R. dominica* (Baker 1991), *A. grandis* (Oliveira-Neto *et al.*, 2003) e *A. obtectus* (Franco *et al.*, 2005).

5.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das α -amilases das populações *S. zeamais*

Para acompanhar a eficiência das técnicas de purificação empregadas, amostras de cada etapa foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sob condições desnaturantes. O perfil de migração das

proteínas presentes em cada etapa da purificação das α -amilases da população resistente sem custo é mostrado na Figura 8.

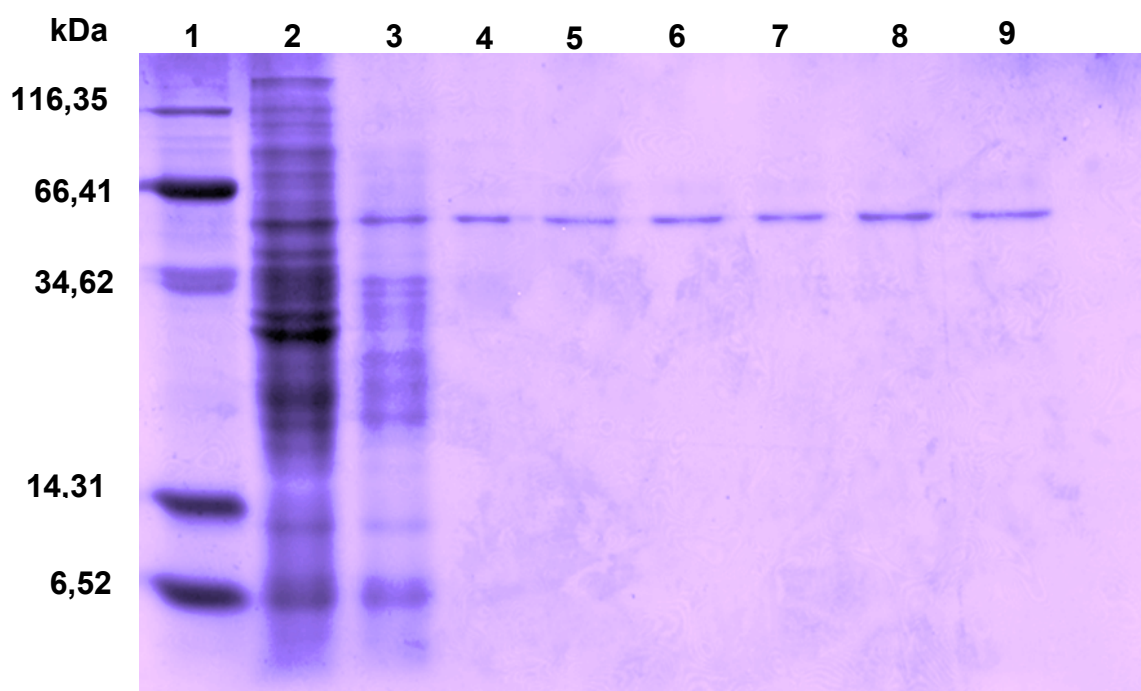


Fig. 8: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%), corada com Coomassie Brilliant Blue, das etapas de purificação da α -amilase da população de *S. zeamais* resistente à piretróides sem custo adaptativo. (1) Marcadores moleculares, (2) extrato bruto, (3) extrato solúvel, (4) precipitação com glicogênio, (5) fração 56 e 57 reunidas, (6) fração 37, (7) fração 38, (8) fração 39 e (9) frações 37,38 e 39 reunidas.

Podemos observar claramente uma única banda protéica na raia relativa à precipitação com glicogênio e nas raias correspondentes às frações recolhidas da coluna que apresentaram atividade de α -amilase. A precipitação com glicogênio representou uma etapa crucial no processo, pois eliminou a maioria das proteínas contaminantes. Pela migração das bandas no gel, ficou evidente também que as frações referentes aos diferentes picos proteicos continham isoformas de α -amilases de mesma massa molecular, mas com cargas diferentes, já que foram eluídas em picos distintos (enzimas nas frações 37, 38 e 39 eluíram no primeiro pico protéico e aquelas presentes nas frações 56 e 57 eluíram no último pico).

Os perfis eletroforéticos obtidos dos passos de purificação das α -amilases não revelaram diferenças, sendo praticamente iguais para as três populações estudadas. O gel da figura 9 representa o perfil eletroforético da população susceptível a piretróides. A α -amilase purificada, presente nas frações 24, 25 e 26 reunidas, migrou no gel de SDS-PAGE como uma única banda, confirmando o alto grau de pureza da proteína e a eficácia do protocolo de purificação utilizado.

Para se calcular o valor das massas moleculares das α -amilases purificadas, uma regressão linear foi calculada correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares dos marcadores utilizados com a distância percorrida no gel SDS-PAGE (dados não mostrados). A partir da equação de regressão obtida, estimou-se uma massa molecular aproximada de 53,7 kDa para as α -amilases das três populações de *S. zeamais*.

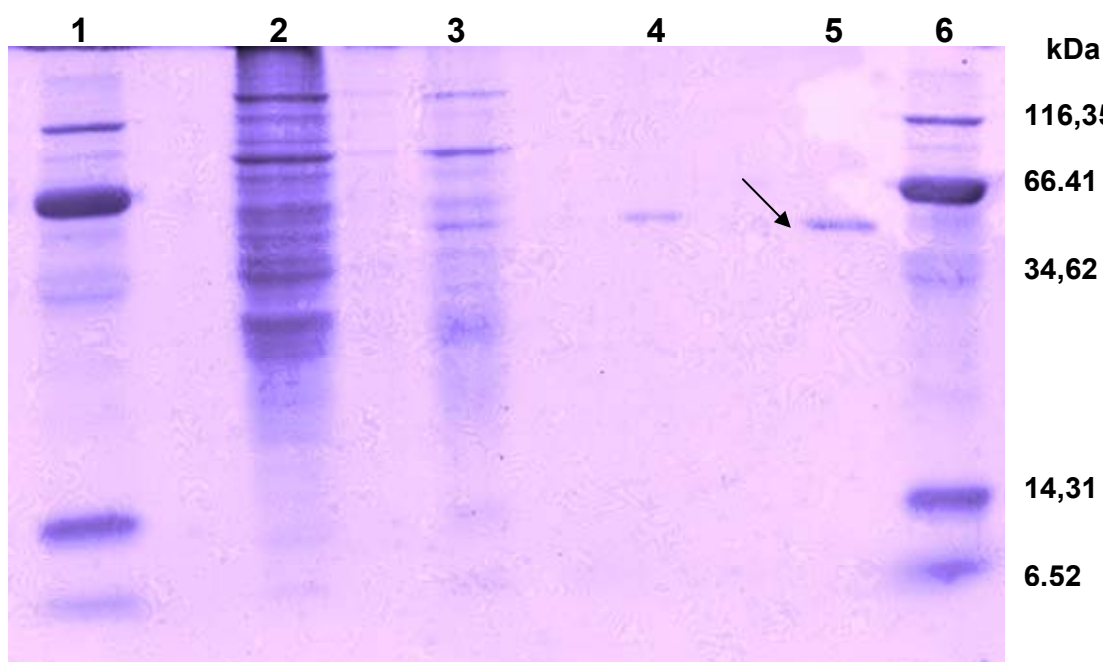


Fig. 9: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%), corada com Coomassie Brilliant Blue, das etapas de purificação da α -amilase da população de *S. zeamais* susceptível a piretróides. (1 e 6) Marcadores moleculares, (2) extrato bruto, (3) extrato solúvel, (4) precipitação com glicogênio, (5) frações 24, 25 e 26 reunidas, e (→) indica a α -amilase purificada com massa molecular aproximada de 53,7 kDa.

O valor da massa molecular encontrado para as α -amilases das populações de *S. zeamais* é consistente com aqueles relatados na literatura. Para α -amilases de insetos, as massas moleculares estimadas estão numa faixa de 45 a 65 kDa (Baker, 1991). A massa molecular para a α -amilase purificada de *S. oryzae* foi estimada em 56 kDa (Baker & Woo, 1985). Para α -amilase de *T. molitor*, obteve-se um valor de 51,3 kDa (Strobl *et al.*, 1998) e as massas moleculares de duas isoformas de α -amilase purificadas de *R. dominica* foram de 55 e 57 kDa (Baker, 1991). No entanto, existem exceções. Em *A. obtectus* uma das isoformas purificadas apresentou uma massa molecular de 35 kDa (Franco *et al.*, 2005) e em *Z. subfasciatus* foram detectadas duas isoformas de α -amilases com massas moleculares de 65 e 81,3 kDa (Silva *et al.*, 1999).

