



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

**INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE CEREAIS E SEU POTENCIAL DE  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

**Fernanda Arnhold Pagnussatt**

Engenheira de Alimentos

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eliana Badiale-Furlong – Orientadora

Dra. Jaqueline Garda-Bufferon – Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2010

Fernanda Arnhold Pagnussatt

**INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE CEREAIS E SEU POTENCIAL DE ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Badiale-Furlong e co-orientação da Dra. Jaqueline Garda-Bufferon.

Rio Grande, RS

2010

## AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho, contei com a ajuda de pessoas especiais, as quais sou profundamente grata:

À minha querida mãe, graças a Deus, minha mãe, protetora, anjo da guarda, agradeço por todo seu esforço durante esses longos anos em que fez o impossível para nos proporcionar momentos de alegria como esse. Obrigada pelo amor incondicional, pela paciência nos meus dias “ruins”, por manter eu, você e a Cla sempre unidas, apesar de tudo. Cla, obrigada por cuidar bem da “mamis” na minha ausência, por estar sempre presente e me alegrar com suas risadas bombásticas!!!!

Ao meu namorado, amor, amigo, companheiro, Fabricio, por ter me ensinado que a vida é simples, maravilhosa e que basta sabermos aproveitar os pequenos momentos para atingir a felicidade plena. Pelo apoio incondicional durante as maiores dificuldades que passei e pelas nossas superações. Pelo sentimento que nos une e que me dá forças para continuar aqui.....

À minha orientadora Eliana, pela oportunidade, por ter me aceitado de braços e coração aberto, pelos ensinamentos, conversas, amizade, preocupação, carinho, por ter me ensinado que a paciência é uma grande virtude e que nada acontece na vida da gente por acaso. Muito obrigada também pelo amor diário que você transmite e por nos ensinar que quando se ama aquilo que se faz, tudo se torna mais fácil e especial.....

À minha co-orientadora Jaqueline, muito mais do que isso, uma amiga que eu ganhei e espero levar para a vida toda. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio, carinho, amizade, conselhos, enfim, simplesmente...obrigada !!!

À minha fiel companheira de todas as horas, Ana. Você, com o passar dos anos se tornou uma grande irmã e amiga, presente em todos os momentos, desde os mais fáceis e até naqueles em que a vontade era jogar tudo para o alto e sair correndo. Obrigada por suportar meu mau humor e respeitar meu espaço, por sua companhia, amizade, paciência, enfim. Que bom seria se todos pudessem ter em suas vidas pessoas especiais como você!!!

À Franciela, companheira e amiga querida de todas as horas, por todos os bons e maus momentos que passamos e superamos juntas, obrigada pela sua dedicação, carinho, paciência e senso de humor; por nunca desistir da nossa amizade e por suportar tudo sempre de cabeça erguida e esperança de dias melhores!!!!!!!!!!

À Jesus, companhia diária no laboratório, pessoa capaz de melhorar o astral de todos e nos mostrar, sutilmente, a melhor maneira de encarar o mundo. Obrigada pela confiança que você depositou em mim desde o início. Conte sempre comigo, adoro muito você e o seu mosXXXtraaaaa.

À Silvia, Michele, Cristina e a sempre presente Cristiana. Sem vocês este trabalho não teria chegado ao fim. Cada uma, na sua maneira, foi muito importante, tenham certeza disso. Vocês me ensinaram a ser mais tolerante e respeitar as diferenças. Eu acredito muito na capacidade de cada uma, vocês me surpreenderam. Obrigada não apenas pela realização da parte experimental, mas também pela amizade, conversas, novas idéias, pelos erros e recomeços, pela oportunidade de nos tornarmos amigas e companheiras diárias com o passar do tempo. Contem sempre comigo!!!

À Larine, pessoa mais apaixonada pelo que faz que eu já conheci. Um exemplo de determinação, dedicação, amizade, enfim, sempre a disposição de todos. Você sabe como foi importante sua participação na etapa final desse trabalho. Adoro ter sua amizade, obrigada mesmo!!!!

Às companheiras de pós-graduação, que se tornaram queridas amigas, Michele, Vivian, Helen, Renata e Ana Paula, obrigada por toda a ajuda, sempre dispostas a me auxiliar em qualquer momento, muitas vezes deixando de fazer suas coisas para me “socorrerem”. Quando precisarem de mim, sempre estarei disponível!!!!

Aos colegas de laboratório Anelise, Luciana, Eliane, Meritane, Gabriela, Priscila, Vitor; a convivência diária com vocês tornou mais leve e divertida a realização dos experimentos.

Ao Professor Luiz Carlos Gutkoski, da Universidade de Passo Fundo, pelo auxílio com o material experimental. Sou eternamente grata por você ter sido meu orientador na graduação e ter me conduzido para a iniciação científica. Sem esse começo, com certeza eu não estaria aqui hoje!!! Obrigada por todos esses anos de convivência e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, seus professores e colegas por acreditar na realização deste trabalho.

Aos membros da banca, professoras Leonor, Myriam, Susana e Telma, pela paciência em corrigir este trabalho e por todas as valiosas sugestões dadas. Fica aqui registrado meu agradecimento, respeito, carinho e admiração!!!

À Capes pelo auxílio financeiro.

**Mesmo que nossos projetos não tenham se realizado inteiramente, temos que ser generosos com nossos avanços e saber que o sonho sempre será maior que nossas conquistas.**

**Gikovate**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
3.1 Cereais .....	19
3.1.2 Trigo .....	19
3.1.2 Arroz.....	22
3.1.3 Aveia.....	24
3.2 Enzimas.....	26
3.2.1 Fatores que influenciam a velocidade das reações enzimáticas .....	27
3.2.2 Inibição enzimática .....	28
3.2.3 Purificação de proteínas .....	29
3.3 Amilases .....	30
3.3.1 Características e mecanismo de ação das amilases .....	32
3.3.2 Inibidores de amilases em plantas .....	32
3.4 Fungos.....	35
3.4.1 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	36
3.4.2 Gênero <i>Fusarium</i> .....	36
3.4.3 Contaminação dos alimentos por fungos .....	37

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>39</b>
---------------------------	-----------

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA FRAÇÃO PROTÉICA DE VARIEDADES DE ARROZ, AVEIA E TRIGO CULTIVADOS NO RS .....**

<b>40</b>	<b>41</b>
RESUMO .....	41
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Matéria-prima.....	44
2.2 Composição centesimal .....	45
2.3 Solubilidade das proteínas .....	45
2.4 Digestibilidade da proteína <i>in vitro</i> e metionina disponível .....	45
2.5 Atividade enzimática .....	46
2.6 Análise estatística .....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.1 Composição centesimal .....	47
3.2 Solubilidade das proteínas .....	50
3.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> e teor de metionina disponível .....	52
3.4 Atividade enzimática .....	55
4 CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS .....	58

**EXTRAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE CEREAIS .....**

<b>62</b>	<b>63</b>
RESUMO .....	63
1 INTRODUÇÃO.....	65
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Amostras e seu preparo.....	67
2.2 Teste de inibição enzimática .....	68
2.3 Análise estatística .....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
4 CONCLUSÃO .....	76
REFERÊNCIAS .....	77

**AMILASE FÚNGICA COMO INDICADOR DA PRESENÇA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

<b>79</b>	<b>80</b>
RESUMO .....	80
1 INTRODUÇÃO.....	82
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84

2.1 Obtenção dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos e estudo da especificidade.....	84
2.2 Caracterização bioquímica da amilase fúngica .....	85
2.3 Caracterização dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos.....	86
2.4 Estudo do mecanismo e da constante de inibição enzimática.....	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
3.1 Estudo da especificidade .....	87
3.2 Caracterização da amilase fúngica comercial .....	88
3.3 Caracterização dos extratos contendo inibidores enzimáticos obtidos de cereais.	91
3.4 Estudo do mecanismo e da constante de inibição enzimática.....	99
4 CONCLUSÃO .....	103
REFERÊNCIAS .....	104

## **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO POR COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE CEREAIS**

.....	108
RESUMO.....	109
1 INTRODUÇÃO.....	111
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	112
2.1 Preparo dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos .....	112
2.2 Determinação de proteína solúvel nos extratos .....	112
2.3 Espécies fúngicas.....	113
2.4 Efeito <i>in vitro</i> de extratos inibidores sobre o desenvolvimento fúngico .....	113
2.5 Determinação do teor de glucosamina.....	114
2.6 Análise estatística .....	114
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
4 CONCLUSÃO .....	119
REFERÊNCIAS .....	120
CAPÍTULO IV .....	122
5 CONCLUSÃO GERAL .....	123
REFERÊNCIAS .....	124



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1 Composição química dos cereais (valores médios).....	19
---	----

### CAPÍTULO III

#### CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA FRAÇÃO PROTÉICA DE VARIEDADES DE ARROZ, AVEIA E TRIGO CULTIVADOS NO RS

Tabela 1 Composição centesimal das amostras de aveia, arroz e trigo .....	48
Tabela 2 Valores de proteína solúvel em cereais.....	50
Tabela 3 Distribuição das frações protéicas em arroz, aveia e trigo.....	51
Tabela 4 Digestibilidade <i>in vitro</i> e teor de metionina disponível em arroz, aveia e trigo	53

#### EXTRAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS

Tabela 1 Variáveis independentes e níveis de variação utilizados nos ensaios .....	67
Tabela 2 Porcentagem da amilase fúngica por extratos etanólicos de aveia, trigo e arroz .....	71
Tabela 3 ANOVA para a resposta porcentagem de inibição ocasionada por extrato de aveia (%).....	72
Tabela 4 ANOVA para a resposta porcentagem de inibição ocasionada por extrato de trigo (%).....	74
Tabela 5 ANOVA para a resposta porcentagem de inibição ocasionada pelo extrato alcoólico de arroz (%).....	75

#### AMILASE FÚNGICA COMO INDICADOR DA PRESENÇA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS

Tabela 1 Especificidade dos extratos contendo inibidores enzimáticos determinada com amilases de diferentes fontes .....	88
Tabela 2 Atividade específica em diferentes tampões .....	89
Tabela 3 Percentual de inibição (%) dos extratos de arroz, aveia e trigo sob diferentes condições de umidade e tempo. ....	95
Tabela 4 Atividade específica do inibidor em diferentes tampões .....	97
Tabela 5 Atividade específica em diferentes temperaturas .....	98
Tabela 6 Valores de $K_{ms}$ e $V_{max}$ na presença e ausência de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo .....	103

## **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO POR COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE CEREAIS**

Tabela 1 Teor de glucosamina do fungo <i>Rhizopus oryzae</i> em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo em diferentes concentrações protéicas.....	115
Tabela 2 Teor de glucosamina do fungo <i>Aspergillus flavus</i> em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo .....	116
Tabela 3 Teor de glucosamina do fungo <i>Fusarium graminearum</i> em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo .....	117

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1 Grão de trigo.....	21
Fonte: Hosoney (1991). .....	21
Figura 2 Grão de arroz.....	23
Figura 3 Grão de aveia. ....	25
Figura 4 Tipos de inibição enzimática reversível.....	29

### CAPÍTULO III

#### **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA FRAÇÃO PROTÉICA DE VARIEDADES DE ARROZ, AVEIA E TRIGO CULTIVADOS NO RS**

Figura 1 Masa da fração (mg) por g de proteína nas amostras de cereais.....	52
Figura 2 Digestibilidade* da proteína <i>in vitro</i> e metionina** disponível nas variedades de arroz 424, aveia Teixeira e trigo Ônix.....	54
Figura 3 Atividade específica da $\alpha$ -amilase e $\beta$ -amilase. ....	55

#### **EXTRAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

Figura 1 Determinação da velocidade da reação em presença do inibidor.....	2
Superfícies de resposta em relação ao efeito combinado das variáveis tempo de extração e concentração de etanol sobre a % de inibição para as cultivares de aveia UPFA 20 Teixeira (A), UPFA 22 Temprana (B) e UPFA Pampa (C). .....	73

#### **AMILASE FÚNGICA COMO INDICADOR DA PRESENÇA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

Figura 1 Estabilidade da amilase fúngica em diferentes pHs. ....	90
Figura 2 Estabilidade da amilase fúngica em diferentes temperaturas de incubação.....	
Figura 3 Estabilidade do inibidor extraído de trigo mediante congelamento.....	92
Figura 4 Estabilidade do inibidor extraído de aveia mediante congelamento .....	
Figura 5 Estabilidade do inibidor extraído de arroz mediante congelamento.....	94
Figura 7 Atividade inibitória (%) do inibidor de arroz, aveia e trigo após tratamento com diferentes tempos de incubação a 25 °C.....	99
Figura 8 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de arroz .....	100
Figura 9 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de aveia .....	101

Figura 10 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de trigo..... 102

### **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO POR COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE CEREAIS**

Figura 1 Porcentagem de inibição do fungo *Fusarium graminearum* na presença de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo em relação ao controle ..... 118

## RESUMO

Os cereais são fontes de inibidores enzimáticos que agem sobre a  $\alpha$ -amilase, alterando a disponibilidade do amido e podem representar uma ferramenta útil para a resistência dos vegetais ao ataque de patógenos. O objetivo do trabalho foi estudar a presença de inibidores enzimáticos em cereais e avaliar sua relação com a susceptibilidade à contaminação fúngica. Amostras de grãos de aveia (UPFA 20 Teixeira, UPFA 22 Temprana e UPFA Pampa), trigo (Safira, Ônix e Pampeano) e arroz (BR 410, BR 417 e BR 424) foram moídas, peneiradas e caracterizadas físico-quimicamente. A melhor condição para a extração de inibidores enzimáticos da aveia e trigo foi obtida ao utilizar o sistema de extração etanol 70 % e 12 horas de agitação, com inibição da amilase fúngica em torno de 90 %. Nas cultivares de arroz, o extrato bruto inibiu 96 % da ação da enzima amilase em ensaios *in vitro*, quando se empregou como extrator etanol 95 % e 7 h de extração. A enzima Fungamyl®, com atividade específica de 20 mg de amido hidrolisado mL<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> foi caracterizada bioquimicamente para fornecer os parâmetros necessários para avaliação da presença de inibidores nos extratos. As propriedades antifúngicas desses extratos inibidores foram testadas pelo método de ágar diluído, utilizando como resposta o teor de glucosamina dos fungos. Durante os 14 dias de incubação do *Fusarium graminearum* as maiores inibições de crescimento fúngico foram alcançadas em presença dos extratos de aveia e de trigo. A próxima etapa será a purificação dos inibidores nas cultivares mais promissoras para aplicar o conhecimento em programas genéticos capazes de aumentar a resistência desses grãos a determinados fungos ou extraí-los para a preservação em conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** extratos inibidores, cereais, seletividade, caracterização bioquímica, inibição fúngica.

## ABSTRACT

Cereals are sources of enzymatic inhibitors which act upon alpha-amylase disturbing starch availability, generating a higher resistance to the attack of pathogens. This work aim was to study the presence of enzymatic inhibitors in cereals and evaluate its relation with fungi contamination susceptibility. Samples of oat (UPFA 20 Teixeira, UPFA 22 Temprana e UPFA Pampa), wheat (Safira, Ônix e Pampeano) and rice (BR 410, BR 417 e BR 424) were milled, homogenized and then its physicochemical properties were analyzed. The best conditions for extraction enzymatic inhibitors of wheat and oat was ethanol 70%, 12 hours of agitation which obtained an inhibition of fungal amylase of 90%. Rice crude extract varieties obtained a 96% of enzymatic amylase inhibition during *in vitro* tests, when extraction contained 95% of ethanol and 7 h agitation. The enzyme Fungamyl®, which specific activity of 20 mg protein mL<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of hydrolyzed starch, was biochemically characterized to establish the necessary parameters to research inhibitors activity. Antifungal properties from the extracts were analyzed utilizing the diluted agar method, the response was measure through the level of glucosamine produce by the fungi. During 14 days of incubation *Fusarium graminearum* inhibition was greater in the oat and wheat extracts presence. The next stage it's to purify of the inhibitors on the cultivars most promising to apply this knowledge to genetic databases that are capable to enhance the resistance of grains to certain species of fungi or extract them for preservation in foods.

**KEYWORDS:** Inhibitor extracts, cereals, selectivity, biochemical characterization, fungal inhibition.

## **CAPÍTULO I**

## 1 INTRODUÇÃO

Os cereais estão entre as matérias-primas mais utilizadas em diversas regiões do mundo, devido a sua composição química e propriedades tecnológicas. Estas características nutricionais os tornam susceptíveis ao ataque de fungos e insetos predadores, sendo que pragas e patógenos (fungos, bactérias e vírus) são responsáveis por grandes prejuízos para a agricultura, que podem atingir entre 37 e 45 % da produção, causando injúrias e doenças, além de se alimentarem dos tecidos de plantas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; FRANCO et al, 2002, OERKE et al, 1994), o que é um fator significativo na limitação da produção de alimentos (FERRY et al, 2004).

Essas perdas precisam ser minimizadas, pois de acordo com dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2008), a população mundial atingiu 6,6 bilhões de pessoas no ano de 2008 e a produção de cereais totalizou uma produção de 189 milhões de toneladas. Em 2050 a população chegará a mais de 9,2 bilhões de habitantes, o que aumentará consideravelmente a demanda por alimentos.

O controle de pragas e patógenos é realizado com a utilização de pesticidas. Porém, o uso excessivo desses produtos tem contribuído para a seleção de populações de organismos resistentes, assim como, para a contaminação de grãos e seus subprodutos com resíduos dos seus ingredientes ativos (LORINI, 2001).

Esses fatos justificam a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de abordagens alternativas para esse problema visto que as áreas de cultivo são finitas e a produtividade agrícola deve ser aumentada com o aumento da população mundial. Em relação à agricultura, culturas com alta produtividade, resistentes a pragas, além de não danosas ao meio ambiente estão sendo desenvolvidas para melhorar o valor nutricional e/ou para a produção de vacinas contra uma variedade de doenças (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Os defensivos naturais são encontrados em vários tecidos vegetais (HOLMES, BOSTON e PAYNE, 2008) e entre esses compostos estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas (HARUTA et al, 2001). Entre as proteínas, destacam-se enzimas tais como as quitinases, as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas, que não inibem apenas as enzimas salivares e pancreáticas, mas também aquelas presentes no trato intestinal de insetos e pragas encontrados em grãos armazenados, bem como as enzimas microbianas endógenas (FIGUEIRA et al, 2003b; VALENCIA-JIMÉNEZ et al, 2008). Como as  $\alpha$ -amilases são essenciais para o crescimento e desenvolvimento também dos fungos, os inibidores enzimáticos podem afetar seu ciclo de vida, em função da alteração na disponibilidade de nutrientes, no caso o amido (FRANCO et al, 2002).



Inibidores de  $\alpha$ -amilases já foram descritos em feijão, micro-organismos e cereais (BERI e GRUPTA, 2007; FRANCO et al, 2002; GROSSI-DE-SA et al, 1997; IULEK et al, 2000). Entre os cereais, o trigo destaca-se como a principal fonte (CARUSO et al, 2001), embora a aveia, o milho, o arroz, o centeio, a cevada e o triticales também possuam inibidores enzimáticos (ABES, SIDENIUS e SVENSSON, 1993; BLOCH e RICHARDSON, 1991; FENG et al, 1996; IULEK et al, 2000; LYONS, RICHARDSON e TATHAM, 1987; SANCHEZ-MONGE et al, 1992; YAMAGATA et al, 1998). Assim, a identificação de inibidores dessas enzimas presentes em vegetais torna-se uma ferramenta útil no controle de patógenos, entre eles especialmente fungos que atacam as sementes no campo e também ao longo do armazenamento.

O aumento natural de defesa das plantas pode aperfeiçoar a produtividade na agricultura e segurança alimentar com o objetivo de reduzir o intenso uso de agrotóxicos (FRANCO et al, 2002). Segundo Lawrence e Kounda (2002), a busca pelo desenvolvimento de técnicas ambientais favoráveis seria uma possível solução para diminuir gastos em energia e a produção de resíduos com o uso de agrotóxicos. As técnicas de DNA recombinante e as plantas geneticamente modificadas trazem importantes avanços científicos nessa área (O'CALLAGHAN et al, 2005). Tão importante quanto determinar a presença desses inibidores em cereais e avaliar seus efeitos sobre as  $\alpha$ -amilases, é o estudo na participação dessas substâncias na resistência de grãos a diferentes organismos. Baseado nisso, é interessante identificar essas substâncias com capacidade inibitória com ênfase em variedades de cereais cultivados na região sul do Brasil.

Além dos aspectos científicos, o conhecimento de mecanismo de atuação pode ser subsídio para desenvolvimento de tecnologias que permitam o emprego desses inibidores para fins de produção de insumos alimentícios e medicamentos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a presença de inibidores enzimáticos em cereais e avaliar seu potencial de atividade antifúngica.

### **2.2 Objetivos específicos**

Realizar a caracterização físico-química e da fração protéica de cereais cultivados no Rio Grande do Sul, visando correlacioná-las com a presença de inibidores enzimáticos e resistência a contaminação fúngica;

Obter as melhores condições para a extração de inibidores enzimáticos de amilase fúngica presentes em grãos de arroz, aveia e trigo;

Aprofundar os conhecimentos sobre essas substâncias com capacidade inibitória através da sua caracterização parcial;

Avaliar o efeito desses inibidores no desenvolvimento da biomassa fúngica.

## **CAPÍTULO II**

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cereais

Os cereais são grãos ou sementes comestíveis da família *Gramineae*. Uma série de cereais são cultivados em diferentes países, tais como trigo, arroz, aveia, centeio, cevada, milho, triticale e sorgo. As culturas de arroz e trigo são destaque, representando mais de 50% da produção mundial de grãos. Todos os cereais apresentam algumas semelhanças estruturais e consistem de um embrião (ou gérmen), que contém o material genético para a formação de uma nova planta, e um endosperma, rico em amido (McKEVITH, 2004).

A composição química dos grãos varia dependendo do ambiente, solo e variedade (GOESAERT et al, 2009; McKEVITH, 2004) e seus constituintes não estão distribuídos de forma uniforme dentro da cariopse (MIRANDA, MORI e LORINI, 2005). Na Tabela 1 são comparadas as composições químicas dos grãos de arroz, milho, trigo e aveia. Destes cereais, o arroz possui a mais baixa porcentagem de proteína e a aveia é rica em lipídios e outros carboidratos (HOSENEY, 1991).

Tabela 1 Composição química dos cereais (valores médios de grãos descascados)

COMPONENTE (% em peso)	TRIGO	ARROZ	AVEIA
Água	13,2	13,1	13,0
Proteína	11,7	7,4	12,6
Lipídios	2,2	2,4	5,7
Amido	59,2	70,4	40,1
Outros carboidratos	10,1	5,0	22,8
Fibra bruta	2,0	0,67	1,56

Fonte: HOSENEY, 1991.

##### 3.1.2 Trigo

O trigo foi o primeiro produto agrícola utilizado no processamento de alimentos, é um cereal fasciculado pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Triticum*, possuindo diversas espécies (POSNER, 2000).

A qualidade do grão de trigo pode ser definida como resultado da interação que a cultura sofre no campo, pelos efeitos das condições de solo, do clima, da incidência de pragas e moléstias, manejo da cultura, da cultivar, bem como das operações de colheita e secagem, armazenamento, moagem e do uso industrial a ser dado à farinha (HOSENEY, 1991).

Este cereal é cultivado em muitas regiões do mundo, sendo mais produtivo em locais de 30 a 60° de latitude Norte e 27 a 40° de latitude Sul (KENT, 1987). Pode se adaptar em diversas condições de clima e solo; se cultivado no inverno denomina-se trigo de inverno ou na primavera, trigo de primavera, sendo que a manipulação genética resulta em produtividade, resistência ao ataque de patógenos e propriedades tecnológicas distintas (MÁTUS-CÁDIZ et al, 2003).

No Brasil, o trigo, introduzido pelos colonizadores europeus, teve dificuldades de adaptação, que limitavam a estabilidade e a confiabilidade dos rendimentos. Com a introdução dos programas de melhoramento genético, foi possível superar essas limitações, sejam pela seleção de variedades genéticas superiores, seja por práticas culturais mais adequadas que modificam o ambiente para melhor adequação da planta, de forma a garantir sua alta produtividade (SOUZA et al, 2004).

A cultura desse grão tem grande importância para a economia do Brasil, devido ao elevado consumo de seus derivados (CARNEIRO et al, 2005). No entanto, a produção brasileira não tem sido suficiente para atender a demanda, agravada pela grande quantidade de grãos perdidos ou colhidos com qualidade inferior, decorrentes de chuvas ou perdas pós-colheita, pelo ataque de micro-organismos e insetos (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

O mercado consumidor no Brasil é mantido por produção nacional e importada. Para a safra 2009/10 é esperado um decréscimo de 15,7 % na produtividade em relação à safra 2008/2009. A estimativa atual da produção brasileira de grãos é de 5 mil toneladas, sendo que as adversidades climáticas favoreceram a ocorrência de doenças nesse cereal (CONAB, 2010).

Os grãos de trigo se dividem em três partes durante o processamento: gérmen (3 %), endosperma (83 %), pericarpo ou farelo (14 %) (POSNER, 2000), conforme representado na Figura 1. A parte mais externa do grão é o pericarpo, que é derivado do ovário das flores e é constituído por 6 camadas (epiderme, hipoderme, remanescentes da parede celular ou células finas, células intermediárias, células cruzadas e células tubulares (McKEVITH, 2004). O endosperma é a principal parte do grão, sendo constituído de amido e proteínas de reserva e circundado pela camada de aleurona. O gérmen é a estrutura que contém o material genético para o desenvolvimento da nova planta, sendo separado do endosperma pelo escutelo (BELITZ e GROSCH, 1997).

O pericarpo é rico em pentosanas, celulose e minerais; a aleurona é constituída de minerais (fósforo, fitato), proteína, lipídeos, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina) e enzimas; o endosperma é composto de amido e proteína e o gérmen tem alto conteúdo de proteína, lipídeos, açúcares redutores, minerais e vitaminas do complexo B e E (HOSENEY, 1991).

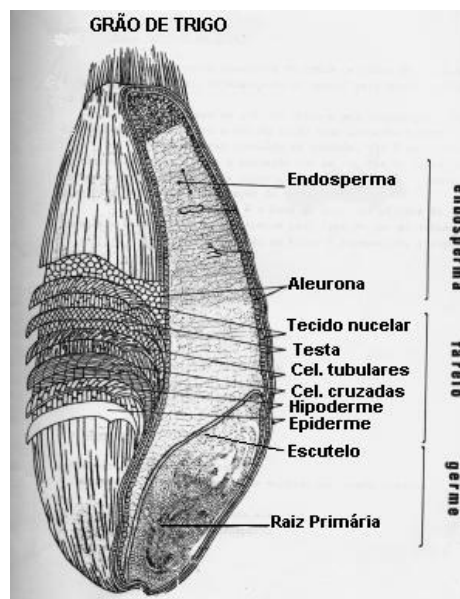


Figura 1 Grão de trigo.

Fonte: Hosney (1991).

O trigo constitui uma fonte de polissacarídeos complexos, sendo a mais abundante e econômica fonte de energia para o homem (SHELTON e LEE, 2000). Dentre os polissacarídeos, o amido é o principal constituinte (GOESAERT et al, 2009), seguido de pentosanas,  $\beta$ -glicanas e fibra dietética total. Apresenta ainda pequenas quantidades de açúcares livres (1-2 %), como glicose, frutose e rafinose. O amido é o polissacarídeo de reserva mais abundante constituinte de muitas plantas (SVIHUS et al, 2005) e seus maiores componentes são polímeros de glicose, denominados de amilose e amilopectina (PARK, BAIK e LIM, 2009).

O teor de umidade é um dos principais fatores que afetam a qualidade e corresponde ao percentual entre a quantidade de água e o peso da massa total de uma quantidade conhecida de grãos (RASPER e WALKER, 2000). Grãos secos e sadios podem ser mantidos sob armazenamento apropriado por muitos anos, mas grãos úmidos podem se deteriorar rapidamente em poucos dias (McKEVITH, 2004).

As proteínas do trigo são divididas em proteínas metabólicas e estruturais ou de reserva (SGARBIERI, 1996). As albuminas e globulinas (proteínas solúveis) representam cerca de 10 a 15 % do total e atuam no desenvolvimento do grão e início da germinação. Sua principal função na dieta é nutricional, pois apresentam balanceada composição em aminoácidos. As proteínas insolúveis (gliadinas e gluteninas) são a principal fonte de aminoácidos para o desenvolvimento do embrião durante a germinação (MUCCILLI et al, 2010; TEDRUS et al, 2001). Durante o desenvolvimento do grão, as proteínas de reserva do trigo são depositadas como “corpos protéicos”, os quais estarão presentes no grão maduro,

perdendo sua estrutura distinta e formando uma matriz contínua dentro das células do endosperma, onde os grânulos de amido também estarão (BORGHT et al, 2005).

Os lipídeos não se encontram distribuídos de maneira homogênea no grão e constituem cerca de 30 % do germe. Os principais ácidos graxos encontrados são o ácido linoléico (C18:2) e em menor quantidade o ácido palmítico (C16:0) e ácido oléico (C18:1) (BELITZ e GROSCH, 1997).

O conteúdo mineral, ou teor de cinzas é um importante critério de qualidade da farinha de trigo. No grão, os minerais estão distribuídos nas camadas externas, como aleurona e pericarpo (GUARIENTI, 1996).

### 3.1.2 Arroz

O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20 % da energia e 15 % da proteína *per capita* necessária ao homem. É um cereal pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Oryza*, possuindo diversas espécies (HOSENEY, 1991).

O arroz se destaca por ser um componente básico presente na dieta da população mundial. Segundo a FAO (2008), já foram identificados 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são origem genética, dimensões e composição do amido quanto ao teor de amilose. Nos países asiáticos, mais de dois bilhões de habitantes têm o arroz e seus derivados como fontes de 60 % a 70 % das calorias ingeridas diariamente.

O cultivo do arroz se adapta a diferentes condições de solo e clima. No Brasil, há condições favoráveis de calor, no entanto, quanto à umidade, varia, havendo lugares que permitem a cultura de sequeiro, outros, a cultura irrigada, como por exemplo, o Rio Grande do Sul (BRASIL, 2008).

A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, iniciou em meados do século XVIII e daquela época até a metade do século XIX, o país foi um grande exportador. A cultura foi introduzida no Brasil pela frota de Pedro Álvares Cabral. Porém, o cultivo do arroz só é relatado após 1530 na capitânia de São Vicente e lavouras comerciais surgiram em Pelotas, RS, no ano de 1904 (BRASIL, 2008).

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70 % da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial (IRGA, 2008).

Na produção mundial de arroz, o Brasil se destaca como o principal produtor entre os países ocidentais. A área plantada com arroz no Brasil apresenta queda de 2,6 % (77 mil hectares) em relação à safra 2009. No Rio Grande do Sul, maior produtor nacional, a redução ocasionada é atribuída às dificuldades de planto em razão do excesso de chuvas. A

produção nacional de arroz na safra 2009/2010 está estimada em 12 mil toneladas, sendo reduzida em 4,5 % em relação à safra anterior (CONAB, 2010).

O arroz é um cereal consumido como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas. O arroz, para ser consumido, deve passar por um processo de beneficiamento, onde o produto principal é arroz polido, destinado ao consumo humano (LE MOS e SOARES, 1999; ZDRAEDEK, 2001).

O grão de arroz (Figura 2) é constituído de casca, película, gérmen e endosperma. O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídios, e representa 2-3 % do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94 % do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos protéicos (JULIANO e BECHTEL, 1985; STORCK, SILVA e FAGUNDES, 2005).

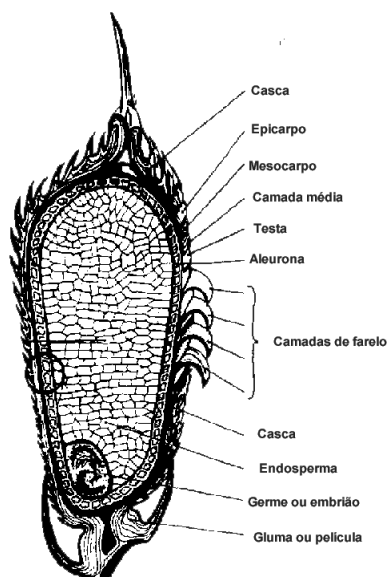


Figura 2 Grão de arroz

Fonte: Hosney (1991).

As proteínas dos grãos de arroz constituem cerca de 8 % do endosperma seco. Elas compõem-se de 5-10 % de prolaminas, 4-10 % de albuminas e globulinas e 80-90 % de glutelinas (CHEN et al, 2010). A proteína solúvel de arroz, com peso de 14 kDa, inibe  $\alpha$ -amilase de insetos e mamíferos (FENG et al, 1991), mas as suas estruturas primárias e as suas relações à alergia de arroz não foram elucidadas (NAKASE et al, 1996). A qualidade da proteína depende de seu conteúdo em aminoácidos, sendo que a lisina é o aminoácido limitante em grãos de arroz, fato similar em outros cereais. Entretanto, entre os cereais, o arroz apresenta uma das maiores concentrações de lisina, resultando em balanço de aminoácidos mais completo (JULIANO e BECHTEL, 1985).

Os carboidratos são os principais constituintes do arroz. Além do amido, que corresponde a aproximadamente 90 % da matéria seca do arroz polido, também estão



presentes açúcares livres e fibras. Enquanto o endosperma é composto principalmente por amido, o farelo e o gérmen apresentam principalmente fibras, contendo pequenas quantidades de outros carboidratos. O arroz apresenta pequena quantidade de açúcares livres, localizados principalmente nas camadas externas do grão, sendo sua concentração afetada pela variedade, grau de polimento e processamento. Os principais açúcares são sacarose (em torno de 90 %), glicose e frutose (MATSUO et al, 1995).

Os lipídios podem ser encontrados organizados em corpos lipídicos na camada de aleurona, no embrião e no endosperma, ou associados a grânulos de amido (LUMEN e CHOW, 1995). Entretanto, a maior concentração ocorre no gérmen (1/3 do conteúdo total) e na camada de aleurona. Os principais ácidos graxos no arroz são os ácidos palmítico (16:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2), correspondendo a aproximadamente 95 % dos ácidos graxos presentes nos lipídios totais (MANO et al, 1999).

A concentração de minerais difere nas frações do grão. Enquanto no arroz com casca o silício é componente dominante, no arroz integral e polido, destacam-se fósforo, potássio e magnésio. Ferro e zinco, dois minerais essenciais para a saúde humana, estão disponíveis em baixas concentrações no grão (JULIANO e BECHTEL, 1985).

O arroz contém vitaminas do complexo B e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), com concentrações insignificantes das vitaminas A, D e C (BELITZ e GROSCH, 1997).

### 3.1.3 Aveia

A aveia é uma gramínea pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Avena* (HOSENEY, 1991). O gênero *Avena* compreende várias espécies silvestres, daninhas e cultivadas. A aveia branca e amarela se destinam a produção de grãos de alta qualidade industrial (FLOSS et al, 1998).

A planta adapta-se melhor em climas frios e úmidos, sendo que os primeiros cultivos parecem ter ocorrido no Norte da Europa, onde se constituiu como alimento básico, e na Ásia Central (MURPHY e HOFFMAN, 1992).

A cultura da aveia é uma alternativa técnica e economicamente viável de cultivo no período de outono/inverno/primavera. Na região sul, os estados de Rio Grande do Sul e Paraná são os responsáveis por grande parte da produção do grão, seguido pela região centro-sul (CONAB, 2010). Destina-se a produção de grãos de elevado valor nutricional, formação de pastagens, e, ainda, como cobertura verde para proteção e melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (FLOSS et al, 1998).

A época de introdução da cultura no Brasil ainda não está precisamente determinada, sendo provável que os espanhóis tenham trazido a *Avena byzantina* para a América, sendo que as espécies branca e amarela chegaram mais tarde (MUNDSTOCK, 1983).

O aumento da área cultivada de aveia pode ser atribuída à necessidade de diversificação na propriedade, aos preços favoráveis do mercado interno, barreiras à importação, disponibilidade de cultivares com potenciais de rendimento superior, ao aumento do consumo humano de alimentos a base de aveia e ao desenvolvimento de bacias leiteiras (PETERSON, 1992).

A estrutura do grão de aveia é semelhante à de outros cereais e possui três partes principais: pericarpo, endosperma e gérmen (Figura 3). O pericarpo é um conjunto de camadas externas, que formam a “casca” propriamente dita do grão. Essa é a região mais rica em minerais (como cálcio, ferro e zinco), vitaminas do complexo B e também fibras. O endosperma é constituído basicamente por amido, apresentando menores teores de proteínas, lipídeos e cinzas em comparação com as frações gérmen, pericarpo e aleurona (BETCHEL e POMERANZ, 1981).

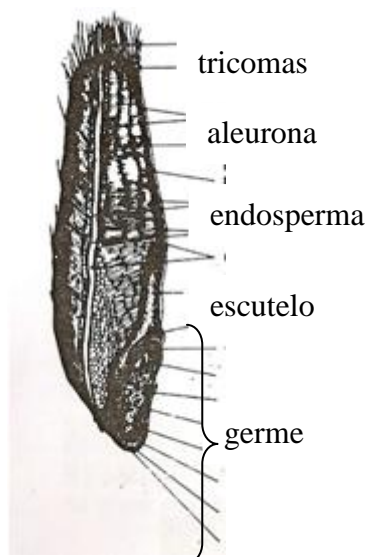


Figura 3 Grão de aveia.

Fonte: Hosenev (1991).

A composição química e estrutural do grão de aveia é única dentre todos os cereais. Destaca-se pelos altos teores de proteína, com perfil de aminoácidos equilibrado e pela alta digestibilidade (BEBER et al, 2002; GUTKOSKI e PEDÓ, 2000).

A aveia é rica em lipídios, os quais são maior fonte de energia que os carboidratos. Segundo Morrison (1978), a porcentagem de lipídios no grão de aveia varia entre 5,0 e 9,0 %, sendo superior às porcentagens encontradas em trigo (2-4 %), arroz (2-3 %), milho (4-6 %), cevada (3-5 %) e centeio (2-4 %). A composição dos lipídios é favorável devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados. Os ácidos palmítico, oléico e linoléico são os mais encontrados, representando em torno de 95 % do total (GUTKOSKI e EL-DASH, 1998).

Em relação ao teor protéico, a aveia também é superior aos demais cereais, sendo 18 % o maior valor encontrado (MORRISON, 1978). As proteínas de aveia são de alta qualidade, apresentando composição aminoacídica de acordo com os padrões exigidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS). Porém, assim como nos demais cereais, o primeiro aminoácido limitante é a lisina, seguido da treonina (PETERSON, 1992).

Entre os carboidratos, o amido é o constituinte em maior abundância na aveia, com teores médios entre 44 % e 61 %. Porém, se comparados a outros cereais como centeio, cevada e trigo, o teor de amido da aveia pode ser considerado baixo, devido à elevada concentração de proteínas, lipídios e fibras (PEDÓ e SGARBIERI, 1997).

A fibra alimentar é caracterizada pelo teor de fibras solúveis, que tem efeito na redução dos níveis de colesterol sérico (SAURA-CALIXTO, PÉREZ-JIMÉNEZ e GÕNI, 2009). Estas características tornam a aveia recomendável para o consumo humano. Tem-se observado também, aumento na produção da aveia destinada ao consumo humano, devido à busca de dietas mais saudáveis e ao surgimento de produtos atrativos e variados utilizando a aveia como base. Isso é possível devido às propriedades ligantes, emulsificantes e espumantes da aveia, tornando-a útil para vários usos industriais (WEBER, GUTKOSKI e ELIAS, 2002).

A fibra alimentar da aveia apresenta propriedades hipocolesterolêmicas e hipoglicêmicas e está presente em altas concentrações no grão. As fibras solúveis, como as (1,3)(1,4)- $\beta$ -glucanas atuam na redução dos níveis de colesterol sanguíneo em indivíduos hipercolesterolêmicos, na absorção de glicose em diabéticos e como agente protetor ao desenvolvimento de tumores de cólon (WOOD, WEIZ e BLACKWELL, 2004).

A aveia é um alimento funcional por excelência, com aparência similar a um alimento convencional, consumida como parte de uma dieta normal e além de sua função nutritiva básica, apresenta propriedades fisiológicas benéficas. A aveia também atende quanto à definição de grão integral por apresentar após o seu processamento o mesmo balanço de nutrientes que é encontrado na matéria-prima original (MARQUART et al, 2000).

### **3.2 Enzimas**

As enzimas são catalisadores protéicos que aumentam a velocidade de uma reação química e não são consumidas durante a reação que catalisam (CHAMPE e HARVEY, 2002). Uma das características fundamentais das enzimas é sua especificidade sobre o substrato, de modo que somente certas substâncias sofrem sua ação e unicamente um tipo de reação ocorre, sem reações colaterais ou produtos derivados. As enzimas atuam sobre

um número muito limitado de compostos e não tem qualquer efeito sobre os outros (REGULY, 2000).

A especificidade das enzimas sobre seus substratos pode ser relativa a um substrato ou a vários ao mesmo tempo. O estudo da especificidade de substrato mostra que essas moléculas refletem a estrutura do sítio ativo da enzima em dois aspectos: o substrato deve ter uma ligação química susceptível que possa ser afetada pela enzima e representar outro aspecto estrutural, necessário para sua ligação ao sítio ativo da enzima, para colocar em posição correta a molécula do substrato na relação geométrica adequada, de modo que a ligação possa ser cataliticamente realizada (LEHNINGER, 1976, CISTERNAS, VARGAS E MONTE, 2001).

O sítio de ligação do substrato de uma enzima é dado por um arranjo tridimensional especial dos aminoácidos de uma determinada região, geralmente complementar à molécula do substrato, e ideal espacial e eletricamente para a ligação do mesmo. Os modelos que procuram explicar a especificidade substrato/enzima são chamados de modelo chave/ fechadura e modelo do ajuste induzido (STRYER, 1979)

A especificidade enzimática pode ser baixa ou muito alta. A primeira é caracterizada pela especificidade em relação a tipos de reação absoluta, que é exclusiva, e a enzima atua somente sobre um determinado composto. Existe ainda a especificidade de grupo, quando a catálise ocorre sobre substratos com uma ligação química específica (KARLSON e PULIDO, 1967).

### 3.2.1 Fatores que influenciam a velocidade das reações enzimáticas

Os fatores que influenciam a velocidade das reações enzimáticas, além da concentração do substrato são pH, temperatura, atividade de água, atividade enzimática e pressão (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

A maioria das enzimas exercem sua ação catalítica dentro de limites estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo, que para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0 e no qual apresenta sua atividade máxima. No entanto, se uma enzima atua em mais de um substrato, os valores de pH ótimo variam. Valores extremos de pH em geral, desnaturam as proteínas, inativando-as (KARLSON e PULIDO, 1967).

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura, isto é, a velocidade da reação duplica com o aumento de 10 °C na temperatura da reação. Nas reações enzimáticas, porém, a velocidade aumenta com a temperatura, até atingir a velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer (CHAMPE e HARVEY, 2002).

### 3.2.2 Inibição enzimática

Qualquer substância que possa diminuir a velocidade de uma reação catalisada por enzimas é denominada inibidor (CHAMPE e HARVEY, 2002). O estudo dos inibidores enzimáticos permite a obtenção de informações quanto ao mecanismo e sequência da catálise enzimática, especificidade pelo substrato, natureza e grupamentos funcionais do sítio ativo e participação de certos grupamentos funcionais na manutenção da conformação ativa da molécula da enzima (LEHNINGER, 1976).