5.3. Caracterização bioquímica e cinética das α -amilases purificadas das populações de *S. zeamais*

5.3.1. Efeito do pH

A atividade das α -amilases purificadas das três populações de *S. zeamais* foram avaliadas numa faixa de pH de 3,0 a 8,6. Uma única curva simétrica foi obtida para cada enzima (figura 10) e todas apresentaram uma atividade de α -amilase maior numa faixa de pH 4,6 a 6,0. As α -amilases das populações susceptível e resistente sem custo apresentaram um pico de maior atividade em pH 5,0. A curva de pH aumentou rapidamente, a partir do pH 3,6, para a enzima da população resistente sem custo e, a partir do pH 4,0, para as α -amilases das outras duas populações de *S. zeamais*. A partir do pH 7,0, a curva de atividade decaiu bruscamente para as três populações analisadas.

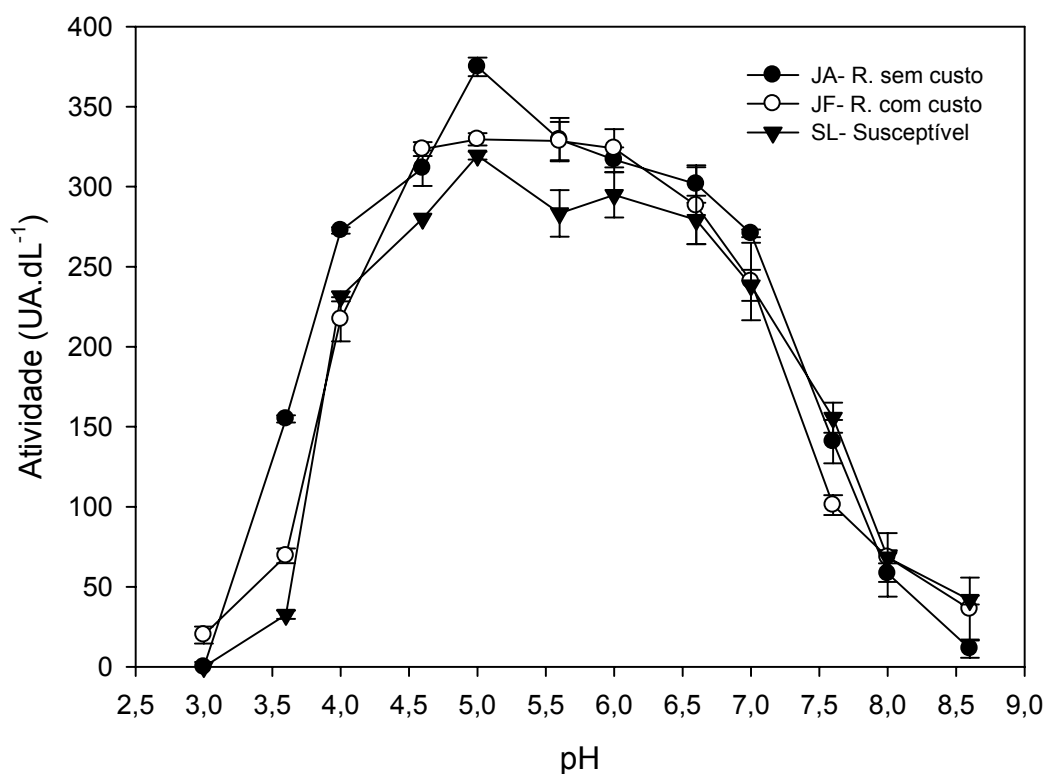


Fig. 10: Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase purificada de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média de 3 repetições.

As α -amilases de insetos apresentam maior atividade numa faixa de pH neutra à levemente ácida (Baker, 1983; Terra et al., 1996). Em vários coleópteros, o pH de maior atividade de α -amilases está numa faixa de 4,0 a 6,0, como relatado em : *C. chinensis* (pH 5.3) (Podoler & Applebaum, 1971), *T. castaneum* (pH 4.6-5.2) (Applebaum & Konijn, 1965) e *T. molitor* (pH 5.8) (Buonocore et al., 1976). O valor de pH de maior atividade para a α -amilase de *S. zeamais* foi de 4,75, segundo Baker (1983), o que é consistente com os valores de pH encontrados para as três populações de *S. zeamais* abordadas.

Em contraste, algumas espécies de insetos mostram uma maior atividade de α -amilase numa faixa de pH alcalina, como ocorre em *B. mori* (pH 9,2) (Abraham et al., 1992) e em *A. mylitta* (pH 9,5) (Nagajaru & Abraham, 1995).

5.3.2. Efeito da temperatura

As enzimas purificadas foram avaliadas na faixa de temperatura de 5 a 60 °C. As α -amilases das três populações se mostraram consideravelmente ativas na faixa de temperatura de 30 a 40 °C. A partir de 40 °C, a atividade decaiu bruscamente nas três populações (figura 11). A faixa de temperatura de maior atividade da α -amilase purificada de *P. truncatus* também foi de 30 a 40 °C (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000) e a α -amilase de *E. integriceps* apresentou uma maior atividade numa faixa de temperatura de 25 a 40 °C (Kazzazi *et al.*, 2005).

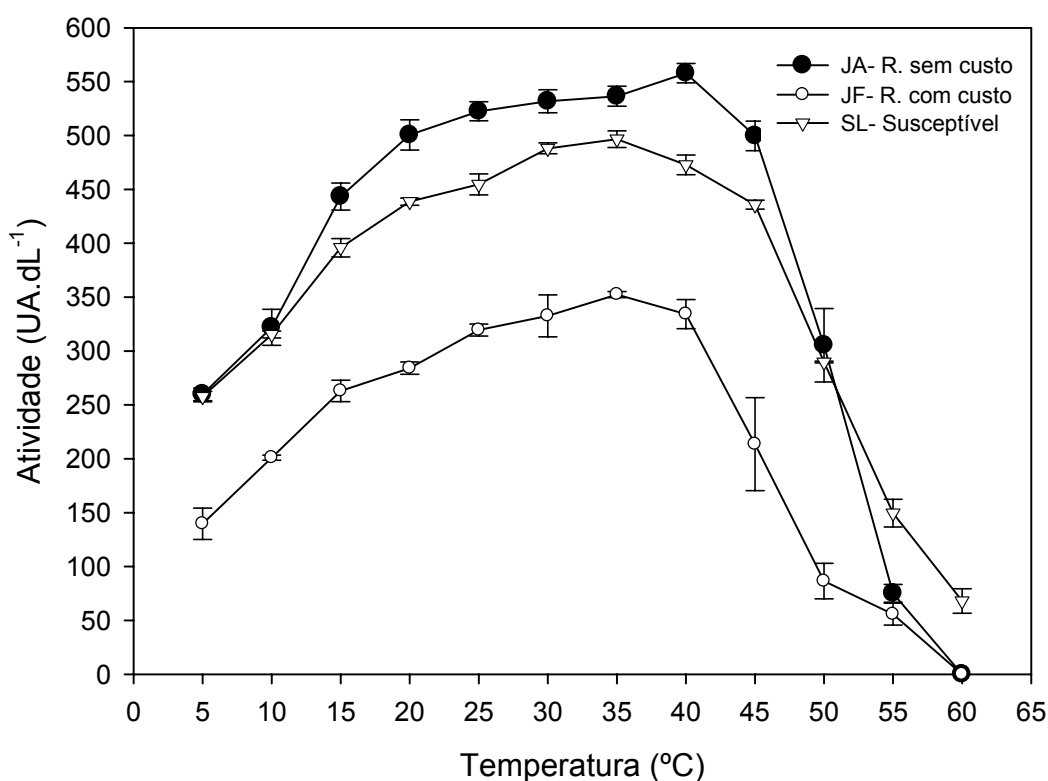


Fig. 11: Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase purificada de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média de 3 repetições.

5.3.3. Efeito do íon cloreto (Cl⁻)

Ativação pelo íon cloreto é uma característica frequentemente observada em muitas α -amilases de mamíferos, bactérias e insetos (Buonocore *et al.*, 1976; Terra *et al.*, 1977; Baker, 1983). O efeito do íon cloreto sobre a atividade das α -amilases purificadas foi, portanto, avaliado. As α -amilases das três populações não mostraram qualquer alteração em suas atividades quando pré-incubadas em diferentes concentrações de NaCl (figura 12). No entanto, Baker (1983) havia reportado que a atividade de α -amilase no extrato preparado com intestinos de larvas de *S. zeamais*, dissecadas em água destilada, foram significativamente ativadas pela pré-incubação com NaCl. Concentrações inferiores a 0,1 mM foram suficientes para ativação da enzima.