#### 3.2.2.1 Inibição enzimática reversível

Segundo Lehninger (1976) e Palmer (1981), os três tipos principais de inibição enzimática reversível – competitivo, não-competitivo e incompetitivo - podem ser distinguidos pelos efeitos do inibidor sobre a cinética de reação da enzima (Figura 4). Na inibição competitiva, o inibidor pode se combinar com a enzima livre de tal maneira que ele compete com o substrato normal pela ligação ao sítio ativo, reagindo reversivelmente com a enzima para formar o complexo enzima-inibidor.

A inibição incompetitiva caracteriza-se pelo fato de o inibidor não se combinar com a enzima livre nem afetar sua reação com o complexo enzima-substrato para originar um complexo inativo enzima-substrato-inibidor.

O inibidor não-competitivo pode combinar com a enzima livre ou com o complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos; eles ligam-se a um sítio da enzima diferente do sítio ativo, muitas vezes ocasionando a deformação da enzima. Quando o inibidor for competitivo, o que muda nas constantes cinéticas é o valor de  $K_m$  determinado experimentalmente. No caso de inibidores não-competitivos, nunca será atingida a  $V_{máx}$ . Como o inibidor não afeta o sítio ativo como um todo, a afinidade da enzima pelo substrato é mantida e o valor de  $K_m$  não se altera. Com um inibidor misto, a ligação do inibidor não afeta a ligação do substrato e vice-versa. Um gráfico de Lineweaver-Burk de uma enzima mais um inibidor misto fornece retas que formam uma intersecção no quadrante esquerdo do gráfico,  $K_m$  aumenta e  $V_{máx}$  diminui (CAMPBELL E FARRELL, 2007).



Inibição competitiva

Inibição não-competitiva

Inibição incompetitiva

Figura 4 Tipos de inibição enzimática reversível.

### 3.2.2.2 Inibição enzimática irreversível

Os inibidores irreversíveis são aqueles que se ligam às enzimas com alta afinidade e não apresentam um equilíbrio de ligação observado nos inibidores reversíveis. Algumas enzimas sofrem inativação irreversível quando são tratadas com agentes capazes de modificar, através de ligação covalente e permanente, um grupo funcional necessário para a catálise tornando a molécula enzimática inativa. A inibição irreversível é estabelecida lentamente em comparação com a cinética de reação normal da enzima, aumentando de maneira contínua com o tempo, devido à modificação química de uma fração progressiva de moléculas enzimáticas (CHAMPE e HARVEY, 2002; PALMER, 1981)

### 3.2.3 Purificação de proteínas

Recuperar, isolar e purificar proteínas do meio em que foram geradas visa à obtenção de um produto mais estável, mais ativo por unidade de massa e volume, de pureza satisfatória e, por isso, de maior aceitação (REGULY, 2000).

As enzimas, tanto intra como extracelulares, muitas vezes estão associadas intimamente a componentes celulares carboidratados e lipídicos, havendo reconhecimento crescente de que a atividade de certas enzimas requer a presença destes componentes (WANG et al, 1979). A  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* é uma glicoproteína (FOGART e KELLY, 1979; WANG et al, 2008) e nem sempre se obtém a maior atividade com a enzima isolada como proteína pura; e o conceito de pureza aliado à atividade máxima é apenas relativo (IULEK et al, 2000).

Para recuperar proteínas de substratos naturais (tecidos animais ou vegetais), deve ser obtida uma dispersão, solução coloidal, da enzima por meio de extração aquosa, tamponada; ou por meio de extração com solventes menos polares (etanol, isobutanol, acetona) (FIGUEIRA et al, 2003b; MARSARO-JÚNIOR et al, 2005; MOSCA et al, 2008).

A concentração de um extrato enzimático líquido bruto e a purificação são válidos quando é desejado um produto com maior atividade enzimática ou quando a presença de outras proteínas ou produtos metabólicos é prejudicial à atividade enzimática. No primeiro

caso, se promove apenas a concentração do extrato enzimático. No segundo, se isola a enzima de interesse, através de procedimentos de separação em geral, altamente específicos e seletivos para cada caso. A última etapa desta purificação leva à enzima pura (BLANCO-LABRA e ITURBE-CHIÑAS, 1981; CHEN et al, 1998; O'CONNOR e MCGEENEY, 1981; O'DONNELL, FITZGERALD e MCGEENEY, 1977; SHAINKIN e BIRK, 1970; VALENICA-JIMÉNEZ, ARBOLEDA e GROSSI-DE-SÁ, 2007).

Quando se pretende precipitar as enzimas por solventes, é necessário resfriar a temperaturas bastante inferiores a 0 °C e manter a solução enzimática igualmente a frio (2 a 4 °C) a fim de evitar a desnaturação pelo calor gerado pela diluição do solvente (CHEATAN, SREERAMA e MALLESHI, 2008; FIGUEIRA et al, 2003b; MOSCA et al, 2008).

Lulek et al (2000) utilizaram a cromatografia de troca iônica, com coluna CM-celulose para purificar um inibidor de amilase extraído da semente de centeio. Na purificação do inibidor de grãos de arroz. Nakase et al (1996) utilizaram a cromatografia de troca iônica, coluna DEAE-celulose, seguida de HPLC . A eletroforese em gel (SDS-PAGE) foi o método usado para purificar os inibidores extraídos de sementes de trigo, conforme reportado por Beliën et al (2005).

O sistema aquoso- bifásico tornou-se uma importante técnica para a separação e purificação de proteínas. A extração em duas fases tem uma série de vantagens em comparação com métodos tradicionais. A sua operação com menor tensão superficial aliado à capacidade de ampliação de escala e operação contínua torna esse método bastante útil para a obtenção de proteínas puras (CHEN et al, 2008).

Inibidores de  $\alpha$ -amilase foram separados e purificados a partir de várias fontes e caracterizados (CHOU DHURY et al. 1996). Alguns métodos utilizam tratamento térmico, diálise e cromatografia por DEAE-celulose ou CM-celulose. Embora essas técnicas tenham sido bem sucedidas, ainda existem inconvenientes para sua aplicação em larga escala, devido ao alto custo das instalações (CHEN et al, 2008).

### **3.3 Amilases**

As amilases atuam sobre o amido, glicogênio e outros derivados de polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ - 1,4 e  $\alpha$ - 1,6 (PANDEY et al, 2000). A  $\alpha$ - amilase é uma endoglicosidase que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 de amilose e amilopectina, produzindo respectivamente moléculas lineares de diversos comprimentos e uma mistura de moléculas lineares e ramificadas (WHITAKER, 1994). Estas enzimas também desempenham um papel determinante na germinação e maturação de sementes (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005). A germinação da semente é provocada por um aumento na temperatura e umidade. Por conseguinte, o embrião sintetiza o fitohormônio ácido giberélico, que induz novamente a síntese de  $\alpha$ -amilase e outras hidrolases. O amido digerido, que resulta na formação de

açúcar, é posteriormente usado para várias atividades metabólicas (TRIPATHI et al, 2007) e é encontrado em estruturas de armazenamento, como sementes e tubérculos (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

A atividade da  $\alpha$ -amilase se reduz nas regiões altamente ramificadas da amilopectina e pára numa distância de quatro resíduos de glicose do ponto de ramificação (GARRETT e GRISHAM, 1995; McKNIGHT e MAZZIEIRO, 2000). Essa enzima é encontrada em microorganismos, animais e plantas, sendo a principal enzima digestiva de muitas pragas e patógenos que se alimentam de sementes (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Elas são enzimas-chave na absorção do amido, sendo que a sua inibição reduz a digestão deste polissacarídeo (FRED-JAIYESIMI, KIO e RICHARD, 2009). Em plantas, esta enzima degrada o amido durante a germinação da semente (BEN- ELARBI et al, 2009).

Os produtos da hidrólise da  $\alpha$ -amilase, os oligossacarídeos e dextrinas, que podem ser hidrolisados à glicose pela  $\alpha$ -glucosidase intestinal (SHOBANA, SREERAMA e MALLESHI, 2009) são utilizados em diversas atividades metabólicas (BEN- ELARBI et al, 2009). Essas enzimas hidrolisam ligações localizadas nas regiões interiores do substrato e resultam na redução rápida da viscosidade da solução de amido bem como na redução no poder descolorante do iodo (GUPTA et al, 2003).

A presença da atividade de  $\alpha$ -amilase durante a maturação de alguns cereais como cevada, trigo e aveia e a germinação das sementes foi estudada. A enzima corresponde a aproximadamente 30% da proteína total sintetizada durante a germinação (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005) e é encontrada no pericarpo e em menores quantidades nas camadas da aleurona e gérmen (RANI et al, 2001).

As  $\alpha$ -amilases de cereais ocorrem na forma solúvel e a sua extração é simples. O isolamento dessas enzimas é geralmente executado com a utilização de tampões como fosfato de sódio, acetato de sódio e Tris-HCl e também com cloreto de cálcio e água. Os grandes volumes de extratos de enzima podem ser concentrados pela precipitação fracionária que usa sais como sulfato de amônio ou solventes orgânicos como etanol ou acetona (UCHIDA et al, 1998). Este passo precisa ser executado em temperatura baixa para minimizar a inativação da enzima em alta concentração de sal ou solvente orgânico. Diversas amilases de diferentes cereais foram purificadas e caracterizadas pelo uso de métodos convencionais. A barreira principal na purificação de amilases de cereais é a sua ocorrência em múltiplas formas como isoenzimas (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005). A cromatografia de troca iônica é um instrumento da separação da proteína com base na carga. A matriz de DEAE-celulose foi usada para purificar a maior parte das amilases de cereais. A afinidade cromatográfica é um dos melhores instrumentos da purificação seletiva de enzimas (MITCHEL et al, 2008).



As exoamilases, também conhecidas como enzimas sacarificantes, hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em amilose, amilopectina e glicogênio pela retirada sucessiva de maltose/glicose. Os produtos da hidrólise têm a configuração  $\beta$  no C1 da unidade de glicose de redução devido à inversão do produto. Em contraste com a ação de endoamilases, as  $\beta$ -amilases proporcionam uma redução lenta na viscosidade e do poder descolorante do iodo. Cereais e  $\beta$ -amilases bacterianas e glicoamilases fúngicas compõem essa categoria, que atacam as moléculas de amido em suas extremidades não redutoras (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

### 3.3.1 Características e mecanismo de ação das amilases

As  $\alpha$ -amilases são amplamente distribuídas em animais, bactérias e fungos (LÉVÊQUE et al, 2000; ODIBO e ULBRICH-HOFMANN, 2001). Em humanos, as  $\alpha$ -amilases da saliva e do pâncreas têm a função de transformar o amido ingerido em moléculas menores de oligossacarídeos (McKNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

A faixa de pH ótima para atuação das  $\alpha$ -amilases varia entre 4,6 e 9,2, de acordo com a fonte, método de ensaio e temperatura de incubação. As amilases fúngicas atuam em pH mais baixo do que as bacterianas (GUPTA et al, 2003). As  $\alpha$ -amilases dos cereais *in natura* tem atividade máxima entre 4,7 e 5,4. A temperatura ótima das amilases fica entre 15 °C e 40 °C (KEARSLEY E DZIEDIC, 1995).

A enzima contém um grupo carboxílico e um grupo imidazol no sítio ativo. O substrato forma um complexo com a enzima, que coloca a ligação glicosídica do substrato em justaposição com o ânion carboxila e grupamento imidazol (WHITAKER, 1994).

A maioria das  $\alpha$ -amilases responde da mesma forma à presença de íons, ora ativando ou inibindo sua atividade. Em geral, são atribuídas funções de ativadores para os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), bário ( $\text{Ba}^{2+}$ ), manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), prata ( $\text{Ag}^+$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ). De forma inversa, são atribuídas funções de inibidores para íons mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), prata ( $\text{Ag}^+$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), chumbo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), rubídio ( $\text{Rb}^{2+}$ ), bário ( $\text{Ba}^{2+}$ ), e ferro ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ). Pode-se observar a repetição de certos íons citados como ativadores ou inibidores e isso acontece em função da variedade de  $\alpha$ -amilases disponíveis (KEARSLEY e DZIEDIC, 1995; SABORNI e KARBASSI, 2001).

### 3.3.2 Inibidores de amilases em plantas

Os inibidores enzimáticos em cereais podem ser proteínas simples, como os inibidores de proteases, que possuem uma pequena molécula de açúcar redutor, enquanto que o inibidor de alfa-amilase isolado de várias sementes consiste de glicoproteínas com 15 % de carboidratos em sua estrutura (BARBIERI, BATELLI e STIRPE, 1995; RICHARDSON, 1980).

Uma característica comum que algumas proteases e inibidores de alfa-amilase apresentam é a resistência a desnaturação pelo calor (OLIVEIRA, XAVIER-FILHO e SALES, 2003). A proteína inibidora de alfa-amilase é encontrada na quantidade de 1% na farinha de trigo e por sua relativa termoestabilidade, ela pode resistir na forma ativa durante o processamento de pães. A adição de alguns inibidores para o amido cru enriquecido em dietas de ratos levou a um grande decréscimo no aproveitamento do amido, mas outros trabalhos sobre inibidores mencionam que os efeitos na digestão do amido cozido foram comparáveis com os do amido cru, possivelmente pela alta afinidade com a alfa-amilase do amido gelatinizado. Os inibidores de alfa-amilase nativos isolados de albumina de trigo não apresentaram efeito no crescimento de ratos e de crianças pequenas, mas quando os inibidores foram purificados e colocados em microgrânulos de celulose revestida resistiram à ação da pepsina na digestão (RICHARDSON, 1980).

As plantas sofrem constantemente agressões de pragas e patógenos, responsáveis por grandes perdas na agricultura, pois, além de causarem doenças e injúrias, se alimentam dos tecidos da planta. As plantas, ao longo do processo evolutivo, desenvolveram diferentes mecanismos de defesa que incluem barreiras químicas e físicas. Dentre elas, estão a indução de proteínas de defesa, a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos, a síntese de metabólitos secundários e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules (HARUTA et al, 2001).

Uma classe de substâncias que está intimamente relacionada a defesa das plantas, é a dos inibidores de amilases. Esses inibidores funcionam como substratos específicos das amilases digestivas dos insetos (FIGUEIRA et al, 2003b) ou micro-organismos (FERNANDES et al, 2007), causando uma deficiência em aminoácidos, que influencia no crescimento e desenvolvimento dos mesmos, podendo causar a morte. Isto porque a inibição das amilases digestivas ou a produção maciça dessas enzimas para compensar a sua não atuação fica reduzida, diminuindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (FENG et al, 1996). Os inibidores representam de 5 a 15 % do total de proteínas das sementes (JONGSMA et al, 1995; POMPERMAYER et al, 2001).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase ocorrem em muitas plantas como parte dos mecanismos de defesa naturais. Eles são abundantes em cereais (BERI e GRUPTA, 2007; FENG et al, 1996; FRANCO et al, 2002; IULEK et al, 2000) e legumes (GROSSI-DE-SA et al, 1997; ISHIMOTO et al, 1996; LAJOLO e FINARDI-FILHO, 1984). A pesquisa sobre inibidores de  $\alpha$ -amilase vem sendo realizada considerando vários aspectos da saúde humana, como o diagnóstico de desordens de hiperamilasemia pancreática (KANDRA et al, 2005), controle de diabetes e obesidade (CHEN et al, 2008), além de aspectos nutritivos e toxicológicos da alimentação. Além do mais, inibidores de  $\alpha$ -amilase são instrumentos potencialmente

importantes como resistência natural das plantas e projetada para evitar a contaminação dos cereais por espécies fúngicas (VALENCIA-JIMENEZ, ARBOLEDA e GROSSI-DE-SÁ, 2008).

As plantas desenvolveram mecanismos contra a amilase endógena tais como o aumento da atividade de inibidores nos tecidos, a síntese de um grande número de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas, a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteinases (GÓMEZ-LEYVA e BLANCO-LABRA, 2001), o aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de iso-inibidores (HUANG e TIETZ, 1982), a expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas do patógeno (OLIVA, IULEK e IDA, 1996; SVENSSON 1994) e a síntese de inibidores resistentes e ativos sob as várias condições de pH do trato intestinal do inseto ou micro-organismo (CHEN et al, 2008; CHRISTELLER et al, 1998). Alguns artigos descrevem inibidores de  $\alpha$ -amilases de plantas para a redução da ocorrência de insetos predadores, incluindo aspectos da proteção transgênica, enquanto que outros relatam a ocorrência, propriedades químicas e mecanismos de reação de micro-organismos e plantas inibidoras de  $\alpha$ -amilases (SVENSSON et al, 2004).

Uma das preocupações com o uso de plantas geneticamente modificadas pela inserção de inibidores é o impacto potencial sobre organismos não-alvo, visto que, apesar destes inibidores apresentarem certa especificidade às amilases digestivas das espécies alvo, ainda são pouco conhecidas as interações destes no trato digestivo dos outros organismos associados (DONEGAN 1997).

As enzimas liberadas por fungos fitopatogênicos são inibidas por um número de plantas e de enzimas específicas que ocorrem em sementes (SIVAKUMAR et al, 2006), além de degradar a enzima endopoligalacturonase, a qual acredita-se ser de fundamental importância no efeito patogênico causado por fungos (RICHARDSON, 1980).

Foi reportado que inibidores de alfa-amilase ocorrem na gliadina de sementes de trigo, indicando que elas podem ser responsáveis pela sensibilidade à farinha de trigo observada em pacientes que sofram de doença celíaca. Um dos sintomas que ocorre é uma incapacidade do organismo em metabolizar amido resultando em uma diminuição da produção de alfa-amilase pelo pâncreas, sendo uma lesão primária. Alguns trabalhos também mostraram que os inibidores de alfa-amilase normalmente ocorrem na fração de albumina no trigo quando são extraídas de farinha ou glúten comercial com solventes (70% etanol, ácido diluído) que são consideradas típicas da porção gliadina (RICHARDSON, 1980).

As endoxilanasas encontradas em grãos de trigo estão associadas, em grande escala, à presença de micro-organismos situados na camada exterior do grão (DORNEZ et al, 2008). Xilanasas são  $\beta$ -glucanases capazes de catalisar a hidrólise do xilano e devido à

sua estrutura heterogênea demandam complexo xilanolítico para sua total degradação e não apenas uma enzima. Endoxilanasas, os maiores componentes do sistema xilanolítico de micro-organismos, têm sua ação facilitada por enzimas que removem as ramificações da cadeia do xilano (KRONBAUER et al, 2007). Endoxilanasas de microorganismos patogênicos como *Fusarium graminearum* (BELIËN et al, 2005) e *Botrytis cinerea* (BRUTUS et al, 2005), por exemplo, foram inativados pelos inibidores de endoxilanasase do trigo.

### 3.4 Fungos

Fungos são micro-organismos aeróbios, altamente disseminados no meio ambiente, podendo ser encontrados no solo, água e ar. Todos os fungos são heterotróficos, ou seja, precisam de compostos orgânicos como fonte de energia e carbono. Estes micro-organismos são saprófitas e atuam decompondo a matéria orgânica, auxiliando a fertilização do solo. Devido a sua grande versatilidade, podem crescer em substratos de composição variada, onde talvez, outros micro-organismos não mostrassem crescimento (PUTZKE e PUTZKE, 2002; TANAWAKI e SILVA, 1996). Os fungos podem causar efeitos indesejáveis para a agricultura e indústria de alimentos. Embora possam ser inativados ou retirados durante o processamento e estar ausente no produto manufaturado, as toxinas permanecem estáveis (MOSS, 1992).

A morfologia dos fungos, sua forma e estrutura, são determinadas mediante observação macroscópica e microscópica. O corpo dos fungos está formado por uma massa de filamentos ramificados e entrelaçados, chamados hifas, cujo conjunto é denominado micélio. A partir de um micélio transportado podem originar-se novos indivíduos que se reproduzem por meio de esporos assexuados ou sexuados em algumas espécies (GRIFFIN, 1994; RAVEN et al, 1996).

Fisiologicamente, os fungos se adaptam a sobrecargas mais severas que a maioria dos micro-organismos, podendo crescer em substrato com alta concentração de açúcar, uma vez que são pouco sensíveis a altas pressões osmóticas; toleram pHs entre 3,0 a 8,0, enquanto o pH ótimo para a maioria das espécies é em torno de 5,6. Também podem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura além da faixa ótima entre 22 °C a 30 °C. Há espécies que se desenvolvem entre 35 °C e 37 °C, ou em temperaturas superiores e outros ditos psicrófilos, crescendo em temperaturas de refrigeração (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; PUTZKE e PUTZKE, 2002).

A pesquisa com inibidores enzimáticos leva em conta como essas substâncias são capazes de ocasionar a degradação dos cereais, tanto no campo quanto ao longo do armazenamento. As pesquisas ao longo do tempo vêm demonstrando que os gêneros de fungos que ocasionam as maiores contaminações em cereais são *Aspergillus* e *Fusarium* (DIKBAS et al, 2008; FIGUEIRA et al, 2003b).

### 3.4.1 Gênero *Aspergillus*

Os fungos deste gênero são classificados como ascomicetos, a classe mais numerosa do reino *Fungi*. Suas hifas são septadas, seus septos ou paredes transversais são perfurados por um poro central, por onde o citoplasma e o núcleo podem passar facilmente. Sua reprodução é realizada por meio de esporos, tanto na fase assexuada quanto na sexuada. Na forma assexuada, os esporos especializados (conídios) formam-se nas extremidades das hifas especializadas e denominam-se conidióforos. Os esporos, ao entrarem em contato com o meio, germinam e originam novos micélios. Foram identificados em torno de 200 espécies de *Aspergillus* na natureza, isoladas de frutas, vegetais e outros substratos, especialmente os ricos em carboidratos (PUTZKE e PUTZKE, 2004; RAVEN et al, 1996).

Os *Aspergillus* são membros ubíquos da microflora do ar e, por isso, são encontrados freqüentemente como contaminantes dos meios de cultivo. Estes fungos crescem em altas concentrações de açúcar e sal, indicando que são capazes de extrair água de substâncias relativamente secas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; WAINWRIGHT, 1995).

Espécies deste gênero são economicamente importantes, pois são utilizadas em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico pelo *Aspergillus niger*, que também é citado como o microrganismo mais usado para enriquecimento protéico de substratos. No Japão, *Aspergillus wentii* é utilizado para produção de alimentos fermentados (HAQ, ALI e IQBAL, 2003; WAINWRIGHT, 1995).

Quanto a produção de enzimas, *Aspergillus oryzae* vem sendo utilizado principalmente para a produção de  $\alpha$ -amilase, mas também de outras enzimas, como poligalacturonase e polimetilgalacturonase (NEMEC, JERNEJC e CIMERMAN, 1997).

### 3.4.2 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* sp. é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável. Apresenta macroconídeas fusiformes, com vários septos (LEAL et al, 2005).

Apesar de intensas pesquisas, esforços para controlar e prevenir infecções fúngicas, em especial por *Fusarium*, em vegetais e animais, não tem adquirido êxito. O *Fusarium* causa danos a plantações e prejuízos que geram perdas de bilhões de dólares no mundo. Além disso, a ingestão de alimentos que contenham micotoxinas produzidas por este fungo pode causar grandes prejuízos para a saúde humana e animal (DOYLE, 1997).

As espécies de *Fusarium*, que são conhecidas como fitopatógenos, são saprófitas do solo com distribuição mundial. O registro de incidência de infecções humanas por *Fusarium* tem aumentado na medicina contemporânea. O *Fusarium* sp., destaca-se não só pela sua agressividade, mas por levar ao óbito a maioria dos pacientes com infecção disseminada. As lesões provocadas por *Fusarium* nos seres humanos podem ser locais ou sistêmicas. As primeiras ocorrem principalmente em decorrência de lesões traumáticas ou infecções secundárias a queimaduras (HENNEQUIN et al, 1999).

O *Fusarium* e suas micotoxinas, em especial fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona são detectados com grande frequência em grãos que servem de preparo para ração destinada ao consumo animal. Tanto em plantações quanto nos animais que se alimentam de tais grãos, os efeitos dos fungos são graves, levando a um prejuízo econômico e problemas de saúde (LEAL et al, 2005). Alguns trabalhos indicaram que a principal espécie fúngica encontrada em trigo foi o *Fusarium graminearum*, que produziu maiores quantidades da micotoxina DON (BADIALE-FURLONG et al, 1995; FERNANDEZ – PINTO et al, 2008; GONZÁLES et al, 1996).

Com o intuito de melhorar a resistência das plantações ao *Fusarium* e suas micotoxinas, vários programas estão desenvolvendo variedades de espécies de plantas que tenham resistência ao fungo por melhoramento genético. Também tem sido estudadas espécies de micro-organismos que tenham antagonismo competitivo pelo *Fusarium* (LEAL et al, 2005).

### 3.4.3 Contaminação dos alimentos por fungos

Apesar das utilidades e benefícios do emprego de fungos, em processos industriais diversos, quando estes contaminam os produtos alimentícios podem representar perigo à saúde pública, pois além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alterarem as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (MENEZES, 1992).

As principais espécies fúngicas encontradas nos alimentos são os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Enquanto as espécies de *Fusarium* são patógenas para as plantas antes ou imediatamente após a colheita, produzindo micotoxinas; espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontradas como contaminantes de equipamentos e alimentos durante a secagem e estocagem (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Intoxicações e problemas passageiros ou crônicos, que afetam várias funções do organismo, tais como: alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo podem ocorrer em homens e animais devido à ingestão destas substâncias (VECHIA e CASTILHOS-FORTES, 2007).

A quantificação do crescimento fúngico é bastante complexa, considerando que os fungos crescem como hifas e não como células simples, o micélio pode penetrar nos substratos sólidos e as colônias tendem a se espalhar tornando difícil a quantificação em placas. Muitos autores destacam o fato de que os aspectos relacionados à deterioração de matérias-primas e produtos e a produção de toxinas justificam a necessidade de detectar, quantificar e identificar fungos em alimentos para garantir a qualidade e diminuir o risco de deterioração ou de produção de toxinas fúngicas (TANAWAKI, IAMANAKA e BANHE, 1999; ZAO et al, 2010).

### **CAPÍTULO III**



**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA FRAÇÃO PROTÉICA DE VARIEDADES DE  
ARROZ, AVEIA E TRIGO CULTIVADOS NO RS**

## RESUMO

O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização físico-química e da fração protéica em cultivares de aveia, arroz e trigo cultivados no Rio Grande do Sul, visando correlacioná-las com a presença de inibidores enzimáticos e resistência a contaminação fúngica. Amostras de grãos de aveia, trigo e arroz foram moídas, peneiradas e caracterizadas físico-quimicamente segundo AOAC (2000). Foram avaliadas também a digestibilidade *in vitro* e metionina disponível por método enzimático, a solubilidade das proteínas em sistema aquoso e atividade enzimática das hidrolases. Comparando-se os cereais, a aveia apresentou maior teor lipídico e protéico, enquanto que o trigo apresentou maior quantidade de fibra bruta. As frações albumina e globulina tiveram nas variedades de trigo Safira, Ônix e Pampeano valores de 52 %, 57 % e 45 % do total de proteína bruta. O maior conteúdo de glutelina no arroz foi verificado na cultivar com maior teor de proteína bruta (BR 424). A cultivar de arroz BR 424, que teve a maior digestibilidade (92 %) apresentou baixo teor de metionina disponível (89 mg g proteína<sup>-1</sup>), enquanto que a aveia UPFA 20 Teixeira, com a maior metionina (165 mg g proteína<sup>-1</sup>), apresentou menor digestibilidade (53 %). As três variedades de trigo apresentaram maior atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase do que as amostras de aveia e arroz.

**Palavras-chave:** cereais, solubilidade, digestibilidade, atividade enzimática.

## ABSTRACT

The objective of this work was physicochemical characterization and evaluation of the proteic fraction in different species of oat, rice and wheat, all widely cultivated in Rio Grande do Sul, in order to estimate enzymatic inhibitors presence and resistance to fungi contamination. Samples of oat, wheat and rice were milled, homogeneous and then its physicochemical properties were analyzed according to AOAC (2000) method. Variables also evaluated were, *in vitro* digestibility and metionine, both trough ezimatic method. Solubility in water and hydrolases enzymatic activity were also quantified. Comparing all cereals samples, oat presented a larger portion of both lipids and protein, meanwhile, wheat brut fiber fraction was the biggest among the samples. Albumine and globuline fractions in the wheat varieties Safira, Ônix and Pampeano were 52%, 57% e 45% respectively from the brut protein total. The rice sample with the most glutenine was verified in the one who had the largest percentage of brut protein. The varieties of rice which presented the highest digestibility offered the smallest level of available metionine, for that reason, wheat UPFA 20, who had the biggest amount of metionine, presented small digestibility. All three species of wheat presented  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase activity larger than the ones offered by rice and oat samples.

**Key-words:** cereals, solubility, digestibility, enzymatic activity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os cereais são matérias-primas de elevada importância na alimentação, sendo utilizados como fonte de proteína e suplemento de energia, contribuindo com cerca de 20% na ingestão protéica diária (McKEVITH, 2004). As culturas de arroz e trigo se destacam, representando mais de 50 % da produção gaúcha e mundial de cereais (CONAB, 2009); enquanto o consumo de aveia e derivados vem sendo cada vez mais impulsionado pelas suas propriedades nutricionais (GUTKOSKI e PEDÓ, 2000).

O arroz, trigo e aveia apresentam algumas semelhanças estruturais, todos são constituídos por um embrião, que contém o material genético para a formação de uma nova planta e um endosperma, rico em amido para manter a nova planta até que esta possa obter seus próprios nutrientes (McKEVITH, 2004). A composição química e as propriedades tecnológicas dos grãos variam dependendo das condições a qual ele foi submetido como ambiente, solo e outras variáveis (GOESAERT et al, 2009). Dentre outros mecanismos, estes cereais possuem inibidores enzimáticos de amilases que conferem resistência a contaminação fúngica e a germinação precoce dos grãos (FIGUEIRA et al, 2003).

O uso de proteínas vegetais decorre de suas propriedades funcionais, que propiciam uma forma versátil de satisfazer as necessidades protéicas do ser humano (RANGEL et al, 2004). Porém, o alto teor de fibras insolúveis, juntamente com a elevada concentração de fatores antinutricionais na dieta são responsáveis pela baixa digestibilidade apresentada por algumas espécies ou porções de cereais (GILANI, COCKELL e SEPEHR, 2005).

As proteínas de reserva dos cereais tem seu aproveitamento influenciado por sua solubilidade em função da qual também são classificadas em prolaminas e glutelinas, globulinas e albuminas (MACKINTOSH et al, 2009). De acordo com Osborne (1924), as albuminas são solúveis em água, as globulinas em soluções salinas, as prolaminas em soluções de álcool/ água e as glutelinas solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas.

O valor nutritivo de uma proteína depende da digestibilidade e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e não apenas da sua composição, nas quantidades e proporções adequadas para atender às necessidades do organismo (SGARBIERI, 1996). Aminoácidos sulfurados, como a metionina, são importantes na alimentação humana e animal, cuja fração aproveitável por humanos e animais é denominada “metionina disponível” (WILSON e WALTER, 2000). Esta se caracteriza por possuir na cadeia lateral o grupamento  $SCH_3$  na forma nativa, que determina o valor nutricional deste aminoácido (CHAMPE e HARVEY, 2002).

O arroz embora esteja entre os cereais com o menor conteúdo protéico, apresenta elevado valor nutricional. As proteínas do endosperma consistem em várias frações,

compreendendo 15 % de albumina e globulina, 5 a 8 % de prolamina e o restante de glutelina (TANG et al, 2002). A aveia possui cerca de 18% de proteínas, sendo o maior valor encontrado entre os cereais, onde a globulina corresponde entre 46 a 50 % do total de proteínas (PETERSON e SMITH, 1976). As proteínas do trigo são constituídas de 15 % de albuminas e globulinas e 85 % de gliadinas e gluteninas (CARREIRA et al, 2009).

As enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase atuam sobre o amido, glicogênio e outros derivados de polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ - 1,4 e  $\alpha$ - 1,6 e a protease quebra ligações peptídicas entre aminoácidos das proteínas (FERNANDES et al, 2007). A atividade de  $\alpha$  -amilase durante a maturação do trigo e da aveia corresponde a aproximadamente 30 % da proteína total e a enzima sintetizada durante a germinação e é encontrada no pericarpo e em menores quantidades nas camadas da aleurona e gérmen (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

Em função de todas essas características, os cereais além de fonte de nutrientes para humanos e animais de criação, podem ser contaminados por fungos ainda no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (CALDAS, SILVA e OLIVEIRA, 2002). Boas práticas de armazenagem, processamento adequado e proteção contra contaminantes são alternativas bastante discutidas para garantir a segurança alimentar sob o aspecto quali e quantitativo (SCHRÖDTER, 2004).

A partir dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e da fração protéica em cultivares de aveia, arroz e trigo mais amplamente cultivados no Rio Grande do Sul, visando correlacioná-las com a presença de inibidores enzimáticos e resistência a contaminação fúngica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

Amostras de grãos de aveia descascada (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e arroz descascado (*Oryza sativa* L.) foram fornecidas pela Universidade de Passo Fundo, OR Melhoramento de Sementes e Instituto Rio-Grandense do Arroz, respectivamente. Todos os grãos foram moídos em moinho de facas, peneirados à granulometria de 42 mesh e analisados no Laboratório de Ciência de Alimentos (LCA) da Universidade Federal do Rio Grande.

## 2.2 Composição centesimal

O teor de umidade foi determinado empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105 °C, de acordo com o método nº 935.29 da Association of Official Analytical Chemists International – AOAC (2000).

Os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo com o método 920.85 e a determinação de cinzas por método gravimétrico, através de incineração das amostras em mufla a 550 °C; método nº 923.03; conforme AOAC (2000).

Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl, nº 920.87 e o teor de fibra bruta segundo o método 991.43, ambos da AOAC (2000).

Os carboidratos foram estimados por diferença, diminuindo-se de 100 o somatório de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

## 2.3 Solubilidade das proteínas

A quantificação das frações protéicas separadas pela solubilidade foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Varian Cary 100 a 660 nm e comparadas com a curva padrão de solução de albumina de soro bovino (0,3 a 2,5 mg mL<sup>-1</sup>).

Para a extração seqüencial das proteínas, 10 g de amostra foram pesadas e colocadas em contato com 10 mL de água destilada. Após agitação em mesa orbital (180 rpm) a 25 °C durante 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 2240 G durante 20 minutos e o sobrenadante coletado, repetindo-se o procedimento para a obtenção da fração albumina. Ao resíduo da extração anterior foram adicionados 10 mL de NaCl 1% para a obtenção da fração globulina, de forma semelhante ao descrito anteriormente. O mesmo ocorreu para as extrações de prolamina e glutelina, utilizando etanol 70% e NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>), respectivamente (OSBORNE, 1924). Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

## 2.4 Digestibilidade da proteína *in vitro* e metionina disponível

A digestibilidade da proteína *in vitro* e o conteúdo de metionina disponível foram determinados em quaduplicata, empregando hidrólise enzimática com pepsina e pancreatina (SGARBIERI, 1996). O método utilizou 1g de amostra seca, que foi hidrolisada com 10 mL de solução de pepsina (atividade específica de 4,29 mg min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) por 3 horas em agitador orbital na temperatura de 37 °C. O pH foi elevado a 7,0 com aproximadamente 10 mL de NaOH 0,1N e a amostra centrifugada a 2240 G durante 20 minutos. No precipitado foram adicionados 10 mL de solução de pancreatina (308 mg min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) e colocado em agitador horizontal a temperatura de 37 °C para hidrólise durante 24 horas. A amostra foi centrifugada a 2240 G durante 20 minutos e o sobrenadante armazenado. As

alíquotas de sobrenadante digerido com pepsina e pancreatina foram reunidas e a digestibilidade determinada através do método de Folin-Ciocalteu, utilizando curva padrão de tirosina (25 à 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A quantificação da metionina disponível empregou a reação colorimétrica dos hidrolisados com nitroprussiato de sódio 2,5% e leitura em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando uma curva padrão de metionina (12 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (BADIALE, 1979).

## 2.5 Atividade enzimática

O extrato enzimático bruto (0,5 g) foi extraído com 50 mL de NaCl 0,5 %, agitado em mesa orbital por 90 minutos na temperatura de 30 °C, centrifugado a 2240 G durante 10 minutos, filtrado e o sobrenadante armazenado a 5 °C até o momento do uso.

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada pela degradação do amido estimada quantitativamente pelo método iodométrico (BARAJ, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2010). No trigo o isolamento dessa enzima foi feito com a utilização de tampão fosfato de sódio com KCl pH 6 e nas amostras de aveia e arroz com tampão citrato com KCl pH 7. O tampão já citado para cada cereal foi incubado com amido solúvel 1 % (p/v) e 0,5 mL de extrato bruto durante 5 minutos a 50 °C para o equilíbrio térmico. A reação de hidrólise do amido foi interrompida com ácido clorídrico (1 M), seguido por adição de solução de iodo (0,3 % de  $\text{I}_2$  em solução KI 3%) e água destilada. Após 15 minutos, o complexo formado teve sua absorvância determinada em espectrofotômetro (Varian Cary 100) a 620 nm. A atividade específica (UA) foi estimada pela equação 1.

$$\text{UA } \alpha\text{-amilase} = \frac{\text{concentração inicial de amido} - \text{concentração final de amido}}{\text{min.mg proteína}} \quad (\text{Eq.1})$$

A  $\beta$ -amilase teve sua ação determinada pela liberação de maltose quantificada pelo método colorimétrico do ácido 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS). Em tubo de ensaio foram adicionados solução de amido solúvel 0,4 % (p/v) e extrato bruto para incubação durante 5 minutos a 60 °C. Após esse período, a solução de 3,5 DNS foi acrescentada à mistura e colocada em ebulição durante 5 min, resfriada e realizada a leitura a 546 nm. A atividade específica (UA) foi estimada pela equação 2.

$$\text{UA } \beta\text{-amilase} = \frac{\text{mg maltose liberada}}{\text{min.mg proteína}} \quad (\text{Eq.2})$$

A atividade das proteases foi determinada empregando albumina como substrato, medindo aminoácido livre, tendo tirosina como indicativo de hidrólise. Para a reação, foram adicionados albumina 0,5 %, extrato bruto e ácido tricloroacético (TCA) 10 % (p/v) durante

20 min a 47 °C em mesa orbital. A seguir, a mistura foi centrifugada a 2240 G durante 5 minutos, recolhendo-se uma alíquota do sobrenadante, acrescentando hidróxido de sódio (NaOH) 1N e reagente de Folin Ciocalteau. Após repouso por 10 min, a absorbância do cromóforo foi feita no comprimento de onda de 660 nm e a atividade específica (UA) estimada conforme a equação 3.

$$\text{UA protease} = \frac{\text{mg tirosina}}{\text{min.mg proteína}} \quad (\text{Eq.3})$$

## 2.6 Análise estatística

Os resultados da composição centesimal, digestibilidade, teor de metionina disponível e solubilidade protéica das variedades de arroz, aveia e trigo foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Composição centesimal

A composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, manejo, processamento e armazenagem, produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas. Além disso, os nutrientes podem não estar distribuídos uniformemente pelo grão (ZHOU et al, 2002).

A Tabela 1 apresenta os resultados das médias das determinações de composição centesimal nas cultivares de arroz, aveia e trigo. Os valores médios dos teores de cada variável analisada foram expressos em % (g/100g) de amostra em base úmida, comparados estatisticamente entre as variedades da mesma espécie e entre os diferentes cereais.

A cultivar de arroz IRGA 417 apresentou as menores porcentagens de lipídios, cinzas e fibras, com valores de 0,4; 0,3; e 0,1 %, respectivamente. Porém, o teor de proteínas foi superior (7,5 %), quando comparado com IRGA 410 e IRGA 424.

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as cultivares de aveia para as frações de umidade, lipídios e cinzas. A cultivar UPFA Pampa apresentou o maior valor de proteína, 14 %, sendo estatisticamente superior as demais. Em relação ao teor de fibras, esta cultivar apresentou valor de 0,7 %, seguido de UPFA 22 Temprana (0,5 %) e UPFA 20 Teixeira (0,3 %).

O teor de umidade, cinzas e proteínas nas amostras de trigo não diferiram entre si. A cultivar Pampeano possui um teor de fibras superior as demais, com valor de 3,8 %; sendo que o teor lipídico (2,4 %) foi maior que o encontrado na cultivar Safira (1,1 %) e estatisticamente igual ao presente no trigo Ônix (2,1 %).



Os teores médios de umidade em arroz, aveia e trigo encontram-se em torno de 12,3 14,4 e 12,1 %, respectivamente. De acordo com a Instrução Normativa nº 8, de 02 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005) o teor máximo de umidade para grãos deve estar em torno de 15 % e pode ser influenciado principalmente pelo processo de secagem, acondicionamento e armazenagem (ELIAS, 2000). Cabe enfatizar que a umidade é um importante aspecto para a conservação da qualidade do alimento, uma vez que pode influenciar diretamente a composição química e o desenvolvimento de micro-organismos (SILVA, ASCHERI e PEREIRA, 2007).

Tabela 1 Composição centesimal dos grãos integrais de aveia, arroz e trigo (g 100g<sup>-1</sup>)

Cultivar	Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Fibras	Carboidratos <sup>1</sup>
<b>Arroz</b>						
410	14,2 a <sup>A</sup>	3,6 a <sup>B</sup>	2,7 a <sup>A</sup>	5,7 c <sup>D</sup>	0,8 a <sup>B,C</sup>	73
417	14,3 a <sup>A</sup>	0,4 b <sup>E</sup>	0,3 b <sup>D</sup>	7,5 a <sup>C</sup>	0,1 b <sup>C</sup>	77,4
424	14,8 a <sup>A</sup>	4,0 a <sup>B</sup>	2,7 a <sup>A</sup>	4,7 b <sup>D</sup>	0,7 a <sup>C</sup>	73,1
<b>Aveia</b>						
Pampa	10,9 a <sup>A</sup>	5,4 a <sup>A</sup>	2,2 a <sup>A,B</sup>	14,0 a <sup>A</sup>	0,7 a <sup>C</sup>	66,8
Teixeirinha	11,4 a <sup>A</sup>	5,6 a <sup>A</sup>	1,7 a <sup>B,C</sup>	10,4 b <sup>B</sup>	0,3 b <sup>C</sup>	70,6
Temprana	14,4 a <sup>A</sup>	5,7 a <sup>A</sup>	1,7 a <sup>B,C</sup>	4,8 c <sup>D</sup>	0,5 a <sup>C</sup>	72,9
<b>Trigo</b>						
Safira	11,8 a <sup>A</sup>	1,1 b <sup>E</sup>	1,5 a <sup>C</sup>	6,1 a <sup>C,D</sup>	0,1 c <sup>C</sup>	79,4
Ônix	12,2 a <sup>A</sup>	2,1 a <sup>C,D</sup>	1,6 a <sup>B,C</sup>	6,5 a <sup>C,D</sup>	1,6 b <sup>B</sup>	76
Pampeano	12,4 a <sup>A</sup>	2,4 a <sup>C</sup>	1,7 a <sup>B,C</sup>	7,5 a <sup>C</sup>	3,8 a <sup>A</sup>	72,2

Resultados representam a média de três determinações. Letras minúsculas diferem estatisticamente entre as cultivares do mesmo cereal e letras maiúsculas entre todos os cereais. Carboidratos estimados por diferença. <sup>1</sup> Estimados por diferença.

Dentre todos os cereais, observou-se que o percentual de lipídios foi superior nas amostras de aveia, com valor médio de 5,6 %, em relação aos demais. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Simioni et al (2007a) que encontraram valor de 5,4 % para a cultivar de aveia com casca da variedade UPFA 20 Teixeira, após 30 dias de armazenamento e umidade final de 11 %, enquanto que na amostra descascada o valor deste componente foi de 7,7 % (SIMIONI et al, 2007b).