Na purificação das α -amilases das três populações de *S. zeamais* foi utilizado um gradiente crescente de NaCl, cuja concentração variou de 0 a 0,4 M. Dessa forma, as frações obtidas da coluna que continham a enzima purificada também possuíam uma concentração do íon Cl⁻ muito superior a necessária para a ativação da enzima. Esse fato justifica a não alteração da atividade das α -amilases quando determinada em diferentes concentrações do íon.

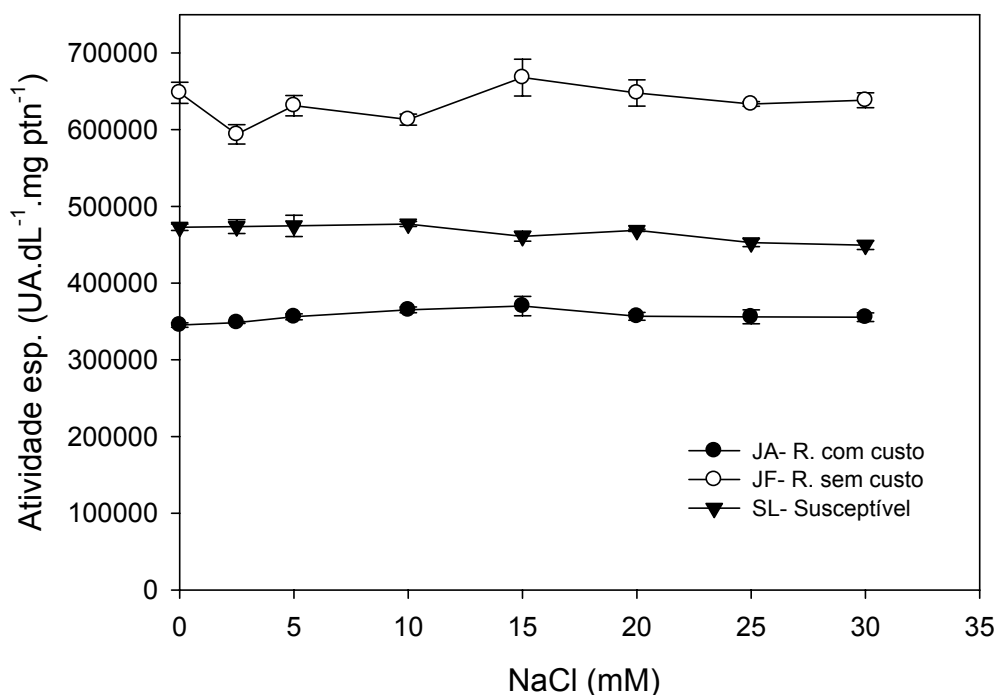


Fig. 12: Efeito do íon Cl^- sobre a atividade específica da α -amilase purificada de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média de 3 repetições.

5.3.4. Efeito de inibidores

A acarbose representa um potente inibidor de α -amilases provenientes das mais diversas fontes (Brzozowski & Davies, 1997; Ferey-Roux *et al.*, 1998; Koukiekolo *et al.*, 1999; Oudjeriouat *et al.*, 2003). Portanto, o efeito de concentrações crescentes de acarbose sobre a atividade das α -amilases purificadas foi avaliado. O inibidor se mostrou efetivo em inibir parcialmente as α -amilases das três populações de *S. zeamais* (figura 13).

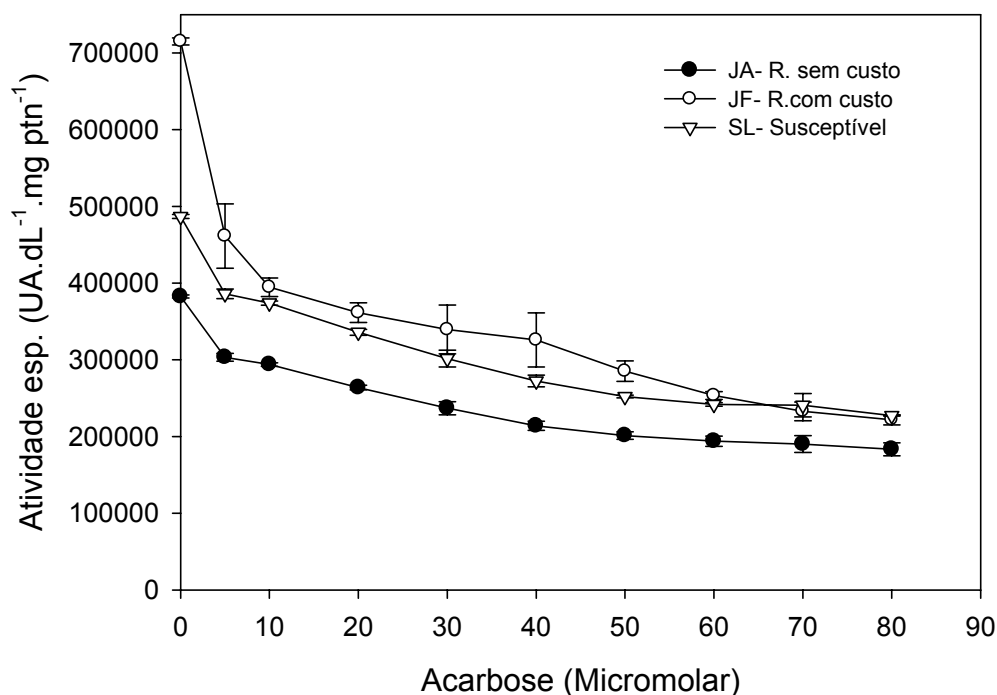


Fig. 13: Efeito do inibidor acarbose na atividade específica da α -amilase purificada de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média de 3 repetições.

A porcentagem de inibição causada pela maior concentração de acarbose também foi calculada. Para isso, considerou-se a atividade da enzima incubada sem inibidor como 100%. Assim, a maior concentração de acarbose usada inibiu aproximadamente 53% da atividade enzimática na população resistente sem custo, 65% na população resistente com custo e inibiu 67% da atividade na população susceptível de *S. zamais*.

O inibidor protéico extraído de *Triticum aestivum* também se mostrou efetivo em inibir parcialmente as α -amilases das três populações de *S. zeamais* (figura 14). A maior concentração do inibidor promoveu, na α -amilase purificada da população resistente sem custo, uma inibição de aproximadamente 38% da atividade. A atividade da enzima da população susceptível foi inibida em 49% e a inibição da α -amilase da população resistente com custo foi de 64%.

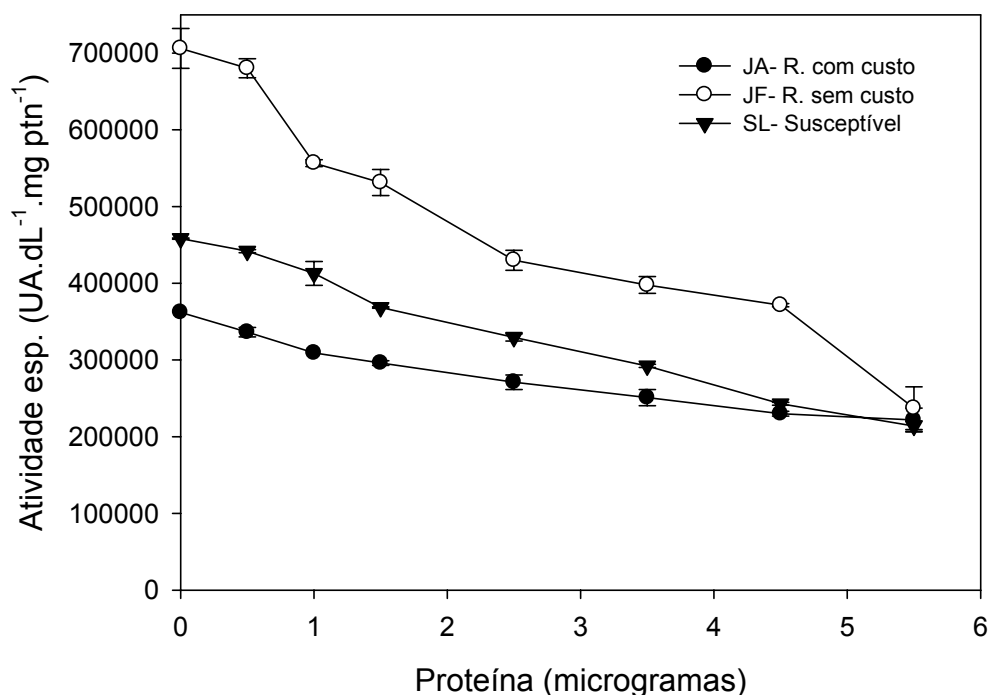


Fig. 14: Efeito do inibidor *Triticum aestivum* na atividade específica da α -amilase purificada de uma população susceptível e de duas populações resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média de 3 repetições.