As diferenças no teor lipídico das amostras de arroz e trigo podem ser ocasionadas pela cultivar e tipo de beneficiamento ao qual o grão foi submetido, sendo que a maior ou menor intensidade da retirada das camadas externas tende a influenciar os valores de lipídios (SILVA, ASCHERI e PEREIRA, 2007). No entanto, cabe salientar que, no caso deste

trabalho, as amostras de aveia e arroz foram apenas descascadas e moídas, não sendo separadas as camadas usuais de beneficiamento de cada grão em moinhos convencionais.

As cultivares de arroz BR 410 e BR 424 apresentaram maior teor de cinzas em relação às cultivares de aveia UPFA 20 Teixeirainha e UPFA 22 Temprana e de trigo Ônix, Pampeano e Safira, com valor de 2,7 %, bastante superior ao encontrado por Castro et al (1999) e Silva, Ascheri e Pereira (2007). O teor de cinzas indica o grau de extração da farinha de cereais, permitindo classificá-la em tipos, de acordo com seu uso (RASPER, 1991). No caso deste trabalho, as variações nos teores de cinzas podem ser explicadas pelas diferentes cultivares utilizadas e possivelmente pelo local de cultivo. Em estudo realizado por Gutkoski et al (2007), o teor de cinzas para as cultivares de trigo BRS Angico e Rubi foram de 0,14 e 0,6 %, respectivamente; enquanto que Gutkoski, Nodari e Neto (2003) ao avaliar farinhas de trigo produzidos no estado do Rio Grande do Sul obtiveram valores superiores a 1,4 %, portanto a variabilidade é afetada por outros fatores de comportamento mais complexo que a forma da moagem.

Os maiores teores de proteína foram obtidos na aveia UPFA Pampa (14 %), seguido da aveia UPFA 20 Teixeirainha (10,4 %) e arroz BR 417 (7,5 %). Em estudo realizado por Simioni et al (2007 b), a proteína bruta encontrada para aveia UPFA 20 Teixeirainha foi de 14,4 %, enquanto que a média encontrada por Pedó e Sgarbieri, (1997) em quatro amostras de aveia foi de 15 %. O teor de proteína bruta em diferentes cultivares de trigo variou entre 10,6 e 14,2 % (GUTKOSKI, NODARI e NETO, 2003). Segundo Menezes et al.(2008), amostras de arroz polido apresentaram teor protéico de 4,3%.

A porcentagem de fibra bruta no trigo Pampeano foi de 3,8 %, valor superior ao encontrado nas demais amostras. No entanto o esperado seria maiores resultados especialmente nas amostras de aveia, onde a fração de fibra solúvel vem sendo amplamente divulgada, pois nela se encontram as beta-glicanas, que têm efeito benéfico para a saúde humana (SAURA-CALIXTO, 1993). Além disso, Simioni et al (2007b) relataram valores de fibra bruta para as cultivares de aveia UPFA 20 Teixeirainha e UPF 18 de 12,7 e 13,1%, respectivamente, bem acima dos verificados neste trabalho.

O teor médio de fibras presente nas amostras de arroz foi de 0,5 %, semelhante ao estudado por Dors, Pinto e Badiale-Furlong (2009), que também encontraram 0,5 % de fibras no endosperma amiláceo; enquanto que a fração casca mais farelo o valor foi de 32,4 %. Estes menores resultados para a fração fibra podem ser decorrentes das diferentes metodologias empregadas pelos autores. Nos casos em que a digestão química é utilizada, os valores de fibra podem ser obtidos em percentuais superiores a 15%, como nesse trabalho (BADIALE-FURLONG, GONÇALVES e SOUZA-SOARES, 1998)

### 3.2 Solubilidade das proteínas

A Tabela 2 apresenta os resultados da proteína solúvel em cada variedade de trigo, aveia e arroz, expresso em mg de proteína por g de amostra.

Tabela 2 Valores de proteína solúvel em cereais

Amostras	mg de Proteína/g de Amostra*
TRIGO SAFIRA	4,08 ±0,018
TRIGO ÔNIX	4,94 ±0,031
TRIGO PAMPEANO	4,68 ±0,012
AVEIA TEMPRANA	6,00 ±0,006
AVEIA TEIXEIRINHA	5,73 ±0,011
AVEIA PAMPA	5,73 ±0,024
ARROZ BR 410	3,05 ±0,009
ARROZ BR 417	4,75 ±0,018
ARROZ BR 424	5,18 ±0,005

O teor de proteína solúvel nas amostras de aveia foi superior ao dos demais cereais analisados. Em relação às amostras de arroz, o valor médio obtido foi em torno de 4,4 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>. Couto et al (2009) obtiveram resultados de 27 e 12 mg proteína g amostra<sup>-1</sup> para arroz branco com casca e arroz branco polido, respectivamente. Esse estudo demonstrou que as porções mais externas do arroz, como casca e farelo, contém cerca de 15% de proteína bruta e isto se reflete no teor de proteína solúvel em amostras de arroz com casca, que chega a ser 2,5 vezes maior que nas amostras de arroz branco.

Na extração seqüencial das proteínas de reserva, as primeiras frações correspondentes à albumina e globulina tiveram as variedades de trigo Safira, Ônix e Pampeano com valores de 52 %, 57 % e 45 %, do total de proteína bruta (Tabela 3). Essas proteínas são acumuladas durante a divisão celular e requerem mais energia para sua síntese, pois são compostas por aminoácidos essenciais (SOUZA, STARCK e FERNANDES, 1993). Ao comparar cada uma das frações extraídas, constatou-se que a globulina foi obtida em valores mais baixos que as demais. Este fato pode estar associado a condições de cultivo que dificultaram a obtenção de energia para a síntese.

A Tabela 3 mostra que nas variedades de aveia a fração glutelina foi estatisticamente superior às demais, com valor médio de 25 % e a globulina não diferiu da prolamina, com resultados abaixo do esperado. No entanto, em estudos realizados por Peterson e Smith (1976), a maior fração extraída foi a globulina, entre 50 a 56 %. De acordo com Pedó e Sgarbieri (1997), a discordância entre os estudos realizados pode ser atribuída também à

incompleta extração especialmente da globulina, visto que essa proteína pode ter sido extraída em alguma etapa posterior, estando misturadas às demais frações.

Tabela 3 Distribuição das frações protéicas em arroz, aveia e trigo

Amostra	Albumina (%)	Globulina (%)	Prolamina (%)	Glutelina (%)
Arroz 410	44,8 <sup>hk</sup>	21,8 <sup>h,k</sup>	7,6 <sup>m,n</sup>	23,4 <sup>hk</sup>
Arroz 417	38,8 <sup>c,e</sup>	21,4 <sup>h,k</sup>	13,2 <sup>hn</sup>	27,0 <sup>f,i</sup>
Arroz 424	40,5 <sup>c,d</sup>	25,8 <sup>g,i</sup>	13,2 <sup>l,n</sup>	23,5 <sup>hk</sup>
Aveia UPFA Pampa	21,5 <sup>hk</sup>	9,6 <sup>m,n</sup>	6,4 <sup>n</sup>	62,4 <sup>a</sup>
Aveia UPFA 20 Teixeira	30,6 <sup>e,i</sup>	10,4 <sup>mn</sup>	9,0 <sup>m,n</sup>	51,1 <sup>b</sup>
Aveia UPFA 22 Temprama	21,7 <sup>hk</sup>	10,6 <sup>mn</sup>	6,8 <sup>n</sup>	61,6 <sup>a</sup>
Trigo Safira	36,3 <sup>c,f</sup>	15,3 <sup>k,n</sup>	13,5 <sup>ln</sup>	33,5 <sup>d,g</sup>
Trigo Ônix	40,1 <sup>c,d</sup>	16,6 <sup>i,l</sup>	11,9 <sup>mn</sup>	33,6 <sup>d,g</sup>
Trigo Pampeano	32,0 <sup>dh</sup>	13,3 <sup>l,n</sup>	14,4 <sup>k,n</sup>	40,3 <sup>c,d</sup>

Resultados representam a média de três determinações. Letras minúsculas diferem estatisticamente entre cada fração protéica de todos os cereais estudados.

Para a principal proteína de reserva do arroz, a glutelina, observou-se que na cultivar BR 417, com maior teor de proteína bruta (Tabela 1), ocorreu maior acúmulo, apresentando correlação positiva, conforme observado por Souza (1990). Os resultados encontrados demonstraram que o aumento de proteína acompanhado do aumento da glutelina, sugerindo que o teor protéico pode ser uma forma de avaliar a qualidade nutricional do arroz, uma vez que esta fração é rica em aminoácidos essenciais. As frações albumina, globulina, prolamina e glutelina encontradas em arroz corresponderam a 35; 17; 7 e 41 % do total de proteínas, respectivamente (BIZZOTTO, 2005).

A composição em proteínas também é afetada pela característica genotípica. Liu et al (2005) observaram não só a diferença na concentração total de proteínas entre cultivares, como também nos tipos de proteínas. A maior variação foi observada para a glutelina, com concentração entre 6 e 10% e correlação positiva com o teor total de proteínas, sendo menores as diferenças para prolamina (0,7-0,8 %), globulina (0,4-0,5 %) e albumina (0,4-0,5 %).

A Figura 1, que representa a relação entre as massas de cada fração em função da quantidade de proteína presente nas amostras, demonstrando que a fração glutelina apareceu em percentuais semelhantes em todos os cereais estudados, enquanto que os menores valores foram determinados para a fração prolamina. O arroz foi o cereal que apresentou maiores quantidades de albumina, mas a glutelina, encontrada em abundância

na aveia estava em menores proporções. Esses resultados podem estar relacionados com as digestibilidades destes cereais relatadas na literatura e o encontrado neste trabalho. O trigo possui quantidades próximas de albumina e glutelina, sendo baixas as quantidades de globulina e prolamina, o que explica suas propriedades funcionais distintas dos demais cereais (MENDICHI, FISICHELLA e SAVARINO, 2008).

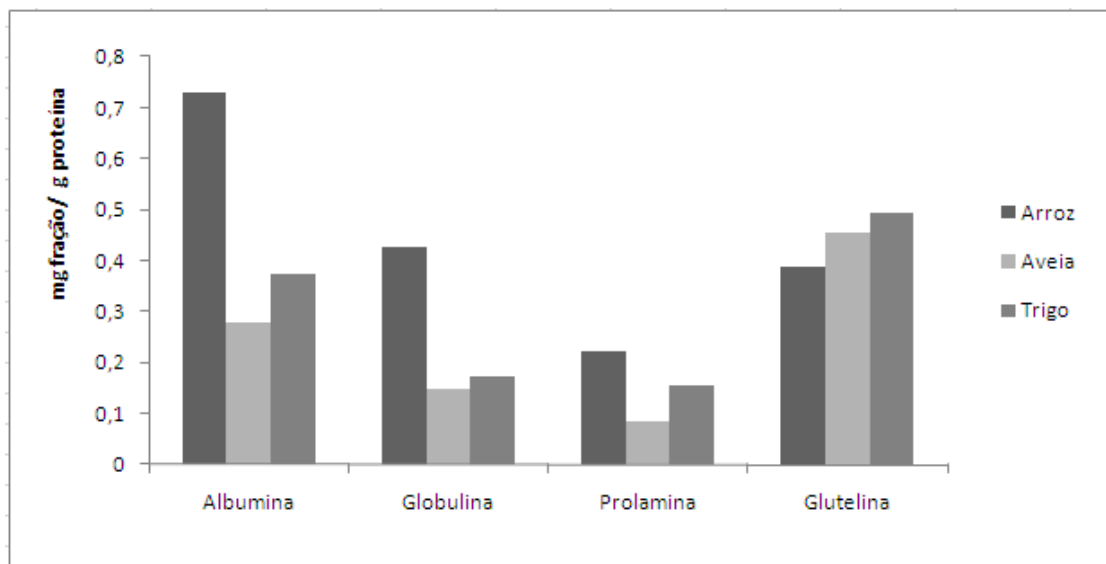


Figura 1 Massa da fração (mg) por g de proteína nas amostras de cereais.

A metodologia para determinação da solubilidade apresentou, nas diferentes etapas de sua execução, variáveis que podem interferir na exatidão dos seus resultados, tais como granulometria da amostra, velocidade de rotação da centrífuga e tempo de centrifugação. Silveira e Souza (2007) indicaram que ao aumentar o tempo de permanência no reator e a agitação na etapa de extração, maior a solubilidade protéica determinada.

Cabe salientar que não foi foco deste trabalho estabelecer metodologia específica para cada matriz estudada, sendo assim realizado procedimento clássico descrito por Osborne (1924) para este estudo de frações protéicas.

O uso de solventes na extração protéica seqüencial aumentou o rendimento em algumas matérias-primas, especificamente para cereais. Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, porque a maior parte da fração protéica do arroz foi solúvel em água (albumina), aveia em solução básica (glutelina) e trigo em água e solução básica, sendo facilmente extraídas por esses solventes na forma sequencial.

### 3.3 Digestibilidade *in vitro* e teor de metionina disponível

Os valores de digestibilidade protéica *in vitro* e metionina disponível dos cereais estudados estão apresentados na Tabela 4. O maior valor de digestibilidade foi encontrado para o arroz BR 424 (91,8 %) e o menor para aveia UPFA Pampa (40,2 %).

Wolzack et al (1981) também estudaram digestibilidade de arroz e obtiveram valor de 85 %, semelhante ao cultivar BR 424 e bastante acima do BR 417. As três variedades estudadas apresentaram diferentes percentuais de digestibilidade entre si, indicando que fatores ambientais e genéticos podem ter influenciado o conteúdo protéico e a digestibilidade.

A variabilidade nos valores de digestibilidade protéica pode estar relacionada à sequência de aminoácidos, estrutura terciária da proteína ou ainda pela presença de constituintes não protéicos, que alteram a liberação de aminoácidos durante o processo enzimático, de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 1991).

As digestibilidades das amostras de trigo apresentaram valores em torno de 73 %, sendo que Safira e Pampeano não diferiram estatisticamente entre si, enquanto que a variedade Ônix foi ligeiramente inferior. De acordo com Wolzak *et al* (1981), farinha de arroz, trigo e trigo integral apresentam digestibilidade *in vitro* de 85, 86 e 84 %, respectivamente.

Pires *et al* (2006) utilizando o mesmo método de determinação da digestibilidade obtiveram os seguintes valores para algumas fontes de proteína de origem vegetal: trigo (86 %), milho (85 %), feijão (78 %) e soja (74 %).

O menor valor de digestibilidade foi encontrado para a aveia, cultivar UPFA Pampa, com valor de 40 %. Enquanto num estudo realizado por Pedó e Sgarbieri (1997), a porcentagem de digestibilidade em cultivares de aveia UPF15, UPF16 e UFRGS14 foi de 80, 92 e 87 %, respectivamente.

Tabela 4 Digestibilidade *in vitro* e teor de metionina disponível em arroz, aveia e trigo

Amostras	Digestibilidade (%)	Metionina (mg g <sup>-1</sup> proteína)
Arroz 410	71,6 <sup>b,c</sup>	39,4 <sup>f</sup>
Arroz 417	55,3 <sup>d,e</sup>	14,84 <sup>g</sup>
Arroz 424	91,8 <sup>a</sup>	89,4 <sup>e</sup>
Aveia UPFA Pampa	40,2 <sup>f</sup>	90,5 <sup>e</sup>
Aveia UPFA 22 Temprana	78,4 <sup>b</sup>	118,6 <sup>d</sup>
Aveia UPFA 20 Teixeira	52,7 <sup>e</sup>	164,9 <sup>a</sup>
Trigo Safira	74,7 <sup>b,c</sup>	94,2 <sup>e</sup>
Trigo Ônix	66,7 <sup>c,d</sup>	134,9 <sup>b</sup>
Trigo Pampeano	76,5 <sup>b,c</sup>	128 <sup>c</sup>

Resultados representam a média de três determinações. Letras minúsculas diferem estatisticamente entre a digestibilidade ou metionina de todos os cereais estudados.

O baixo valor de digestibilidade encontrado em algumas amostras pode ser atribuído a presença de inibidores enzimáticos de proteases que podem estar ativos nos cereais estudados que não foram tratados termicamente. Outros compostos que podem modificar e diminuir a digestibilidade, por aumentar a excreção de nitrogênio são as fibras presentes em alimentos vegetais (KRITCHEVSKI, 1988).

A metionina disponível variou entre 14,8 mg g<sup>-1</sup> proteína para o arroz BR 424 a 165 mg g<sup>-1</sup> proteína para aveia UPFA 20 Teixeirainha. Assim, é possível aumentar o teor de aminoácidos sulfurados em cereais, por meio do melhoramento genético, pois há variabilidade entre cultivares.

Segundo a FAO (1991), a aveia apresenta uma composição em aminoácidos superior em qualidade e quantidade quando comparada aos demais cereais, sendo o teor de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) adequado para suprir as necessidades de um indivíduo adulto de 15 mg kg<sup>-1</sup>.

A Figura 2 representa os valores de digestibilidade e metionina de cada uma das amostras analisadas. O arroz BR 424, com a maior porcentagem de digestibilidade apresentou menor teor de metionina disponível, enquanto que a aveia Teixeirainha, com a maior quantidade de metionina, apresentou menor digestibilidade.

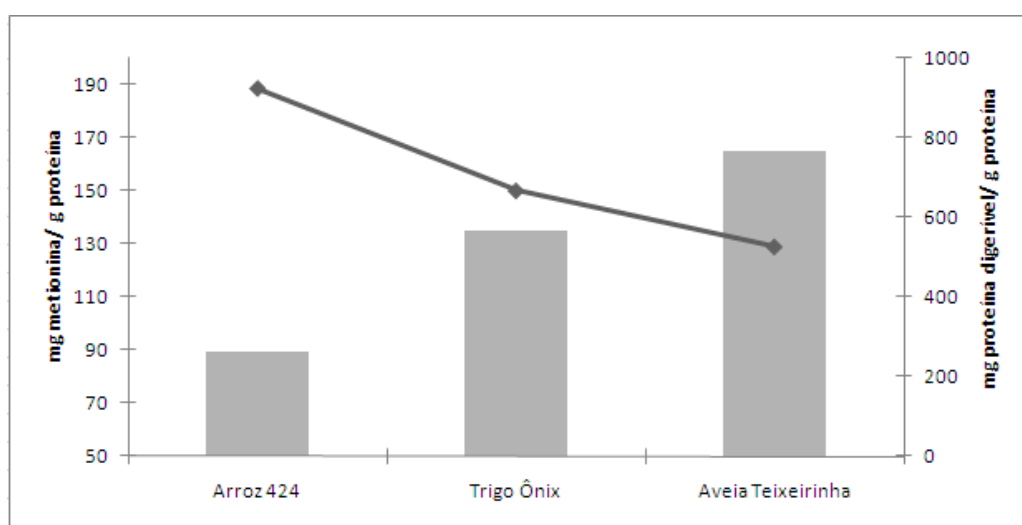


Figura 2 Digestibilidade\* da proteína *in vitro* e metionina\*\* disponível nas variedades de arroz 424, aveia Teixeirainha e trigo Ônix.

\* Gráfico de linhas representa a digestibilidade, com resultados expressos em mg de proteína digerível por g de proteína. \*\*Gráfico de barras representa os valores da metionina, expressos em mg de metionina por g de proteína.

Entre as amostras de trigo, foi observado que a cultivar Safira apresentava 94,2 mg g<sup>-1</sup> proteína, enquanto que Ônix apresentou valor bem elevado e próximo da aveia UPFA 20 Teixeirainha. Ao comparar os cereais, o arroz apresentou as menores quantidades de

metionina disponível, resultados não condizentes com a literatura (SGARBIERI, 1996). No entanto, poucas são as informações disponíveis sobre o conteúdo aminoacídico total ou disponível em variedades de arroz cultivadas no Brasil nos últimos anos.

### 3.4 Atividade enzimática

Nos cereais, a atividade enzimática pode ser detectada durante a germinação precoce, sendo essencial para o crescimento e obtenção de energia (NANDI, DAS e SEN-MANDI, 2005). As Figuras 3 e 4 representam os resultados referentes à atividade específicas das enzimas presentes nos cereais e expressos em UA, de acordo com a equação 1.

As três variedades de trigo apresentaram maior atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase do que as amostras de aveia e arroz. Isto justifica o fato desse cereal estar entre os mais susceptíveis a germinação e contaminação fúngica. Rani et al (2001) estudaram a distribuição de alfa-amilase em diferentes frações de trigo e concluíram que o aumento do grau de extração da farinha ocasionou diminuição da atividade enzimática, comprovando que esta enzima é encontrada nas camadas mais externas do grão, como farelo e escutelo.

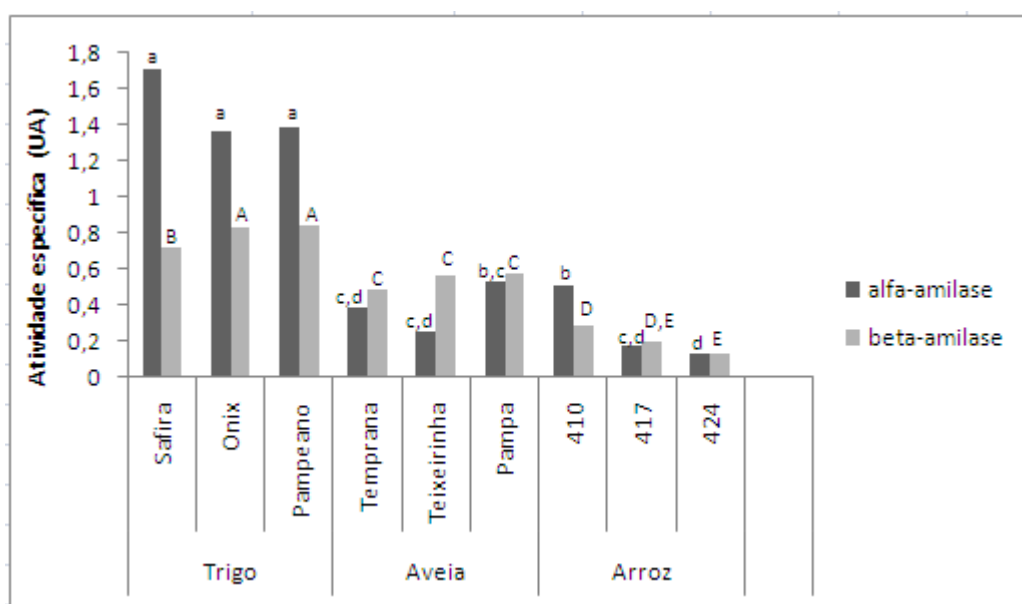


Figura 3 Atividade específica da  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase.

\*Letra minúsculas diferem estatisticamente entre os resultados da alfa-amilase, enquanto que letras maiúsculas diferem estatisticamente entre os resultados da beta-amilase. Resultados representam a media de três determinações.

Nandi, Das e Sen-Mandi (2005) sugeriram que a atividade da beta -amilase é um bom indicador da capacidade de germinação de sementes de arroz armazenadas, bem como do seu vigor durante a germinação. Das e Sen-Mandi (1992) também indicaram que a beta-



amilase é mais importante para o trigo nas primeiras horas da germinação. No entanto, Gibson e colaboradores (2001) citado por Yamasaki (2003) reportaram que baixos níveis de beta-amilase mantiveram normais os níveis de amido e o crescimento das plantas.

Embora o amido seja o principal constituinte na aveia, quando comparado ao trigo, a atividade de enzimas foi considerada mais baixa, o que pode estar relacionada com a presença de fibras e lipídios em maior quantidade, que dificultam a atuação ou extração enzimática. As amostras de arroz foram as que apresentaram menor atividade de enzimas amilolíticas, sugerindo a presença de inibidores enzimáticos ativos, o que é bastante provável por tratar-se de amostras de grãos recém colhidos (safra 2009); ao contrário das demais, com maior tempo de colheita.

A atividade específica de protease apresentou variações sendo o trigo Pampeano, seguido pela aveia UPFA 22 Temprana as que se destacaram. As variedades de arroz BR 410, BR 417 e BR 424 destacaram-se pela baixa atividade destas enzimas. Rani et al (2000) que também estudaram a presença de protease em diferentes frações de trigo observaram que a atividade enzimática dessa enzima aumentou com o acréscimo do número de extrações.

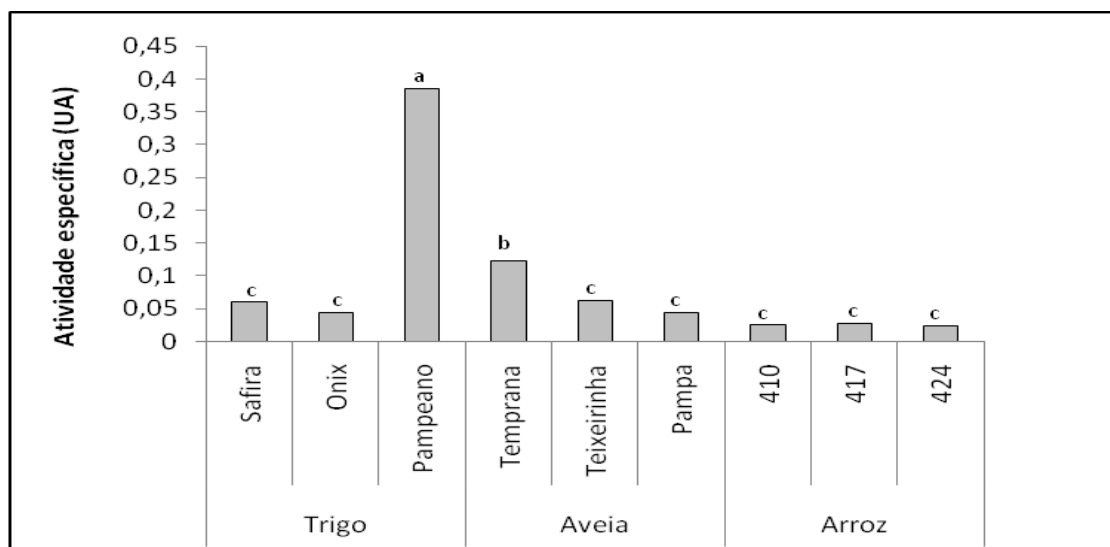


Figura 4 Atividade específica da protease.

\*Letra minúsculas diferem estatisticamente entre si. Resultados representam a média de três determinações.

Ao relacionar a fração protéica com os resultados de digestibilidade e solubilidade, constatou-se que as amostras de arroz, com menor teor de proteína solúvel (4,3 mg proteína/ g amostra, em média), apresentava maior digestibilidade e solubilidade, visto que o arroz BR 424 possui as maiores quantidades de albumina e globulina.

De uma maneira geral, pode-se verificar que ao aumentar o teor de proteína solúvel nas amostras, maior a atividade enzimática de alfa e beta - amilase e menor o teor de

protease. Relação inversa foi verificada entre os resultados de digestibilidade e atividade enzimática, pois a aveia, com valor médio de 57 % apresentou atividade específica (mg enzima/ mg de proteína) de alfa e beta-amilase de 0,4 e 0,6, respectivamente.

#### **4 CONCLUSÃO**

A metodologia utilizada permitiu a extração seqüencial das proteínas solúveis de arroz, aveia e trigo. A fração albumina foi obtida em maiores quantidades nas amostras de arroz, enquanto que na aveia predominaram as proteínas solúveis em meio básico. No trigo, a albumina e glutelina constituíram mais da metade do total de proteína bruta.

Ficou demonstrada uma relação inversa entre o teor de fibra e a digestibilidade dos cereais, fato não verificado entre a digestibilidade e o teor de metionina disponível.

Nas cultivares de trigo, a atividade de  $\alpha$ -amilase foi 4 e 6 vezes maior que nas amostras de aveia e o arroz, respectivamente. A ação da  $\beta$ -amilase nas amostras de trigo foi o dobro da aveia e 4 vezes maior em relação ao arroz. Quanto à ação proteolítica ocorreram maiores variações nas amostras de trigo comparado aos demais cereais, sendo na cultivar Pampeano o mais elevado.

Os resultados sugerem que são necessários outros estudos envolvendo maior número de variedades e outros períodos de colheita para consolidar o conhecimento sobre os cereais cultivados no RS como fontes protéicas.

## REFERÊNCIAS

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BADIALE, E. **Variação de metionina em feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados**. Campinas: Unicamp, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola Universidade Estadual de Campinas, 1979.
- BADIALE-FURLONG, E.; VALENTE SOARES, L.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxin and fungi in wheat stored in elevators in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995.
- BADIALE-FURLONG, E.; GONÇALVES, A. A. ; SOUZA-SOARES, L. A. Enzymatic determination of soluble and insoluble dietary fiber in rice and wheat bran. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 48, n. 4, p. 35-44, 1998.
- BARAJ, E.;GARDA-BUFFON, J. BADIALE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-2 Toxin in Malt Amylase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 53, n.3, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução-RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 set 2005.
- BIZZOTTO, C.S. **Obtenção de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina: emprego da pancreatina e da corolase pp**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- BRASIL. Resolução – RDC nº 274, de 16 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 mar.2009.
- BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L. & PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.
- CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J,N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.
- CARREIRA, R.L.; RAMOS, C.S.; SILVA, M.R.; LOPES, C.O. Jr; SILVESTRE, M.P.C.; PIROZI, M.R. Emprego de metodologia enzimática na obtenção de extratos protéicos de farinha de trigo, **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 919-922, 2009.
- CASTRO, E. M. et al. **Qualidade de grãos de arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30 p.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed.Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira. 7º levantamento, safra 2008/ 2009**, abril 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra>>. Acesso em: 22 abr. 2009.
- COUTO, R.C.; LEMOS-MENDES, G.R.; FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. Condições de cultivo e de processamento de arroz e seu efeito na atividade de lipases. **Mostra de Produção Universitária**, Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

- DAS, G., SEN-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, v. 69, p. 497–501, 1992.
- DORS, G.C.; PINTO, R.H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, p. 219-224, 2009.
- ELIAS, M.C. **Secagem e armazenamento de grãos em média e pequenas escalas**. Pelotas: Universitária, 2000. 146 p.
- FAO/WHO. **Protein quality evaluation**, 1991.
- FERNANDES L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N., Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina Phaseolina*, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, p. 43-45; 2007.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v. 87, n.3, p. 233-240, 2003.
- GILANI, G.S.; COCKELL, K.A.; SEPEHR, E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods, **Journal of AOAC International**, v. 88, n.3, 2005.
- GOESAERT, H.; SLADE, L.; LEVINE, H.; DELCOUR, J.A. Amylases and bread firming – an integrated view. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 345–352, 2009.
- GUTKOSKI, L.C.; NODARI, M.L.; NETO, R.J. Avaliação de farinhas de trigos cultivados no rio grande do sul na produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 91-97, 2003.
- GUTKOSKI, L.C.; PAGNUSSATT, F.A.; SPIER, F.; PEDÓ, I. Efeito do teor de amido danificado na produção de biscoitos tipo semi-duros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 787-792, 2007.
- GUTKOSKI, L. C.; PEDO, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Varela, 2000. 96 p.
- HACKBART, H. **Ocratoxina A e Citrinina em arroz: um estudo de metodologia, ocorrência e relação com variáveis abióticas**. Rio Grande: FURG, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.
- HAZEL, C.M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 51-59, 2004.
- KRITVHEVSKI, D. Dietary fiber, **Annual Review of Nutrition**, v.8, p.301-328, 1988.
- LIU, Z. H., CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.49-52, 2005.
- LORI, G.A., SISTERNA, M.N., HAIDUKOWSKI, M., RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological Research**, v. 158, p. 29-35, 2003.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACKINTOSH, S.H.; MEADE, S.J.; HEALY, J.P.; SUTTON, K.H.; LARSEN, N.G.; SQUIRES, A.M.; GERRARD, J.A. Wheat glutenin assemble into a nanostructure with unusual structural features. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 157-162, 2009.

- MAROCHI, M.A.; VALENTE-SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n.2, p. 17-20, 1996.
- McKEVITH, B. Nutricional aspects of cereal, **Nutrition Bulletin**, vol. 29, 2004, pp. 111-142.
- MENDICHI, R.; FISICHELLA, S.; SAVARINO, A. Molecular weight, size distribution and conformation of Glutenin from different wheat cultivars by SECeMALLS. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 486-493, 2008.
- MENEZES, B.S.; RIVERO-MEZA, S.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. **Efeito do uso de pesticidas na composição centesimal do arroz e seus co-produtos**. VII Mostra de Produção Universitária, Universidade Federal do Rio Grande, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Documento 110, 2007.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal  $\alpha$ -amylases: an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005
- NANDI, S.; DAS, G.; SEN-MANDI, S.  $\beta$ -amylase activity as an Index for germination potential in rice. **Annals of Botany**, v. 75, p. 463-467, 1995.
- OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.
- OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2 ed. London: Longmans, 1924. 154 p.
- PEDÓ, I.; SGARBIERI, V.C. Caracterização química de cultivares de aveia (*Avena sativa* L.), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, 1997, p. 78-83.
- PETERSON, D.M.; SMITH, D. Changes in nitrogen and carbohydrate fractions in developing oat groats, **Crop Science**, v. 16, n.1, p. 67-71, 1976.
- PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, M.N.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.179-187, 2006.
- RANI, K.U.; PRASADA-RAO, U.J.S.; LEELAVATHI, K.; HARIDAS-RAO, P. Distribution of Enzymes in Wheat Flour Mill Streams. **Journal of Cereal Science**, v.34, p. 233-242, 2001.
- RANGEL, A.; SARAIVA, K.; SCHWENGBER, P.; NARCISO, M.S.; DOMONT, G.B.; FERREIRA, S.T.; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds, **Food Chemistry**, v. 87, p. 491-499, 2004.
- RASPER, V. F. Quality evaluation of cereal and cereal products. In: LORENZ, K. J. and KULP, K. (ed.) **Handbook of cereal science and technology**, New York: Marcel Dekker, 1991. p 595-638.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- SAURA-CALIXTO, F. Fibra dietética de manzana: hacia nuevos tipos de fibras de alta calidad. **Alimentaria**, v. 242, p. 57-61, 1993.
- SCHOLLENBERGER, B- M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANCK, DROCHNER, W. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 317-32, 2005.
- SCHRÖDTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.

- SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. Capítulo 9, p.675-804.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, degradações, modificações**, São Paulo: Livraria varela, 1996. 517 p.
- SILVA, R.F. da; ASCHERI, J.L.R.; PEREIRA, R.G.F.A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 18, n.3, p. 325-330, 2007.
- SILVEIRA, C.O; SOUZA, C.F.V. Variações do método de quantificação da proteína solúvel em soja desativada utilizada na alimentação animal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, n.2, p. 117-127, 2007.
- SIMIONI, D.; GUTKOSKI, L.C.; ELIAS, M.C.; DEUNER, C.C.; PAGNUSSATT, F.A.; OLIVEIRA, M. Secagem intermitente e armazenamento de aveia cultivar UPFA 20 Teixeirainha. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.2, p. 211-217, 2007a.
- SIMIONI, D.; WEBBER, F.H.; GUTKOSKI, L.C.; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, L.C.; AOSANI, E. Caracterização química de cariopses de aveia branca. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 18, n.2, p. 191-196, 2007b.
- SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association Of Official Analytical Chemists**,v. 72, p. 22-26, 1989.
- SOUZA, S.R; STARCK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Teores e qualidades das proteínas de reserva do arroz em função de aplicação suplementar de N. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.5, p. 575-583, 1993.
- TANG; S.; HETTIARACHCHY; N.S.; SHELLHAMMER,T.H. Protein extraction from heat stabilized deffatted rice bran: physical processing and enzyme treatments. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- VALENTE-SOARES, L. **Curso Básico de Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. São Paulo: Editora Manole, v,1, 337 p. 2006.
- WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**, 5<sup>o</sup> Edição Cambridge: university Press, 2000. 784p.
- WOLZAK, A.; BRESSANI, R.; BRENES, R.G. A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins, **Qualitas plantarum Foods Human Nutrition**, v.31, n.1, p. 31-43, 1981.
- YAMASAKI, Y. b-Amylase in germinating millet seeds. **Phytochemistry**, v. 64, p. 935–939, 2003.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

## **EXTRAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE CEREAIS**

## RESUMO

O conhecimento do controle das defesas naturais dos vegetais pode ser uma ferramenta importante para controle da produtividade das culturas, como forma de garantir a segurança alimentar, diminuindo as perdas e riscos de danos a saúde pública. Desse modo, o objetivo do trabalho foi extrair inibidores enzimáticos de amilase fúngica presentes em grãos de aveia, arroz e trigo, visando purificá-los para fornecer subsídios que permitirão a seleção de espécies cereais mais resistentes à contaminação fúngica. A extração de inibidores enzimáticos dos cereais foi possível, sendo que a melhor condição para aveia e trigo foi obtida ao utilizar o sistema de extração etanol 70 % e 12 horas de agitação, com inibição em torno de 90 %. Nas cultivares de arroz, o extrato bruto inibiu 96 % da ação da enzima amilase em ensaios *in vitro*, quando se empregou como extrator etanol 95 % e 7 h de extração. A extração de inibidores enzimáticos com etanol foi eficiente e as concentrações de etanol e tempo de extração para obtenção desses inibidores variaram em função do cereal estudado. Os resultados serão a base para a purificação de inibidores e estudo do seu mecanismo de inibição do desenvolvimento fúngico.

**Palavras-chave:** cereais, enzima, velocidade da reação, teor de inibição.



## **ABSTRACT**

Knowledge regarding how to control the natural defenses of vegetables can be an important tool for controlling the crop productivity, thus ensuring food safety. The objective of this work was to extract enzymatic inhibitors of fungal amylase present in oat, rice and wheat grains, with the purpose of purifying them and of supplying information that aid in the selection of cereal species more resistant to fungal contamination. The best condition to extract the enzymatic inhibitor from oats and wheat was upon utilizing the 70% ethanol extraction system and 12 hours of agitation, with around 90% inhibition. In the rice cultivars, the crude extract inhibited 96% of the amylase enzyme action when 95% ethanol and 7 hours were used for the extraction. Extraction of the enzymatic inhibitor with ethanol was efficient and the ethanol concentrations and the extraction time used to obtain these inhibitors varied as a function of the cereal studied. The results will represent the basis for the purification of inhibitors and the study of its mechanism of the inhibition of fungal development.

**Keywords:** cereals, enzyme, reaction speed, inhibition level.

## 1 INTRODUÇÃO

Os cereais estão entre as matérias-primas mais utilizadas em diversas regiões do mundo, devido a sua composição química e propriedades tecnológicas. Estas propriedades também os tornam susceptíveis ao ataque microbiano (McKEVITH, 2004) que resultam em danos no aporte de nutrientes, aparência, funcionalidade, além da possibilidade de ocorrência de componentes tóxicos. Embora os tecidos vegetais apresentem mecanismos de resistência a esses ataques, sua eficiência pode ser alterada em função das características genéticas, além de ser fortemente afetada por variáveis abióticas, como cultivo e processamento.

Dentre os mecanismos de resistência destacam-se a composição dos tecidos de proteção e a presença de inibidores enzimáticos que impedem patógenos de obterem nutrientes a partir deles. Este tipo de mecanismo é encontrado em grãos (VALENCIA-JIMÉNEZ et al, 2008); exemplo disto são os diferentes inibidores protéicos que agem sobre a  $\alpha$ -amilase ou outras enzimas evitando com isso a germinação antecipada e dificultando o desenvolvimento de pragas diversas.

Os inibidores protéicos podem ser agrupados pela similaridade em sua sequência primária e por sua estrutura terciária em seis classes: lectina, knotina, cereal, kunitz, g-purotionina e taumatina (SVENSSON et al, 2003). Eles representam em algumas espécies entre 5 e 15 % do total de proteínas presentes em sementes (JONGSMA et al, 1995; POMPERMAYER et al, 2001) e tem se mostrado capazes de inibir  $\alpha$ -amilase de algumas espécies de insetos e de outros organismos (PAYAN et al, 2004). Além da sua presença em trigo, inibidores de  $\alpha$ -amilases já foram descritos em feijão (MOSCA et al, 2008), milho (MARSARO-JÚNIOR et al, 2005), centeio (GIBBS e ALLI, 1998), arroz, cevada, centeio e aveia (NAKASE et al, 1996), dentre outras espécies.

O conhecimento do mecanismo de funcionamento das defesas naturais dos vegetais pode ser uma ferramenta importante para controlar a produtividade das culturas e garantir a segurança alimentar, diminuindo as perdas e riscos de danos a saúde pública. Outra perspectiva é obter estes inibidores a partir de grãos inadequados para a comercialização e empregá-los em conservação de produtos alimentícios ou como medicamentos para indivíduos com erros inatos de metabolismo (BONIGLIA et al, 2008). O emprego destes inibidores naturais também representam uma solução desejável pelo fato de diminuir os níveis de contaminação secundária para o ecossistema, decorrente dos resíduos de agrotóxicos empregados em lavouras (KADOSAWA, FIGUEIRA e HIROOKA, 2002; MOTOMURA et al, 1996).

O objetivo do trabalho foi realizar a extração de inibidores enzimáticos de amilase fúngica presentes em grãos de aveia, arroz e trigo, visando purificá-los para fornecer subsídios que permitirão a seleção de espécies cereais mais resistentes à contaminação fúngica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras e seu preparo

Soluções-estoque de alfa amilase fúngica extraída de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl® 800L, CEE 2006/ 121, Novozymes Latin América, Paraná, Brasil) foram preparadas (1,26 g mL<sup>-1</sup>), armazenadas a 4 °C e retiradas no momento do uso para servirem de indicativo da presença de inibidores enzimáticos.

As fontes de inibidores estudadas foram: a) grãos de aveia (*Avena sativa* L.) variedades A (Teixeirinha), B (Temprana) e C (Pampa) fornecidas pela Universidade de Passo Fundo, safra 2008, b) trigo (*T. aestivum* L.) variedades A (Ônix), B (Safira) e C (Pampeano), fornecidas pela OR Melhoramentos, safra 2008 e c) arroz (*O. sativa* L.) variedades A (BR410), B(BR 417) e C (BR 424) fornecidos pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA), safra 2009. As amostras foram moídas e separadas granulometricamente, sendo homogeneizadas na proporção de 1:4 da fração de 60 mesh e 32 mesh, respectivamente, para garantir a representatividade da amostra analítica.

A farinha de aveia foi desengordurada com éter de petróleo (Synth, São Paulo, Brasil), homogeneizada durante 15 minutos e centrifugada a 2240 g por 20 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. A farinha desengordurada foi seca à temperatura ambiente e armazenada a - 20 °C.

Experimentos anteriores mostraram que o etanol foi o solvente mais adequado para extração de inibidores de amilase (dados não apresentados). A partir daí foi realizado um estudo das melhores condições de extração empregando este solvente partir de um planejamento fatorial fracionário 3<sup>(3-1)</sup> que foi conduzido em duplicata. As variáveis independentes estudadas foram as concentrações de etanol (70%, 82,5%, 95%), o tipo de cultivar (A, B e C) e tempo de extração (12 h, 7 h e 2 h) tendo como resposta a porcentagem de inibição de amilase fúngica (% I). Na Tabela 1 está especificado os valores das variáveis independentes, representados na forma codificada em seus respectivos níveis.

Tabela 1 Variáveis independentes e níveis de variação utilizados nos ensaios

Variáveis independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
Etanol (%)	70	82,5	95
Cultivar	A	B	C
Tempo extração (h)	2	7	12

A extração dos inibidores foi realizada pela homogeneização da amostra com solvente numa proporção 1:5, durante o período estabelecido no planeamento. O tempo de extração 12 h foi dividido em 8 h, 2 h e 2 h; tempo de extração 7 h em 4 h, 2 h, 1 h, com a adição de 25 mL, 10 mL e 10 mL de solvente, respectivamente (FIGUEIRA et al, 2003; MOSCA et al, 2008). As alíquotas de cada extração foram reunidas, centrifugadas e filtradas, sendo em seguida testada sua atividade inibidora.