Valores de CI 50 (concentração do inibidor que inibe 50% da atividade da enzima) para acarbose e *T. aestivum* foram calculados para as α -amilases das três populações. Os resultados mostrados na Tabela 2 evidenciam que houve diferenças significativas nos valores de CI 50 para acarbose e *T. aestivum* entre as enzimas das populações. Os valores de CI 50 foram maiores para a população resistente sem custo indicando que a α -amilase dessa população é menos sensível aos inibidores do que as outras duas. Em contrapartida, a α -amilase da população resistente com custo apresentou um valor de CI 50 para acarbose bem inferior em relação aos apresentados pelas enzimas das populações susceptível e resistente sem custo, refletindo sua maior sensibilidade em relação ao efeito inibidor da acarbose.

Tab. 2: Valores CI 50 (concentração do inibidor que inibe 50% da atividade da enzima) para acarbose e inibidor *T. aestivum* em ensaios de inibição *in vitro* de α -amilases purificadas de uma população susceptível e de duas resistentes a piretróides (sem custo e com custo) de *S. zeamais*. Valores seguidos por uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Fischer ($p < 0.05$).

População	CI 50 Acarbose (mM)	CI 50 <i>Triticum aestivum</i> (μ de proteína)
Susceptível	41,014 b	4,890 b
Resistente sem custo	63,797 a	6,384 a
Resistente com custo	24,487 c	4,220 b

5.3.5. Grau de glicosilação das enzimas purificadas

Fenol, na presença de ácido sulfúrico, pode ser usado para determinação quantitativa de polissacarídeos como descrito por Dubois *et al* (1956). O método foi aplicado para se estimar o grau de glicosilação das α -amilases das populações de *S. zeamais*. As enzimas purificadas, quando submetidas ao ensaio contendo solução 5% fenol e ácido sulfúrico concentrado, provocaram o aparecimento de uma coloração amarela indicando a presença de carboidratos em suas estruturas, sendo, portanto, glicoproteínas. A porcentagem de carboidratos nas enzimas foi calculada como sendo de 16% na população susceptível, 11 % na população resistente com custo e 10% na população resistente sem custo.

A glicosilação representa a principal modificação covalente modulando a estrutura e a função das proteínas secretórias em eucariotos. Dependendo da proteína, o grupo carboidrato pode desempenhar papéis múltiplos como: o controle da conformação, estabilidade, proteção contra a degradação proteolítica, modulação da atividade da enzima e reconhecimento celular (Rademacher *et al.*, 1988; Matthews, 1993).

Tem sido detectada a presença de glicosilação em α -amilases obtidas de várias fontes. São glicoproteínas: a α -amilase de arroz (Miyata & Akazawa, 1982), α -amilase pancreática suína (Beauvilain *et al.*, 1973), α -amilase

pancreática humana (Ferey-Roux et al., 1998) e a α -amilase da levedura *Schwanniomyces occidentalis* (Yáñez et al., 1998).

5.3.6. Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato amido na velocidade das reações catalisadas pelas α -amilases purificadas das três populações de *S. zeamais* foi determinado pela curva de Michaelis-Menten. Os valores dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ das α -amilases purificadas estão representados na Tabela 3.

Tab. 3: Parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX} obtidos para α -amilases purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (sem custo e com custo) de *S. zeamais*, determinados pela curva de Michaelis-Menten. Valores seguidos pela mesma letra numa coluna não diferem significativamente pelo teste de Fischer ($p < 0.05$).

População	K_M (g.L ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$
Susceptível	0,236 a	640,086 a
Resistente sem custo	0,227 a	674, 340 a
Resistente com custo	0,140 b	500,120 b

*Concentração de proteína nas frações purificadas (mg.dL⁻¹): Susceptível= 0,0011, Resistente sem custo= 0,0014, Resistente com custo= 0,0005.

Não houve diferenças significativas entre os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ encontrados para as α -amilases da população susceptível e resistente sem custo. No entanto, o valor de K_M para a α -amilase da população resistente com custo foi bem menor indicando que essa enzima possui uma maior afinidade pelo substrato utilizado.

As populações de *S. zeamais* apresentaram curvas de velocidade do tipo hiperbólica (Figuras 15, 16 e 17) indicando que as três α -amilases purificadas seguem a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração do substrato utilizada.

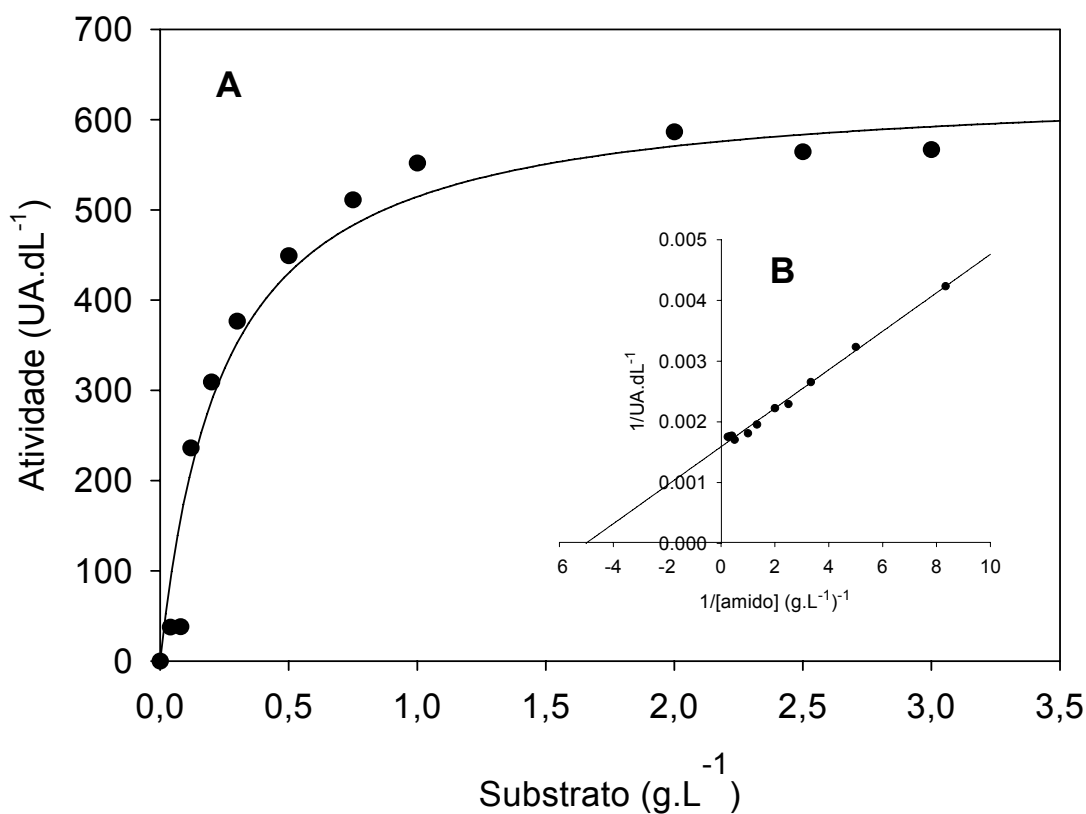


Fig. 15: Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela amilase purificada da população de *S. zeamais* suscetível a piretróides determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo Recíproco (B).