## 2.2 Teste de inibição enzimática

A atividade inicial da amilase foi determinada pelo método iodométrico (BARAJ, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2010). O procedimento consistiu em empregar os seguintes reatores para a determinação da velocidade máxima:

(a) 1 mL de amido (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) diluído em 2 mL de tampão de reação acetato de sódio pH 7, suplementado com cloreto de sódio e cloreto de potássio (Vetec, São Paulo, Brasil) (TUBO1);

(b) 1 mL de amido diluído em 1 mL de tampão de reação e 1 mL de solução de ácido clorídrico (Synth, São Paulo, Brasil) 0,1 M (TUBO 2);

(c) 1 mL de amido diluído em 1 mL de tampão de reação, 1 mL de solução de enzima (0,137 mg proteína mL<sup>-1</sup>) (TUBO 3);

(d) 2 mL de tampão de reação e 1 mL da solução da enzima (TUBO 4).

Após 30 minutos de reação, nos reatores 1, 3 e 4 adicionou-se 1 mL de solução de ácido clorídrico e no reator 2 colocou-se 1 mL da solução enzimática. A quantidade de amido hidrolisado pela enzima na ausência do inibidor, considerada a velocidade máxima da reação (v), foi expressa em µg amido. mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, de acordo com a Equação 1.

$$v = \left( \frac{absTubo2 - absTubo3}{a} \right) \div 30 \quad (\text{Eq. 1}), \text{ onde:}$$

a = coeficiente angular da equação da reta.

Os tubos 1 e 4 foram utilizados para o controle das condições de atuação do amido e enzima, respectivamente.

A Figura 1 representa o esquema do procedimento utilizado para a estimativa da velocidade da reação na presença do inibidor obtido de cereais.

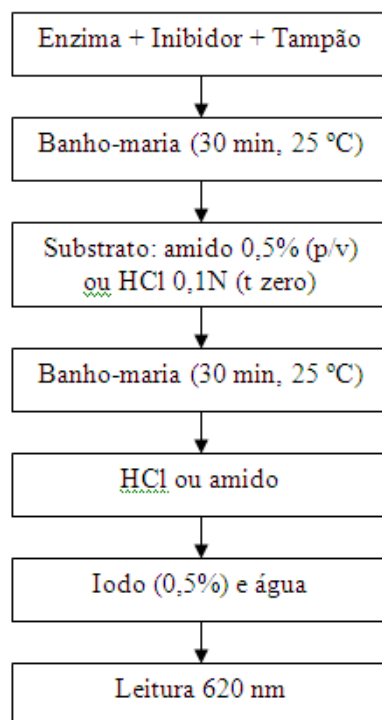


Figura 1 Determinação da velocidade da reação em presença do inibidor

Os extratos contendo os inibidores de amilase (0,2 mL) foram incubados com  $\alpha$ -amilase fúngica comercial e tampão acetato de sódio pH 7,0 durante 30 min a 25 °C. Em seguida foi adicionado amido solúvel 0,5%, mantendo-se a incubação por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido clorídrico 0,1M. O iodo residual foi medido por iodometria, sendo a absorvância do complexo medida a 620 nm, em quaduplicata. A Equação 2 foi utilizada para determinar a atividade de inibição da amilase, expressa em  $\mu\text{g amido mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

$$v = \left( \frac{\text{abs Tempo zero} - \text{abs Amostra}}{a} \right) \div 30 \quad (\text{Eq. 2}), \text{ onde:}$$

a = coeficiente angular da equação da reta.

A partir das equações 1 e 2, obteve-se a porcentagem de inibição de cada extrato sobre amilase fúngica comercial.

Uma unidade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,06 mg de amido por min. Uma unidade de inibidor de amilase foi definida como a quantidade de inibidor necessária para inibir uma unidade de amilase nas condições de ensaio (FIGUEIRA et al, 2003).

### 2.3 Análise estatística

O efeito das variáveis estudadas na atividade de inibição foi avaliada pela metodologia de superfície de resposta. A significância do modelo foi testada pela análise de variância. Nos modelos ajustados foram eliminadas as variáveis não significativas, permanecendo na equação final somente aquelas significativas ao nível de 95% de significância.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra analítica correspondente a porção menor que 32 mesh (3 partes) e maior que 32 mesh (1 parte) foi utilizada para garantir uma tomada de amostra que representasse a fração do grão que contém inibidores, especialmente considerando que as porções mais externas são as primeiras a atuarem como sistemas protetores, agindo como uma barreira física ao ataque fúngico. Além disso a granulometria das amostras pode influenciar na extração de interferentes, como açúcares e lipídios presentes no grão (LUZ et al, 2005). Assim, na medida em que há uma diminuição do tamanho das partículas, a extração da substância de interesse é facilitada pelo aumento da área de contato entre amostra e solvente (DE SOUZA, 1998).

As variáveis estudadas no processo de extração foram a concentração do solvente, tempo e a cultivar, em vista que a combinação delas é determinante para a eficiência da extração. No caso, a relação água/álcool e tempo de contato tem sua eficiência fortemente relacionada com a composição química da amostra.

Em estudo realizado por Figueira et al (2003), os autores estudaram concentrações de etanol na faixa de 0 a 95% durante 2 h de extração para amostras de milho; enquanto que Mundy, Hejgaard e Svendsen (1984) extraíram inibidores de trigo utilizando tampão fosfato de sódio durante 20 h. Iulek et al (2000) estudaram inibidores enzimáticos em centeio através do uso de etanol 70% durante 3 horas. Estes e outros trabalhos também demonstraram a importância destas duas variáveis para a eficiência da extração dos inibidores.

As cultivares escolhidas foram previamente submetidas a melhoramento genético para adequar suas produtividade às condições de cultivo e de processo industrial no Rio Grande do Sul.

A Tabela 2 apresenta os resultados da diminuição da atividade enzimática da amilase pelos extratos dos cereais preparados sob as diferentes condições estudadas no planejamento, sendo estes expressos em porcentagem de inibição.

Tabela 2 Porcentagem de inibição (%) da amilase fúngica por extratos etanólicos de aveia, trigo e arroz

Trat	Etanol (%)	Cultivar	Tempo (horas)	Aveia (%)	Trigo (%)	Arroz (%)
1	-1	-1	-1	74	66	43
2	-1	0	+1	96	71	67
3	-1	+1	0	82	89	41
4	0	-1	+1	69	65	53
5	0	0	0	68	25	43
6	0	+1	-1	60	52	39
7	+1	-1	0	26	74	96
8	+1	0	-1	35	21	44
9	+1	+1	+1	28	43	60
10	-1	-1	-1	61	49	42
11	-1	0	+1	98	81	64
12	-1	+1	0	79	76	37
13	0	-1	+1	65	62	50
14	0	0	0	67	44	51
15	0	+1	-1	55	45	40
16	+1	-1	0	16	61	96
17	+1	0	-1	24	7	43
18	+1	+1	+1	34	42	51

Os cereais avaliados, aveia, arroz e trigo, possuem diferentes características estruturais e químicas, além de terem sido afetados por outras variáveis abióticas distintas tais como tipo de cultivar, solo e ambiente de cultivo que podem determinar a disponibilidade de inibidores no grão (MIRANDA, MORI e LORINI, 2005). Estes fatores podem também estar relacionados com as diferenças verificadas nos seus efeitos observados nos resultados da Tabela 3.

As maiores inibições foram determinadas em extratos obtidos de grão de aveia (97%) seguida do arroz (96%) e trigo (89%).

O efeito estimado da concentração de etanol ( $x_1$ ), cultivar ( $x_2$ ) e tempo de extração ( $x_3$ ) indicou a influência de cada fator no percentual de inibição do extrato de aveia, mostrando que o aumento da concentração de etanol diminuiu a inibição da enzima em 55%, enquanto que o aumento do tempo de extração aumentou em 14 % a inibição (Tabela 3).



A combinação das variáveis etanol e cultivar apresentou efeito positivo de 11,3%; enquanto que etanol e tempo de agitação juntamente com a combinação entre variedade e tempo de agitação apresentaram efeito negativo, ou seja, com a interação dessas variáveis a % de inibição diminuiu em torno de 14% e 12%, respectivamente. A Equação 3 indica os coeficientes referentes aos efeitos no processo de extração dos inibidores indicado pelos percentuais de inibição (%I).

$$\% I = 57,6 - 27,5x_1 + 6,9x_3 + 5,7x_1x_2 - 7,1x_1x_3 - 5,8x_2x_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

Tabela 3 Efeitos sobre a resposta porcentagem de inibição (% I) ocasionada por extrato de aveia

Fatores	CR	EE	EP	t(9)	p
Média	57,601	57,601	1,177	48,955	0,000
Etanol ( $x_1$ )	-27,444	-54,887	2,883	-19,044	0,000
Cultivar ( $x_2$ )	2,246	4,492	2,883	1,559	0,1535
Tempo extração ( $x_3$ )	6,860	13,720	2,883	4,760	0,0010
$X_1x_2$	5,662	11,325	4,324	2,6220	0,0278
$X_1x_3$	-7,055	-14,109	4,324	-3,264	0,0098
$X_2x_3$	-5,814	-11,629	4,324	-2,689	0,0248

CR= coeficiente de regressão, EE= efeito estimado, EP= erro puro, t= coeficiente, p= nível de significância

Os dados da ANOVA (Tabela4) possibilitaram o modelo ajustado de 1ª ordem, de acordo com a Equação 3. A regressão foi significativa ao nível de 95 % de confiança, evidenciando que o modelo explicou 96% da variação dos dados experimentais. A partir da análise de variância, verificou-se que o F calculado (42) foi maior que o F tabelado (3,39), indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, sendo possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões de interesse para a extração dos inibidores.

Tabela 4 ANOVA para a resposta porcentagem de inibição (% I) ocasionada por extrato de aveia

Fonte	GL	SQ	MQ	F calculado
Regressão	6	10333	1722	42
Resíduo	11	451	41	
Falta de ajuste	2	226,8		
Erro puro	9	224,3		
Total	17	107847		

GL= graus de liberdade, SQ= soma dos quadrados, MQ= média dos quadrados.

A menor concentração de etanol (70 %) e o tempo de agitação de 12 h apresentaram os resultados mais promissores, sendo a variedade de aveia UPFA 22 Temprana a que se destacou. A combinação do efeito do tempo de extração e concentração de etanol apresentou efeito negativo independente da cultivar. Como regra geral poder-se-ia afirmar que todas as variedades de aveia foram boas fontes de inibidores enzimáticos de amilase fúngica (Figura 2).

Estes resultados reforçam a idéia de que amilases são proteínas que em soluções concentradas podem ter a solubilidade alterada, prejudicando sua extração. Estes inibidores estão presentes nos cereais e a relação quanto ao peso molecular dessa proteína torna-se um fator importante no estudo de extração.

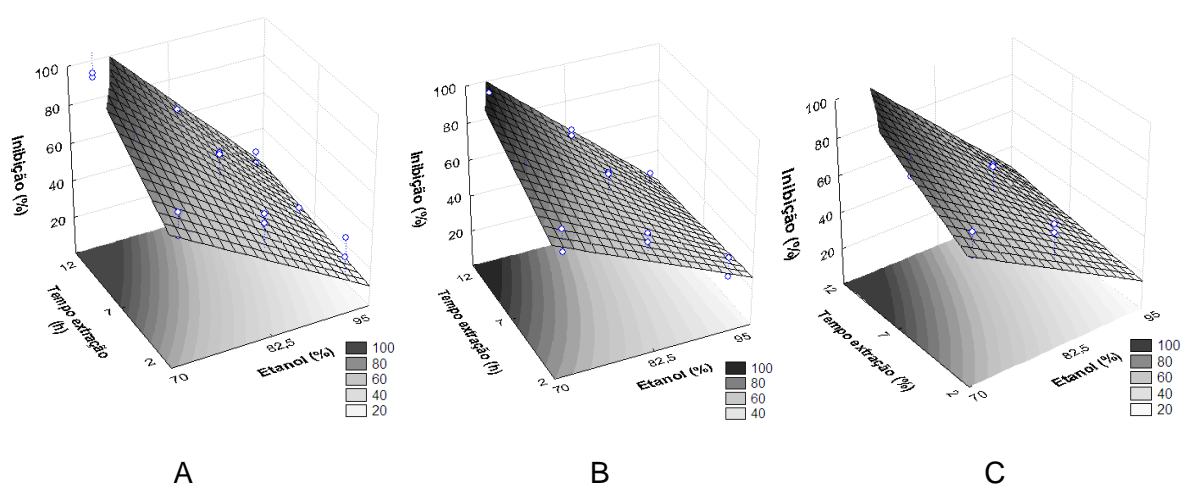


Figura 2 Superfícies de resposta em relação ao efeito combinado das variáveis tempo de extração e concentração de etanol sobre a % de inibição para as cultivares de aveia UPFA 20 Teixeirainha (A), UPFA 22 Temprana (B) e UPFA Pampa (C).

Inibição semelhante foi obtida para o cereal trigo, onde os maiores efeitos de inibição foram observados nos tratamentos 3 e 11, com valor médio de 85% quando utilizado etanol 10

70% e maiores tempos de contato entre a amostra e solvente (7h e 12 h). Para esse cereal, 2 h não foram suficientes para a extração dos inibidores presentes. Ao observar as superfícies de resposta (Figura 3), pode ser verificado que a cultivar Ônix apresentou comportamento diferenciado dos demais.

Na maioria dos trabalhos sobre extração química das proteínas de cereais, etanol e solução de hidróxido de sódio são empregados em concentrações variadas. Segundo Landry (1997), a fração protéica solúvel em etanol é maior do que a solúvel em álcali e ambas constituem 80-90% da proteína total do trigo. A Tabela 5 apresenta os resultados da análise de variância para a porcentagem de inibição ocasionada por extratos de trigo.

Tabela 5 Efeitos sobre a resposta porcentagem de inibição (% I) ocasionada por extrato de trigo

Fatores	CR	EE	EP	t (9)	P
Média	51,918	51,918	2,059	25,209	0,000
Etanol ( $X_1$ )	-15,469	-30,938	5,045	-6,133	0,000
Cultivar ( $X_2$ )	-2,558	-5,115	5,045	-1,014	0,3370
Tempo extração ( $X_3$ )	10,443	20,886	5,045	4,140	0,0025
$X_1X_2$	-18,526	-37,052	7,568	-4,897	0,0008
$X_1X_3$	11,517	23,034	7,568	3,044	0,0139
$X_2X_3$	0,436	0,872	7,568	0,116	0,9108

CR= coeficiente de regressão, EE= efeito estimado, EP= erro puro, t= coeficiente, p= nível de significância

Dentre os fatores estudados, a concentração de etanol afetou negativamente a porcentagem de inibição, diminuindo-a em 31%; enquanto que o tempo de extração influenciou de maneira positiva a variável dependente estudada, com um aumento de 20% (Tabela 5).

A inibição ocasionada pelo extrato de arroz variou linearmente com o aumento da concentração de etanol e do tempo de extração. A combinação das variáveis etanol e cultivar apresentou efeito negativo; enquanto que variedade e tempo de extração obtiveram efeito positivo sobre a inibição. A Tabela 6 apresenta os efeitos sobre a inibição da amilase fúngica ocasionada pelo extrato obtido com arroz.

Tabela 6 Efeitos sobre a resposta porcentagem de inibição (% I) ocasionada pelo extrato alcoólico de arroz

Fatores	CR	EE	EP	t (9)	p
Média	53,369	53,369	0,749	71,295	0,0000
Etanol ( $x_1$ )	8,101	16,200	1,834	8,835	0,0000
Cultivar ( $x_2$ )	-9,479	-18,957	1,834	-10,339	0,0000
Tempo extração ( $x_3$ )	7,692	15,383	1,834	8,389	0,0000
$x_1 \times x_2$	-13,716	-27,431	2,593	-10,578	0,0000
$x_1 \times x_3$	-0,312	-0,624	2,750	0,227	0,8256
$x_2 \times x_3$	8,485	16,969	2,593	6,544	0,0001

CR= coeficiente de regressão, EE= efeito estimado, EP= erro puro, t= coeficiente, p= nível de significância

Os dados de ANOVA não possibilitaram a obtenção do modelo matemático, em função da falta de ajuste dos dados para trigo ( $R^2= 0,61$ ) e arroz ( $R^2= 0,68$ ).

Os experimentos realizados permitiram verificar que ao aumentar o tempo de contato entre o solvente e amostra, a maior eficiência na obtenção dos inibidores foi para os cereais aveia e trigo, desde que as quantidades desse solvente sejam renovadas após certo intervalo de tempo, garantindo a não saturação dele. Foi observado também que os extratos de arroz apresentaram comportamento diferente dos demais cereais estudados pois os melhores resultados na extração destes inibidores foram observadas com etanol 95%, semelhante ao reportado por Figueira et al (2003) em grãos de milho, indicando que estes cereais possuem inibidores protéicos com maior hidrofobicidade quando comparado aos presentes na aveia e trigo, que podiam ser extraídos com álcool mais hidratado.

Os inibidores extraídos em soluções alcoólicas na faixa de concentração entre 70 a 80% contém algumas proteínas de reserva dos cereais e também inibidores de protease (RICHARDSON, 1991). Considerando a classificação de Osborne (1924), os inibidores extraídos de aveia, trigo e arroz podem ser classificados como prolaminas, pois apresentaram inibição específica média das cultivares de 61,7; 33,3 e 18,1 para arroz, aveia e trigo, respectivamente, expressos em % I  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}$  proteína $^{-1}$ .

A atividade inibidora de amilase dos extratos estudados pode constituir um mecanismo natural de defesa contra o ataque fúngico, uma vez que foram estimados seus efeitos empregando amilase fúngica.

Os resultados mostraram que todos os cereais apresentam potenciais inibidores de amilase e que estudos mais aprofundados podem auxiliar na obtenção de condições para melhor manifestação e emprego desta propriedade para garantir a segurança alimentar.

#### 4 CONCLUSÃO

A extração de inibidores enzimáticos de algumas variedades de cereais cultivados na região Sul do Brasil foi possível, sendo que a melhor condição para aveia e trigo foi obtida ao utilizar o sistema de extração etanol 70% e 12 horas de agitação, com inibição em torno de 90%. Nas cultivares de arroz, o extrato bruto inibiu 96% da ação da enzima amilase em ensaios *in vitro*, quando se empregou como extrator etanol 95% e 7 h de extração. Todas as cultivares de aveia e trigo foram boas fontes de inibidores enzimáticos, enquanto que o arroz BR 410 se destacou, apresentando atividade inibitória 2,5 vezes superior aos demais cereais estudados.

## REFERÊNCIAS

- , E.; GARDA-BUFFON, J. BADIALE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-e Toxin in Malt Amylase Activity. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*, v. 53, n. 3, 2010.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.
- BONIGLIA, C.; CARRATÙ, B.; DI STEFANO, S.; GIAMMAROLI, S.; MOSCA, M.; SANZINI, E. Lectins, trypsin and  $\alpha$ -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 689-693, 2008.
- DE SOUZA, C.E.M. **Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação de hidroclorotrizina e cimetidina em plasma humano e aplicação em estudos de farmacocinética comparada**. Pernambuco: UFPe, 2008. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a Hydrophobic Amylase Inhibitor from Corn (*Zea mays*) Seeds with Activity Against Amylase from *Fusarium verticillioides*. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 8, p. 917-922, 2003.
- GIBBS, B.F.; ALLI, I. Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 31, n.3, p.217-225, 1998
- IULEK, J.; FRANCO, L.O.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C.T.; BLOCH, C.Jr.; RIGDEN, D.J.; SÁ, M.F.G.de. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, p. 1195–1204, 2000.
- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Phage display of a double-headed proteinase inhibitor: analysis of binding domains of potato proteinase inhibitor II. **Molecular Breeding**, v.1, n.2, p. 181-191, 1995.
- KADOZAWA, P.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.L. Inibidores de enzimas contra *Fusarium moniliforme* durante a germinação de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 249-258, 2002.
- LANDRY, J. Comparison of extraction methods for evaluating zein content of maize grain. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 188-189, 1997.
- LUZ, C.A.S.; DA LUZ, M.L.G.S.; BIZZI, L.T.; FALK, L.C.; ISQUIERDO, E.P.; LOREGIAN, R. Relações granulométricas no processo de brunimento de arroz. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v.25, n.1, p.214-221, jan./abr. 2005.
- MARSARO-JÚNIOR, A.L; LAZZARI, S.M.N.; FIGUEIRA, E.L.Z; HIROOKA, E. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n.3, p. 443-450, 2005.
- McKEVITH, B. Nutricional aspects of cereal. **Nutrition Bulletin**, v. 29, p. 111-142, 2004.
- MIRANDA, M.Z.; MORI, C.; LORINI, I. **Qualidade do trigo brasileiro – safra 2004**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 92 p.
- MOSCA, M.; BONIGLIA, C.; CARRATU, B.; GIAMMARIOLI, S.; NERA, V.; SANZINI, E. Determination of  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 192-195, 2008.
- MOTOMURA, M.; LOURENÇO, C.E.; VENTURINI, D.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Screening and isolation of anti- *Fusarium moniliforme* compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.213-217, 1996.

MUNDY, J.; HEJGAARD, J.; SVENDSEN, J. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous alpha-amylase and subtilisin. **FEBBES Letters**, v.167, p. 210-214, 1984.

NAKASE, M.; ADACHI, T.; URISU, A.; MIYASHITA, T.; ALVAREZ, .M.; NAGASAKA, S.; AOKI, N.; MATSUDA, T. Rice (*Oryza sativa* L.)  $\alpha$ -amylase inhibitors of 14-16 kda are potential allergens and products of a multigene family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2624-2628, 1996.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2 ed. London: Longmans, 1924. 154 p.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 171-180, 2004.