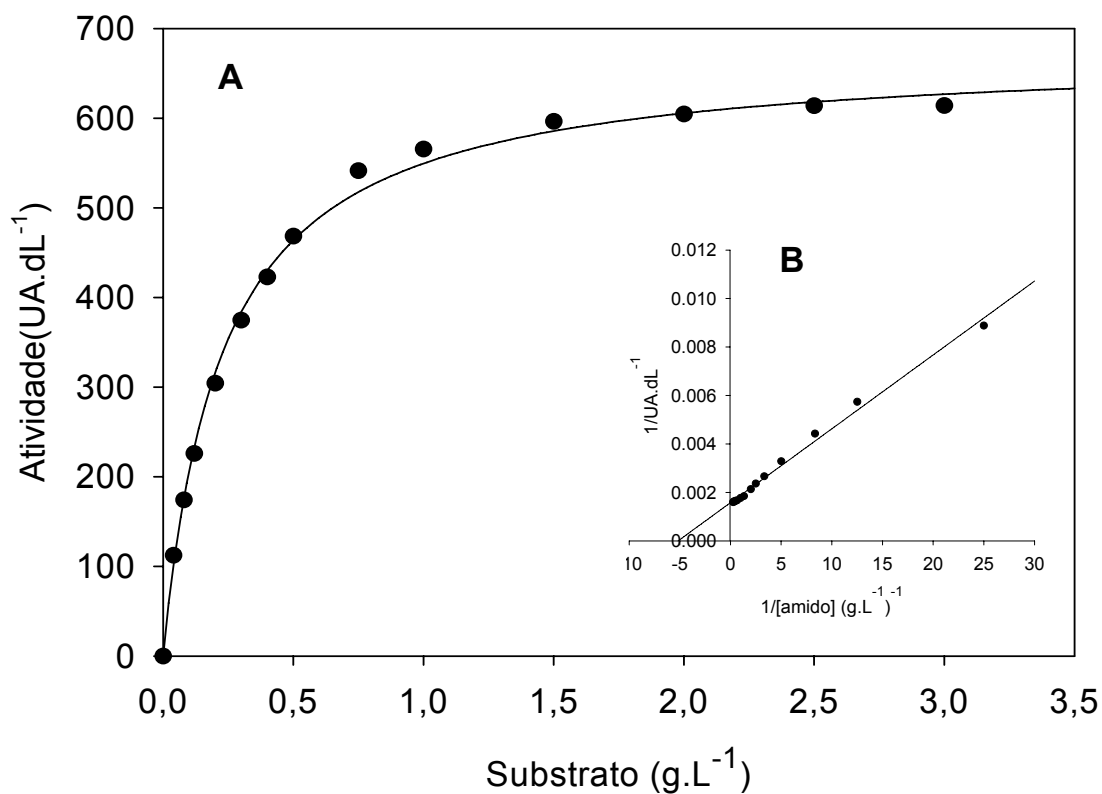


Fig. 16: Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela amilase purificada da população de *S. zeamais* resistente a piretróides (sem custo), determinada pela curva de Michaelis-Menten (A) e Duplo Recíproco (B).

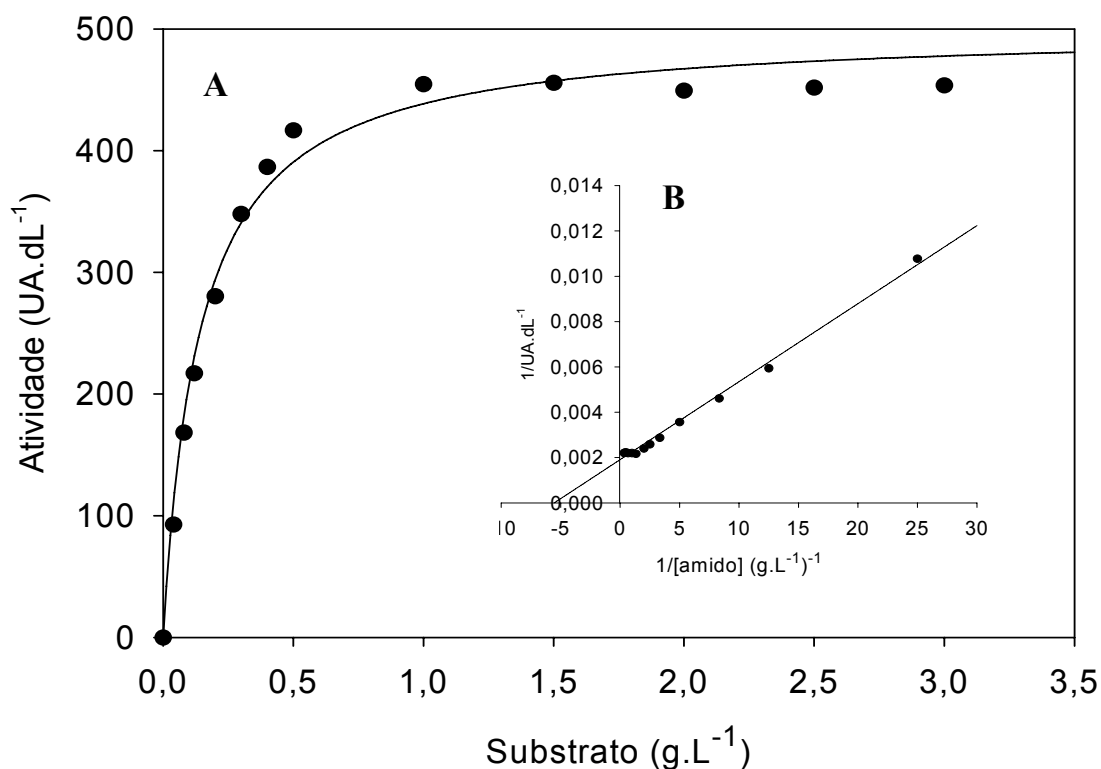


Fig. 17: Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela amilase purificada da população de *S. zeamais* resistente a piretróides (com custo), determinada pela curva de Michaelis Menten (A) e Duplo Recíproco (B).

Apesar da suspeita inicial de que desbalanços energéticos causados pela resistência levam a custos fisiológicos que refletem numa desvantagem adaptativa em indivíduos resistentes, num ambiente livre de inseticidas, Guedes *et al.* (2006) relataram que a população de Jacarezinho apresentou um crescimento demográfico similar a população susceptível, diferentemente da população de Juiz de Fora. Fragoso *et al.* (2005) também observaram desvantagem adaptativa da população resistente de Juiz de Fora e desempenho superior da população susceptível e da resistente de Jacarezinho, quando avaliadas em relação a taxa de crescimento e desenvolvimento.

Assim, avaliando diferenças na morfologia do corpo gorduroso e taxa respiratória média dos insetos pertencentes a essas populações, Guedes *et al.* (2006) relataram que o melhor desempenho da população de Jacarezinho seria

uma consequência direta de sua maior massa corporal, resultada de sua eficiência superior em estocar reservas energéticas. Além disso, essa população apresentou uma maior taxa respiratória sugerindo que suas reservas estariam sendo mobilizadas de forma adequada para suprir tanto os mecanismos de resistência quanto seu desenvolvimento e reprodução.

O mesmo parece não ocorrer na população de Juiz de Fora, pois essa apresentou um crescimento demográfico inferior quando comparada a população susceptível e a resistente de Jacarezinho. Em adição, a menor massa corporal e taxa respiratória apresentada foi associada a um custo fisiológico causado pelo desequilíbrio energético provocado pela realocação de energia para manutenção da resistência a inseticidas.

Baker (1987) reportou que a quantidade de α -amilases produzidas por uma população de *S. zeamais* está relacionada positivamente ao maior peso corporal exibido por seus componentes. A menor produção e atividade de α -amilase demonstrada pela população resistente de Juiz de Fora (com custo) reflete uma menor eficiência na utilização do amido ingerido, o que explica a menor massa corporal apresentada pelos insetos dessa população. Assim, a população resistente com custo não estaria obtendo energia suficiente da alimentação para ser alocada no corpo gorduroso e para suprir suas demandas energéticas de desenvolvimento e manutenção da resistência.

Além de estocar menos, a população resistente com custo necessita de uma maior mobilização de energia para manter seu alto nível de resistência a inseticidas, que mostrou ser duas vezes maior quando comparado ao nível de resistência exibido pela população resistente sem custo (Araújo *et al.*, 2008). Dessa forma, a menor atividade de α -amilase estaria contribuindo para o desempenho inferior da população resistente com custo em relação às demais.

A maior produção e atividade de α -amilases observadas na população resistente de Jacarezinho (sem custo) podem estar ocasionando uma maior eficiência na degradação do amido. Assim, os indivíduos dessa população estariam obtendo energia necessária para suprir as demandas energéticas imediatas e também para ser estocada no corpo gorduroso, contribuindo para a maior massa corporal apresentada pelos insetos dessa população. Os maiores níveis de α -amilase estariam contribuindo para mitigar o custo fisiológico associado aos mecanismos de resistência na população, já que a ação das α -

amilases estaria propiciando um estoque energético suficiente para manter os mecanismos de resistência sem comprometer os outros processos fisiológicos

As isoformas de α -amilases evidenciadas no perfil de eluição das populações resistentes também devem diferir em suas atividades e propriedades bioquímicas. A caracterização dessas enzimas pode ajudar a esclarecer se elas possuem ou não algum papel na mitigação dos custos fisiológicos associados ao fenômeno da resistência. Além disso, a exposição das populações resistentes a doses subletais de inseticidas para posterior purificação das α -amilases pode evidenciar diferenças no comportamento cinético dessas enzimas quando as populações são submetidas a esse tipo de stress.

6. CONCLUSÕES

- O processo de purificação resultou em α -amilases purificadas provenientes de duas populações resistentes e uma população susceptível a piretróides de *S. zeamais*
- A população resistente sem custo apresentou uma atividade de α -amilase semelhante à população susceptível e maior em relação à a enzima da população resistente com custo.
- O perfil de eluição das enzimas das duas populações resistentes evidenciou a presença de mais de um pico com atividade de α -amilase sugerindo a produção de isoformas de α -amilase com pontos isoelétricos diferentes
- As α -amilases purificadas das três populações de *S. zeamais* apresentaram uma massa molecular aproximada de 53,7 kDa por SDS-PAGE.
- A maior atividade para as três α -amilases das populações de *S. zeamais* foi em pH 5,0 e numa faixa de temperatura de 30 a 40 °C.

- As atividades das α -amilases purificadas das três populações de *S. zeamais* não foram alteradas na presença do íon Cl^- .
- As α -amilases purificadas das populações são glicoproteínas com porcentagens de glicosilação de 16% na população susceptível, 11% na população resistente com custo e 10% na população resistente sem custo.
- A α -amilase purificada da população resistente sem custo obteve valores de CI 50 de 63,797 mM para o inibidor acarbose e 6,384 μg de proteína para o inibidor *Triticum aestivum*. A população resistente com custo obteve CI 50 de 27,487 mM para o inibidor acarbose e 4,220 μg de proteína para o inibidor *T. aestivum* e, para a população susceptível, o valor de CI 50 para acarbose foi de 41,014 mM e para *T. aestivum* foi de 4,890 μg de proteína.
- O valor de K_M da α -amilase da população resistente com custo para o substrato amido foi 0,14 g.L^{-1} e 0,227 e 0,236 g.L^{-1} para as populações resistentes sem custo e susceptível, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J.I.; SIDENIUS, U. & SVENSSON, B. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, v.293, p.151-155, 1993.
- ABRAHAM, E.G.; NAGARAJU, J.; DATTA, R.K. Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombix mori* L.: comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.867-873, 1992.

- AGHAJARI, N.; FELLER, G.; GERDAY, C.; HASER, R. Crystal structures of the psychrophilic K-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor, **Protein Science**, v.7, p.564-572, 1998..
- AGRAWAL, A.A.; KOBAYASHI, C. & THALER, J.S. Influence of prey availability and induced host-plant resistance on omnivory by western flower thrips. **Ecology**, v.80, p.518-523, 1998.
- AL KAZAZ, M.; DESSEAUX, V.; MARCHIS-MOUREN, G.; PRODANOV, E.; SANTIMONE, M. The mechanism of porcine pancreatic α -amylase: inhibition of maltopentaose hydrolysis by acarbose, maltose and maltotriose. **European Journal biochemistry**, v.252, p.100-107, 1998.
- AMICHOT, M.; CASTELLA, C.; CUANY, A.; BERGE, J.B.; PAURON, D. Target modification on a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.44, p.183-190, 1992.
- APLEBAUM, S.W.; KONIJN, A.M. The utilization of starch by larvae of the flour beetle *Tribolium castaneum*. **The Journal of Nutrition**, v.85, p.275-282, 1965.
- ARAUJO, R.A.; GUEDES, R.N.C; OLIVEIRA, M.G.A; FERREIRA, G.H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of entomological research**, 2008 (no prelo).
- BAKER, J.E. Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. **Insect Biochemistry**, v.13, p.421-428, 1983.
- BAKER, J.E.; WOO, S.M. Purification and partial characterization and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus*

- granaries*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.2, p.415-428, 1985.
- BAKER, J.E. Eletrophoretic analysis of amylase isozymes in geographical strains of *Sitophilus oryzae* (L.), *S. zeamais* Motsch., and *S. granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.23, p.125-131, 1987.
- BAKER, J.E. Purification of an α -amylase inhibitor from wheat, *Triticum aestivum*, and its interaction with amylases from rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry**, v.18, p.107-116, 1988.
- BAKER, J.E. Purification and partial characterization of α -amylase alloenzymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Insect Biochemistry**, v.21, p.303-311, 1991.
- BEAUPOIL-ABADIE, B.; RAFFALLI, M.; COZZONE, P.; MARCHIS-MOUREN, G. Determination of the carbohydrate content of porcine pancreatic amylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.297, p.436, 1973.
- BERTICAT, C.; BOQUIEN, G.; RAYMOND, M.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance gene induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. **Genetical Research**, v.72, p.41-47, 2002.
- BETI, J.A.; PHILLIPS, T.W.; SMALLEY, E.B. Effects of maize weevils (Coleóptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B sub(1) by *Aspergillus flavus* in stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.1776-1782, 1995.
- BLANCO-LABRA, A.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; MARTÍNEZ-GALLARDO, N.; VALDES-RODRIGUEZ, S. Further characterization of the 12 kDa

- protease/ alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. **Journal of Food biochemistry**, v.19, p.27-41, 1995.
- BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.163-190, 1999.
- BOIVIN, T.; BOUVIER, J.C.; BESLAY, D.; SAUPHANOR, B. Phenological segregation of insecticide resistance alleles in the coding moth *Cydia pomonella*. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v.99, p.381-386, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method from quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRZOZOWSKI, A.M. AND DAVIES, G.J. Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. **Biochemistry**, v.36, p.10837-10845, 1997.
- BUONOCORE, V.; GRAMENZI, F.; PACE, W.; PETRUCCI, T.; POERIO, E.; SILANO, V. Interaction of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors with α -amylase from yellow mealworm (*Tenebrio molitor*). **Biochemistry Journal**, v.187, p.637-645, 1980.
- BUONOCORE, V.; POERIO, E.; SILANO, V; TOMASI, M. Physical and catalytic properties of α -amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. **Biochemistry journal**, v.153, p.621-625, 1976.
- BUONOCORE, V.; GRAMENZI, F.; PACE, W.; PETRUCCI, T.; POERIO, E.; SILANO, V. Interaction of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors with α -amylase from yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L. larvae). **Biochemistry Journal**, v.187, p.637-645, 1980.

- CARAWAY, W.T. Determination of uric acid in serum by carbonate method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.840-845, 1955.
- CHEN, M.S.; FENG, G.; ZEN, K.C.; RICHARDSON, M.; VALDES-RODRIGUEZ, S.; REECK, G.R. & KRAMER, K.J. α -amylase from three species of stored grain coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.261-268, 1992
- CHEVILLON, C.; BOURGUET, D.; ROUSSET, F.; PASTEUR, N.; RAYMOND, M. Pleiotropy of adaptative change in population: Comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. **Genetic Research**, v.68, p.195-203, 1997.
- CHEVILLON, C.; RAYMOND, M.; GUILLEMAUD, T.; LENORMAND, T.; PARTEUR, N. Population genetics of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.68, p.147-157, 1999.
- CHOWN, S.L.; GASTON, K. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales; the role of respiratory metabolism in insect. **Biological Research**, v.74, p.87-120, 1999.
- CINCO-MOROYOQUI, F.J.; ROSAS-BURGOS, E.C.; BORBOA-FLORES, J.; CORTEZ-ROCHA, M.O. α -Amylase activity of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) reared on several wheat varieties and its inhibition with kernel extracts. **Journal of Economic Entomology**, v.99, p.2146-2150, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Quarto levantamento de avaliação da safra 2006/2007**, p.5, 2007.

- COUSTEAU, C.; CHEVILLON, C.; FRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.378-383, 2000.
- DAUTER, Z.; DAUTER, M; BRZOZOWSKI, A.M.; CHRISTENSEN, S.; BORCHERT, T.V.; BEIER, L.; WILSON, K.S.; DAVIES, G.J. X-ray structure of Novamyl, the five-domain maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. **Biochemistry**, v.38, p.8385-8392, 1999.
- DONG, K.E.; SCOTT, J.G. Linkage of kdr-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in german cockroaches (*Blattella germanica*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, p.647-654, 1994.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-352, 1956.
- ERLICH, P.R. & RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in co-evolution. **Evolution**, v.1, p.18, 1964.
- FARONI, L.R.D. Manejo de pragas dos grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.17, p.36-43, 1992.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Mapa estatístico da agricultura mundial. [http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). (FAO)
- FEESE, M.D.; KATO, Y.; TAMADA, T.; KATO, M.; KOMEDA, T.; MIURA, Y.; HIROSE, M.; HONDO, K.; KOBAYASHI, K.; KUROKI, R. Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. **Journal of Molecular and Biology**, v.301, p.451-464, 2000.

- FENG, G.H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.S.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D. & REECK, G.R. α -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p.419-426, 1996.
- FEREY-ROUX, G.; PERRIER, J.; FOREST, E.; MARCHIS-MOUREN, G.; PUIGSERVER, A.; SANTIMONE, M. The human pancreatic α -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1388, p.10-20, 1998.
- FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, v.82, p.83-90, 1995.
- FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; REZENDE, S.T. Biochemical mechanisms of insecticides resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.109, p.21-29, 2003.
- FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; PETERNELLI, L.A. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.271-281, 2005.
- FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, M.G.A. Partial characterization of glutadione S-transferases in pyrethroid-resistant and –susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v.43, p.167-170, 2007.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; BLOCH JR, 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 of Biochemistry**, v.267, p.1466-1473, 2000.

- FRANCO, O.L.; MELO, F.R.; MENDES, P.A.; PAES, N.S.; YOKOYAMA, M.; COUTINHO, M.V.; BLOCH JR, C.; GROSSI DE SÁ, M.F. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* α -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.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*). **Journal of Food and Biochemistry**, v.8, p.281-301, 1984.
- FUJIMOTO, Z.; TAKASE, K.; DOUI, N.; MOMMA, M.; MATSUMOTO, T.; MIZUNO, H. Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. **Journal of Molecular and Biology**, v.277, p.393-407, 1998.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCHI, R.A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002. 920p.
- GARCÍA-CASADO, G.L.; SANCHEZ-MONGE, R.; LOPEZ-OTIN, C. & SALCEDO, G. Rye inhibitors of animal α -amylases shown different specificities, aggregative properties and IgE-binding capacities than their homologues from wheat and barley. **European Journal of Biochemistry**, v.224, p.525-531, 1994.
- GROSSI DE SÁ, M.F. & CHRISPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.271-281, 1997.
- GUEDES, R.N.C., LIMA, J.O.L., SANTOS, J.P., CRUZ, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus*

- zeamais* Mots.). **International Journal of Pest Management**, v.40, p.103-106, 1994.
- GUEDES, R.N.C., LIMA, J.O.L., SANTOS, J.P., CRUZ, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.145-150, 1995.
- GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, E.E., GUEDES, N.M.P., RIBEIRO, B.M., SERRÃO, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, p.30-38, 2006.
- GUERRERO, F.D.; JAMROZ, R.C.; KAMMLAH, D.M.; KUZ, S.E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *superkdr* point mutations. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.745-755, 1997.
- HANSAWASDI, C.; KAWABATA, J.; KASAI, T. α -Amylase inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.64, p.1041-1043, 2000.
- HARAK, M.; LAMPRECHT, I.; KUUSIK, A.; HIIESAAR, K.; METSPALU, L.; TARTES, U. Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. **Thermochemica Acta**, v.333, p.39-48, 1999.
- HAUBRUGE, E; ARNAULD, L. Fitness consequences of malathion-specific resistance in red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and selection for resistance in the absence of Malathion. **Journal of Economic Entomology**, v.94, p.552-557, 2001.

- HENRE, E.J.; GENGHOF, D.G. The α -amylases as glycosylases, with wider catalytic capacities than envisioned or explained by their representation as hydrolases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.142, p.382-393, 1971.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Journal of Biochemistry**, v.280, p.308-316, 1991.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Journal of Biochemistry**, v.316, p.695-696, 1996.
- ISHIKAWA, K.; NAKATANI, H.; KATSUYA, Y.; FUKAZAWA, C. Kinetic and structural analysis of enzymes sliding on a substrate: multiple attack in β -amylase. **Biochemistry**, v.46, p.792-798, 2007.
- JANEČEK, S. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v.224, p.519-524, 1994.
- JANEČEK, S. α -Amylase family: molecular biology and evolution, **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.67, p.67-97, 1997.
- JANEČEK, S; SVENSSON, B.; HENRISSAT, B. Domain evolution in the α -amylase family. **Journal of Molecular Evolution**, v.45, p.322-331, 1997.
- JANEČEK, S; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E.A. Relation between domain evolution, specificity and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p.635-645, 2003.
- JESPERSEN, H.M.; MACGREGOR, E.A.; HENRISSAT, B.; SIERKS, M.R ; SVENSSON, B. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural feature of the catalytic $(\beta/\alpha)_8$ -barrel

- domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes, **Journal of Protein Chemistry**, v.12, p.791-805, 1993.
- KADZIOLA, A.; SØGAARD, M.; SVENSSON, B.; HASER, R. Molecular structure of barley α -amylase-inhibitor complex: Implications for starch binding and catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v.278, p.205-217, 1998.
- KAMITORI, S.; KONDO, S.; OKUYAMA, K.; YOKOTA, T.; SHIMURA, Y.; TONOZUKA, T.; SAKANO, Y. Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVAll) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.287, p.907-921, 1999.
- 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 a α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. **Journal of Biochemistry**, v.120, p.177-183, 1996.
- KAZAZI, M.; BANDANI, A.R.; HOSSEINKHANI, S. Biochemical characterization of α -amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. **Entomological Science**, v.8, p.371-377, 2005.
- KATSUYA, Y.; MAEZAKI, Y.; KUBOTA, M.; MATSUURA, Y. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.281, p.885-897, 1998.
- KIM, M.J.; LEE, S.B.; LEE, H.B.; LEE, S.Y.; BAEK, J.S.; KIM, D.; MOON, T.W.; ROBYT, J.F. & PARK, K.H. Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomalto-dextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.371, p.277-283, 1999.

- KOUKIEKOLO, R.; LE BERRE-ANTON, V.; DESSEAUX, V.; MOREAU, Y.; ROUGÉ, P.; MARCHIS-MOUREN, G.; SANTIMONE, M. Mechanism of porcine pancreatic α -amylase: Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. **European Journal of Biochemistry**, v.265, p.20-26, 1999.
- KURIKI, T.; TAKATA, H.; OKADA, S.; IMANAKA, T. Analysis of active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.6147-6152, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-683, 1970.
- LAWSON, C.L.; VAN MONTFORT, R.; STROKOPYTOV, B.; ROZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DE VRIES, G.E.; PENNINGA, D.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. **Journal of Molecular Biology**, v.236, p.590-600, 1994
- LIMA, J.O.G. de; VILELA, E.F.; ZANUNCIO, J.C. **Controle de pragas dos grãos armazenados**, Viçosa, MG, CENTREINAR, 61p., 1979.
- LIU, Z.; VALLES, S.M.; DONG, K. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.991-997, 2000.
- LORINI, I. Pragas de grãos de trigo e milho armazenados. In: CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE TRIGO E MILHO EM SILOS E ARMAZÉNS. Passo Fundo, **Anais...**Passo Fundo: EMBRAPA/ CNPT, 1993. p.1-10, 1992.

- LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de cereais armazenados**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 80p., 2001.
- LOYTER, A.; SCHRAMM, M. The glycogen-amylase as a means of obtain highly purified α -amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.65, p.200-206, 1962.
- MACGREGOR, A.W.; MORGAN, J.E.; MACGREGOR, E.A. The action of germinated barley α -amylases on linear maltodextrins. **Carbohydrate Research**, v.227, p.301-313, 1992.
- MACGREGOR, E.A.; JANECECK, S. & SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1546, p.1-20, 2001.
- MACHIUS, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.246, p.545-559, 1995.
- MATHUPALA, S.P.; LOWE, S.E.; PODKOVYROV, S.M.; ZEIKUS, J.G. Sequencing of amylopullulanase (apu) gene of *Thermoanaerobacter ethnolicus* 39E, and identification of the active site by site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.16332-16344, 1993.
- MATSUURA, Y.; KUSUNOKI, M.; HARADA, W.; KAKUDO, M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. **Journal of Biochemistry**, v.95, p.697-702, 1984.
- MATTHEWS, C.R. Pathways of protein folding. **Annual Review of Biochemistry**, v.62, p.653-683, 1993.
- MCKENZIE, J.A. The biochemical and molecular bases of resistance: applications to ecological and evolutionary questions. In: **Ecological and**

- Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance.** Academic, Austin, .123-147, 1996.
- MENDIOLA-OLAYA, E.; VALENCIA-JIMENEZ, A.; VALDES-RODRIGUEZ, S.; DELANO-FRIER, J.; BLANCO-LABRA, A. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v.126, p.425-433, 2000.
- MIRANDA, M.M.M.; ARAÚJO, J.M.; PICANÇO, M.; FALEIRO, F.G. & MACHADO, A.T. Detecção de não-preferência à *Sitophilus zeamais* Mots. em espigas e grãos de 49 populações de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.20, p.21-25, 1995.
- MIYATA, S.; AKAZAWA, T. α -Amylase biosynthesis: Signal sequence prevents normal conversion of the unprocessed precursor molecule to the biologically active form. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.7792-7795, 1982.
- MCLLVAIN, T.C. A buffer solution for colorimetric comparisons. **Journal of Biological Chemistry**, v.49, p.183-186, 1921.
- NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E.G. Purification and characterization of digestive amylase from tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.110, p.201-209, 1995.
- NAHOUM, V.; ROUX, G.; ANTON, V.; ROUGÉ, P.; PUIGSERVER, A.; BISCHOFF, H.; HENRISSAT, B.; PAYAN, F. Crystal structures of human pancreatic α -amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. **Biochemical Journal**, v.346, p.201-208, 2000.

- NAKAGIMA, R.; IMANAKA, T.; AIBA, S. Comparison of amino acid sequence of eleven different α -amylases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.17-24, 1986.
- OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, R.N.C.; TÓTOLA, M.R.; DE MARCO JR, P. Competition between insecticide-susceptible and-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Chemosphere**, v.69, p.17-24, 2007.
- OUJEROUAT, N.; MOREAU, Y.; SANTIMONE, M.; SVENSSON, B.; MARCHIS-MOUREN, G.; DESSEAUX, V. On the mechanism of α -amylase: acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p.3871-3879, 2003.
- OLIVEIRA-NETO, O.; BATISTA, J.A.N.; RIDGEN, D.J.; FRANCO, O.L.; FALCÃO, R.; FRAGOSO, R.R.; MELLO, L.V.; DOS SANTOS, R.C.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Molecular cloning of α -amylase from the cotton ball weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: An approach to insect resistance. **Journal of protein Chemistry**, v.22, p.77-87, 2003.
- PODOLER, H.; APPLEBAUM, S.W. The α -amylase of beetle, *Callosobruchus chinensis*. **Biochemical Journal**, v.121, p.321-325, 1971.
- PRZYLAS, I.; TOMOO, K.; TERADA, Y.; TAKAHA, T.; FUJII, K.; SAENGER, W.; STRATER, N. Crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalysing the production of large cyclic glucans, **Journal of Molecular Biology**, v.296, p.873-886, 2000.

- QIAN, M.; HASER, R.; PAYAN, F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.231, p.785-799, 1993.
- RADEMACHER, T.W.; PAREKH, R.B.; DWEK, R.A. Glicobiology. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, p. 785-838, 1988.
- RAUSHER, M.D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. **Nature**, v.411, p.857-864, 2001.
- RAYMOND, M.; BERTICAT, C.; WEILL, M.; PASTEUR, N.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance in mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? **Genética**, v.112, p.287-296, 2001.
- REKHA, M.R. Inhibitor potential of protease and α -amylase inhibitors of sweet potato and taro on the digestive enzymes of root crop storage pests. **Journal of Stored Products Research**, v.40, p.461-470, 2004.
- RIBEIRO, B.M., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, E.E., SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.21-31, 2003.
- ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.361-380, 1987.
- RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449, 1990.
- SAKANO, Y.; FUKUSHIMA, J.; KOBAYASHI, T. Hydrolysis of α -1,4- and α -1,6-glucosidic linkages in trisaccharides by *Thermomouctinomyces vulgaris*

- α -amylase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.47, p.2211-2216, 1983.
- SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; XAVIER-FILHO, J.
Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v.124, p.515-522, 2000.
- SAS Institute, 2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th edition, SAS Institute, Cary, NC.
- SCHULER, H.T.; POPPY, M.G.; KERRY, B.R. & DENHOLM, L. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.168-174, 1998.
- SHAFER, T.J.; MEYER, D.A.; CROFTON, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.123-136, 2005.
- 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**, v.29, p.355-366, 1999.
- SODERLUND, D.M.; KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p.563-577, 2003.
- SPSS Inc., 2000. Sigma Plot 2000 User's Guide, Revised Edition. SPSS Inc., Chicago.
- STROBL, S.; GOMIS-RUTH, F. X.; MASKOS, K.; FRANK, G.; HUBER, R.; GLOCKSHUBER, R. The α -amylase from the yellow mealworm:

- complete primary structure, crystallization and preliminary x-ray analysis. **FEBS Letters**, v.409, p.109-114, 1997.
- STROBL, S.; MASKOS, K.; BETZ, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RUTH, F. X. & GLOCKSHUBER, R. Crystal structure of yellow mealworm α -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.278, p.617-628, 1998.
- SUBRAMANYAM, BH.; P. K. HAREIN & L. K. CUTKOMP. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. **Journal of Economic Entomology**, v.82, p.989-995, 1989.
- SVENSSON, B. Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.141-157, 1994.
- TAKATA, H.; KURIKI, T.; OKADA, S.; TAKESADA, Y.; LIZUKA, M.; MINAMIURA, N.; IMANAKA, T. Action of neopullulanase: neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1→4)- and α -(1→6)-glucosidic linkages. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.18447-18452, 1992.
- TAYLOR, M.F.J.; HECKEL, D.G.; BROWN, T.M.; KREITMAN, M.E.; BLACK, B. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the Tobacco Budworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.23, p.763-775, 1993.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A.G. Action pattern, kinetical properties electrophoretic studies on an amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara Americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v.56, p.201-209, 1977.

- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v.109, p.1-62, 1994.
- TERRA, W.R.; ESPINOZA-FUENTES, E.P.; FERREIRA, C. Midgut amylase lysozyme, aminopeptidase and trehalase from larvae and adults of *Musca domestica*. **Archives of Biochemistry and Physiology**, v.9, p.283-297, 1988.
- TITARENKO, E. & CHRISPEELS, M.J. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.979-990, 2000.
- TSAO, C.Y.; HSU, Y.H.; CHAO, L.M.; JIANG, S.T. Purification and characterization of three amylases from viscera of hard clam *Meretrix lusoria*. **Fisheries science**, v.70, p.174-182, 2004.
- UITDEHAAG, J.C.M.; MOSI, R.; KALK, K.H.; VAN DER VEEN, B.A.; DIJKHUIZEN, L.; WITHERS, S.G.; DIJKSTRA, B.W. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family, **Nature Structural & molecular Biology**, v.6, p.432-436, 1999.
- 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.
- VISURI, K.; NUMMI, M. Purification and characterization of crystalline β -amylase from barley. **European Journal of Biochemistry**, v.28, p.555-585, 1972.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 931p., 2000.

WAKEFIELD, M.E.; BRYNING, G.P.; CHAMBERS, J. Progress towards a lure to attract three stored product weevils, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *S. oryzae* (L.) and *S. granarius* (L.) (Coleóptera: curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.145-161, 2005.

WARCHALEWSKI, J.R.; GRALIK, J.; WINIECKI, Z.; NAWROT, J.; PIASECKA-KWIATKOWSKA, D. The effect of wheat α -amylase inhibitors incorporated into wheat-based artificial diets on development of *Sitophilus granarius* L., *Tribolium confusum* Duv., and *Ephestia kuehniella* zell. **Journal of Applied Entomology**, v.126, p.161-168, 2002.

WHITEHEAD, J.; ROUSH, R.T.; NORMENT, B.R. Resistance stability and coadaptation in diazino-resistance house-flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v.78, p.25-29, 1985.

WILLIAMSON, M.S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C.A.; DEVONSHIRE, A.L. Identification of mutations in the house-fly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.51-60, 1996.

YAMAGATA, H.; KUNIMATSU, K.; KAMASAKA, H.; KURAMOTO, T. & IWASAKI, T. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, p.978-985, 1998.

YÁÑEZ, E.; CARMONA, T.A.; TIEMBLO, M.; JIMÉNEZ, A.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M. Expresión of the *Schwanniomyces occidentales* SWA2

amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. **Biochemistry Journal**, v.329, p.65-71, 1998.

YOSHIOKA, Y.; HASEGAWA, K.; MATSUURA, Y.; KATSUBE, Y.; KUBOTA, M. Crystal structures of a mutant maltotetraose-forming exo-amylase cocrystallized with maltopentaose. **Journal of Molecular Biology**, v.271, p.619-628, 1997.

ZENG, F.; COHEN, A.C. Partial characterization of α -amylase in the salivary glands of *lygus Hesperus* and *Lygus lineolaris*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.126, p.9-16, 2000.