POMPERMAYER, P.; et al. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, n.1, p. 79-85, 2001.

RICHARDSON, M.; CAMPO, F.A.P; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M.L.R; MAIA, G.M.C; YARWOOD, A. The amino acid sequence and relative (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE 5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochemical and Biophysical Acta**, v.. 872, p. 134-140, 1986.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 145– 156, 2003.

VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA, J.W.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Activity of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive  $\alpha$ -amylase of the coffee berry borer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2315-2320, 2008.

## **AMILASE FÚNGICA COMO INDICADOR DA PRESENÇA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**



## RESUMO

A busca pela correlação entre os inibidores e sua seletividade para diferentes amilases torna-se necessária no estudo de identificação da estrutura química e afinidade biológica. Baseado nisso, o objetivo do trabalho foi caracterizar a alfa-amilase comercial produzida por *Aspergillus oryzae* (Fungamyl®), para empregá-la como indicativo da presença de inibidores enzimáticos nos tecidos desses cereais. Amostras de grãos de aveia, trigo e arroz foram moídas, peneiradas e submetidas ao teste de especificidade enzimática. A partir desses resultados, a enzima Fungamyl®, com atividade específica de 20 mg amido hidrolisado mL<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> foi caracterizada bioquimicamente para fornecer os parâmetros necessários ao estudo sobre inibidores. As melhores condições de atuação dos extratos inibidores de arroz e aveia foram em pH 7, enquanto que para o extrato inibidor de trigo o pH 6 foi mais eficaz. Todos os extratos foram estáveis em pH na faixa de 6 a 7 e temperatura de 25 °C e a cinética de inibição permitiu classificá-los como inibidores do tipo mistos. Os resultados indicaram que o estabelecimento da especificidade do inibidor para uma enzima fúngica e a caracterização das propriedades químicas de ambos são importantes ferramentas para a continuidade do estudo da resistência dos cereais ao ataque fúngico.

Palavras-chave: extrato inibidor, enzima, seletividade, caracterização bioquímica.

## ABSTRACT

The search for correlation between the inhibitors and their selectivity for different amylases becomes necessary to study the identification of chemical structure and biological affinity. Based on this, the aim of this study was to characterize the commercial alpha-amylase produced by *Aspergillus oryzae* (Fungamyl ®), to use it as indicative of the presence of enzyme inhibitors in the tissues of cereals. Samples of oat, wheat and rice were milled, homogeneous and subjected to analysis of enzyme specificity. From these results, the enzyme Fungamyl ®, with specific activity of 20 mg starch hydrolyzed mg<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> protein was characterized **biochemically** to provide the parameters needed to study about inhibitors. The best conditions of activity to extract the enzymatic inhibitor from rice and oat were at pH 7, while for wheat inhibitor extract pH 6 was more effective. The optimum pH all extracts were given as in the range of 6-7 and temperature at 25 ° C, the inhibition kinetics allowed us to classify them as mixed type inhibitors. The results indicated that the establishment of the specificity of an enzyme inhibitor for fungal and characterization of the chemical properties of both are important tools for the continuing study of the resistance of cereals to fungal attack.

**Keywords:** extract inhibitor, enzyme ,selectivity, biochemical characterization.

## 1 INTRODUÇÃO

A alfa-amilase é uma endoenzima que catalisa a hidrólise de ligações alfa-1,4 do amido, amilose, amilopectina e glicogênio; são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e animais, permitindo a assimilação de mono e oligossacarídeos como fonte de energia (IULEK et al, 2000). Para realizar suas funções catalíticas, as enzimas possuem estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e pela ação de catalisadores promover a quebra das ligações glicosídicas (TERASHIMA et al, 1996).

A Fungamyl® é uma  $\alpha$ -amilase produzida durante fermentação com *Aspergillus oryzae*, cuja estrutura é estabilizada em presença de íons cálcio. A inter-relação da atividade enzimática com pH e temperatura são fundamentais para o uso de enzimas para diferentes fins, pois permite emprego no máximo potencial de atuação.

O estudo de inibidores de amilase é fundamental em vários campos na área da saúde humana envolvendo o controle de diabetes, obesidade, aspectos nutricionais e toxicológicos dos alimentos (LAYER, CARLSON e DIMAGNO, 1985); além de representar uma importante ferramenta da engenharia genética como fator de resistência a pragas e patógenos (CARLINI e GROSSI DE SÁ, 2002; GATEHOUSE e GATEHOUSE, 1998; LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; VALENCIA et al, 2000).

Esses inibidores e outros compostos envolvidos no mecanismo de defesa estão presente nas plantas de forma natural. Diante disso, é esperado que estas proteínas, independente de sua origem, desempenhem sua função biológica em resposta ao ataque de patógenos na planta, tornando-a resistente (FRANCO et al, 2000; MEDINA, HUERAS e CARBONERA, 1993).

Os cereais desenvolveram mecanismos para prevenir o ataque de pragas como a, síntese de uma gama de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas, produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteases e a síntese de inibidores resistentes à lise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo do patógeno (CHRISTELLER et al, 1992; RAKWAL et al, 2001; ROY e GUPTA, 2000). Em contrapartida, os insetos e micro-organismos desenvolveram maneiras de superar os efeitos negativos causados pelos inibidores protéicos presentes em plantas e cereais, incluindo o aumento da atividade de enzimas, modificação da atividade relativa de várias hidrolases digestivas (PAULILLO et al, 2000), a quebra de inibidores via proteinases e diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores via formação de oligômeros de alto peso molecular insensível aos inibidores protéicos (PEREIRA et al, 2005).

Inibidores de amilase são abundantes em legumes, tubérculos e cereais (FRANCO et al 2002; IULEK et al, 2000; REKHA e PADMAJJA, 2002). Entre os cereais, destacam-se os

inibidores obtidos de trigo, cevada, sorgo, centeio e arroz (ABES, SIDENIUS e SVENSSON, 1993; BLOCH e RICHARDSON, 1991; FENG et al, 1996; IULEK et al, 2000; LYONS, RICHARDSON e TATHAM, 1987; SANCHEZ-MONGE et al, 1992; YAMAGATA et al, 1998).

Para a obtenção de correlação entre as variações na estrutura dos inibidores e sua seletividade para diferentes amilases é necessário identificar a estrutura química e a afinidade biológica. As pragas que atacam os grãos podem se tornar resistentes aos inibidores tornando importante a realização de estudos que correlacionem a sua estrutura com a seletividade, para alterar a atividade desses inibidores em resposta à adaptação dos predadores (FENG, 1996).

Estudos relacionados às propriedades de interação proteína-proteína e a demonstração de novos resíduos que ocasionam interação entre inibidor e enzima proporcionam o conhecimento de inibidores altamente específicos, mostrando ser um passo eficiente e seguro para o desenvolvimento de cereais mais resistentes (PEREIRA, 2005; RICHARDSON, 1981).

Esses inibidores são compostos por uma sequência de 120-130 aminoácidos e normalmente possuem resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto, tornando-os resistentes ao tratamento térmico e a valores extremos de pH (ODA et al, 1997). A literatura relata que inibidores isolados de grãos de trigo apresentam uma complexa mistura de polipeptídeos com massa molecular entre 13-14 kDa, sendo que muitos são capazes de inibir a alfa-amilase (SILANO, 1987).

Iulek et al (2000) utilizaram a cromatografia de troca iônica, com coluna CM-celulose para purificar e caracterizar um inibidor de amilase extraído da semente de centeio. Na purificação do inibidor de grãos de arroz, Nakase et al (1996) utilizaram a cromatografia de troca iônica, coluna DEAE-celulose, seguida de HPLC. A eletroforese em gel (SDS-PAGE) foi o método usado para purificar os inibidores extraídos de sementes de trigo, conforme reportado por Beliën et al. (2005). Inibidores de  $\alpha$ -amilase foram separados e purificados a partir de várias fontes e caracterizados (CHOUDHURY et al, 1996). Alguns métodos utilizam tratamento térmico, diálise e cromatografia por DEAE-celulose ou CM-celulose. Embora essas técnicas tenham sido bem sucedidas, ainda existem inconvenientes para sua aplicação em larga escala, devido ao alto custo das instalações (CHEN et al, 2008).

O objetivo do trabalho foi caracterizar a alfa-amilase fúngica comercial (Fungamyl®), para empregá-la como indicativo da presença de inibidores enzimáticos nos tecidos de arroz, aveia e trigo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos e estudo da especificidade

A amostra de arroz (*Oryza sativa* L.) foi fornecida pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), aveia (*Avena sativa* L.) pela Universidade de Passo Fundo e trigo (*Triticum aestivum* L.) pela empresa OR Melhoramento de Sementes. Todas foram moídas em moinho de facas e peneiradas à granulometria de 42 mesh.

As cultivares utilizadas para os ensaios, umidade, cinética e caracterização foram: arroz BR 424, aveia UPFA 22 Temprana e trigo Safira.

A extração dos inibidores foi realizada homogeneizando a amostra com solvente na proporção 1:5 etanol 70 % para aveia e trigo e 95 % para arroz durante 12 horas dividido em 8 h + 2 h + 2 h. Após a primeira extração com 25 mL de etanol, a suspensão foi centrifugada a 2250 G durante 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante recolhido. Ao precipitado, foram adicionados 10 mL de solvente e a extração foi reiniciada por um período menor (2 h), centrifugada e o sobrenadante recolhido a cada intervalo de agitação. As alíquotas de cada extração foram homogeneizadas, filtradas e empregadas no teste de inibição enzimática, em duplicata.

A especificidade dos extratos inibidores foi avaliada também para a  $\alpha$ -amilase obtida de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl), *Bacillus licheniformis* (Termamyl), extraída de aveia, arroz e trigo,  $\alpha$ -amilase extraída do pâncreas suíno (pancreatina) e amiloglicosidase de *Aspergillus awamori* NRLL 3112. O inibidor (0,2 mL) foi incubado por 30 min a 25 °C com seu respectivo tampão; para inibidor de aveia e arroz, citrato pH 6 e para o inibidor de trigo, tampão Tris-HCl pH 7.

Os extratos (0,2 mL) contendo inibidores de amilase foram incubados com as enzimas em estudo (1 mL) e tampão acetato de sódio pH 7,0 (1 mL) durante 30 min a 25 °C. Em seguida foi adicionado uma solução com 0,5 mL de amido solúvel 0,5 %, que foram incubadas por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1N. O amido residual foi quantificado por iodometria, sendo a absorvância do complexo medida a 620 nm. A quantidade de amido hidrolisado pela enzima na ausência do inibidor foi considerada a velocidade máxima da reação, expressa em  $\mu\text{g amido mL amostra}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e os resultados analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias.

O controle da reação foi preparado substituindo a enzima pelo volume equivalente em água destilada. No controle de enzima o amido foi substituído pelo volume equivalente com água destilada.

## 2.2 Caracterização bioquímica da amilase fúngica

A alfa-amilase fúngica utilizada foi a Fungamyl® 800L (Novozymes, Araucária, PR, Brasil), extraído do fungo *Aspergillus oryzae*, na concentração de 0,5 µL mL<sup>-1</sup>.

A metodologia de determinação da atividade enzimática baseou-se na reação de hidrólise do amido, utilizando o método iodométrico (BARAJ, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2008).

Uma solução de enzima fúngica (1:2000 v/v) foi incubada com tampão citrato de sódio pH 5 em banho termostático na temperatura de 25 °C durante 30 min. A esta, foi adicionado 1 mL de amido solúvel 1 % (p/v) e após 30 min a 25 °C, a reação foi interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1N.

A quantidade de amido hidrolisado pode ser calculada através da diferença entre as medidas de absorvância da solução de controle e das amostras, determinadas a 620 nm, em espectrofotômetro (Varian Cary 100), após a adição de 0,1 mL de solução de iodo. Sendo o controle um reator onde se realizou a adição do HCl antes da solução de amido para que a coloração obtida fosse determinada como tempo zero, indicando a presença ou ausência de atividade enzimática.

A atividade específica (UA) de α-amilase foi estimada pela degradação do amido quantificado por método iodométrico “com modificações” e os resultados analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas como significativas quando  $p < 0,05$ .

A caracterização do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizada adotando-se as temperaturas de incubação da enzima de 25, 35, 45 e 60 °C durante 30 min, seguido da quantificação da atividade enzimática.

A estabilidade térmica da enzima foi realizada empregando uma alíquota de 1 mL da enzima incubada em banho termostático nas temperaturas de 25 °C, 35 °C, 45 °C e 60 °C, com amostras coletadas nos intervalos de tempo de 30, 60 e 90 minutos, para aferição da atividade, medida de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Para verificar o comportamento da enzima após tratamento com diferentes pHs, foram tomadas alíquotas de 1mL de solução enzimática e a elas foi adicionado o tampão com o pH desejado para a realização da medida de atividade enzimática. Esses tampões foram: para pH 3 - 4: tampão acetato de sódio; para pH 5 - 6: tampão citrato de sódio; para pH 7 - 8: tampão tris-HCl.

A estabilidade em diferentes pHs foi estimada empregando uma alíquota de 1 mL da enzima incubada a 25 °C com diferentes tampões de atividade, com amostras coletadas nos intervalos de tempo de 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min, para determinação da atividade enzimática.

### 2.3 Caracterização dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos

A estabilidade do extrato bruto contendo o inibidor enzimático proveniente do procedimento de extração de maior eficiência foi acompanhada durante armazenagem a -5 °C foi avaliada em um período de 60 dias em frações de 500 µL. Em cada teste uma alíquota foi descongelada e o ensaio de atividade inibitória foi realizado.

Os grãos inteiros também foram submetidos às umidades de 20, 50 e 80 % em câmara de germinação nos tempos 0, 1, 2, 4 e 8 dias a 25 °C e secas em estufa de circulação de ar a 50 °C. Posteriormente foram moídas em moinho de facas até a granulometria de 32 mesh para análise de acordo com o item 2.2. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Para a quantidade de água a ser adicionada (M), considerou-se a umidade inicial de cada cereal (dados não apresentados) e a umidade final desejada, neste caso, 20, 50 e 80%, de acordo com a Equação 1:

$$(100 - \textit{umidade inicial}) \times 100 = M \times ((100 - \textit{umidade desejada})) \quad (\text{Eq. 1})$$

O efeito da temperatura sobre a ação do inibidor foi avaliado através de tratamento térmico a 25, 35, 45 e 60 °C, seguido por incubação da mistura extrato e enzima no pH ótimo. No caso do efeito do pH sobre os extratos de arroz, aveia e trigo em diferentes pHs foi determinado incubando a enzima e o inibidor nos seguintes tampões: acetato de sódio (pH 3 e 4), citrato de sódio (pH 5 e 6) e tris-HCl (pH 7 e 8).

Para o ensaio da termoestabilidade do inibidor, este foi incubado com tampão pH 5 e submetida a temperatura de 25 °C durante 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min. Após esse período, foram retiradas amostras para determinar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperaturas ótimas.

A estabilidade do inibidor enzimático em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o inibidor em tampões com pH variando de 3 a 8, a 25 °C, durante 30 minutos.

Em todos os casos, a atividade inibitória foi estimada conforme o descrito no item 2.1.

### 2.4 Estudo do mecanismo e da constante de inibição enzimática

Para a determinação do mecanismo de inibição os ensaios foram realizados como descrito no item 2.1.

O controle sem o inibidor foi realizado com alíquotas de 3 mL de solução de amilase fúngica (0,5 µL mL<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas por 30 min a 25 °C em concentrações crescentes de 2,5 µL mL<sup>-1</sup>, 5 µL mL<sup>-1</sup>, 7,5 µL mL<sup>-1</sup> e 10 µL mL<sup>-1</sup> de substrato específico (amido), livres da fração inibidora.

A estimativa da fração inibidora foi realizada com alíquotas de 0,2 mL (0,31 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de arroz, 0,58 mg de proteína, mL<sup>-1</sup> extrato de aveia, 0,79 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de trigo), 0,3 mL (0,47 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de arroz, 0,87 mg de proteína, mL<sup>-1</sup> extrato de aveia, 1,19 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de trigo) e 0,5 mL (0,78 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de arroz, 1,45 mg de proteína, mL<sup>-1</sup> extrato de aveia, 1,96 mg proteína mL<sup>-1</sup> extrato de trigo) que foram incubadas com 1 mL de solução de amido em diversas concentrações (2,5 µL mL<sup>-1</sup>, 5 µL mL<sup>-1</sup>, 7,5 µL mL<sup>-1</sup> e 10 µL mL<sup>-1</sup>).

O valor da constante de inibição (K<sub>i</sub>) foi determinado pelo gráfico de Lineweaver-Burk de acordo com Dixon et al (1979). O eixo das ordenadas (Y) corresponde aos valores do intercepto e da inclinação obtidos pela determinação do mecanismo de inibição citado anteriormente, onde os valores do intercepto correspondem a 1/V<sub>max</sub>. Os valores das abcissas (X) correspondem às diferentes quantidades de inibidor. Os experimentos foram realizados em duplicata, em dias alternados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estudo da especificidade

Os inibidores extraídos de arroz, aveia e trigo apresentaram a maior capacidade de inibição sobre a enzima comercial obtida de *Aspergillus oryzae*, com valores de 19,5; 16,5 e 24,1 expressos em atividade específica, respectivamente (Tabela 1).

O extrato inibidor de trigo apresentou maior especificidade com amilase fúngica que os demais. Isso é comprovado ao comparar os resultados de atividade específica obtidos com outras fontes enzimáticas, pois para a amiloglicosidase, também obtida de um fungo e amilase bacteriana (Termamyl) o valor foi cerca de 6 e 9 vezes inferiores. Figueira et al (2003) também realizaram um estudo da especificidade de inibidores obtidos de milho e verificaram que a maior atividade específica foi obtida com o uso de amilase extraída de *Fusarium verticillioides*, com valor de atividade específica de 126. As amilases obtidas do pâncreas suíno e de grãos de arroz praticamente não foram inibidas com o uso de inibidor de trigo, enquanto que Figueira e colaboradores (2003) tenham obtido bons resultados como uso de amilase pancreática suína. Cabe salientar que os autores não verificaram atividade específica com o uso de amilase salivar e pancreática humana.

Os inibidores de arroz e trigo apresentaram comportamento semelhante, pois ambos foram eficientes na inibição da amiloglicosidase e Termamyl, sendo que a menor inibição foi verificada para a amilase pancreática suína (pancreatina).

Os inibidores não apresentaram boa capacidade de inibição da amilase extraída dos cereais. Isso reforça a idéia que estas substâncias atuam apenas contra espécies que podem ocasionar perdas aos grãos, agindo como um eficiente mecanismo de defesa.



Atividades inibitórias de proteínas purificadas de arroz com amilase salivar humana e de *Bacillus amyloliquefaciens* foram testadas, sendo que esse inibidor foi eficaz apenas para a amilase salivar, indicando seletividade para a enzima obtida de mamíferos (NAKASE et al, 1996).

A especificidade de inibidores obtidos de centeio foi testada com enzima salivar humana e extraída de inseto, dentre outras, verificando se este inibidor apresentou atividade com ambas, mas maior afinidade foi verificada para a segunda enzima citada. De acordo com Lulek et al (2000), este comportamento pode ser explicado em função da sequência de aminoácidos e estrutura tanto da enzima quanto do inibidor.

Tabela 1 Especificidade dos extratos contendo inibidores enzimáticos determinada com amilases de diferentes fontes

Enzima	Inibidor de arroz <sup>1,2</sup>	Inibidor de aveia <sup>1,2</sup>	Inibidor de trigo <sup>1,2</sup>
Fungamyl	19,50 ± 1,2 <sup>a</sup>	16,50 ± 0,1 <sup>A</sup>	24,05 ± 0,4 <sup>1</sup>
Amiloglucosidase	11,23 ± 1,1 <sup>b</sup>	14,09 ± 0,3 <sup>B</sup>	4,36 ± 0,2 <sup>2</sup>
Termamyl	11,19 ± 0,8 <sup>b</sup>	15,88 ± 0,1 <sup>A</sup>	2,66 ± 0,1 <sup>3</sup>
Pancreatina	0,32 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,79 ± 0,1 <sup>D</sup>	0,26 ± 0,1 <sup>4,5</sup>
Amilase arroz	2,90 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,68 ± 0,2 <sup>C</sup>	0,12 ± 0,5 <sup>5</sup>
Amilase aveia	2,10 ± 0,3 <sup>c</sup>	3,46 ± 0,4 <sup>C</sup>	1,13 ± 0,1 <sup>4</sup>
Amilase trigo	1,54 ± 0,332 <sup>c</sup>	2,86 ± 0,4 <sup>C</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Média ±desvio-padrão. Médias seguidas de letras/ números diferentes apresentam diferença significativa na mesma coluna através do Teste de Tukey a um nível de significância de 0,05. <sup>2</sup> Resultados expressos em mg amido hidrolisado mL<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

Os resultados mostraram que a Fungamyl pode ser usada como indicador da presença de inibidores enzimáticos de amilase e promissora para avaliar a resistência vegetal ao ataque fúngico.

### 3.2 Caracterização da amilase fúngica comercial

Figueira et al (2000) ao estudarem a produção de amilase por *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* verificaram que a atividade amilásica tendeu ao máximo na proximidade dos 40 °C e pH 5,5 e 6,7, respectivamente.

O uso de tampão citrato pH 5 resultou em uma atividade específica superior aos demais, conforme a Tabela 2.

A menor atividade específica da amilase fúngica foi verificada com o tampão Tris/ HCl pH 8, comprovando que este tampão, além de não estar naturalmente no meio ambiente e possuir característica básica, não seria o mais indicado para avaliar a ação da

enzima. As condições de pH 5 (Tabela 2) e temperatura de 25 °C foram ideais para a complexação da alfa-amilase fúngica com o substrato utilizado (amido), conforme demonstrado pela menor concentração de amido residual.

Tabela 2 Atividade específica da amilase fúngica em diferentes tampões

Tampão	Atividade específica (mg amido hidrolisado/mg proteína.min)
Tris/HCl pH 8	6,7 <sup>b</sup>
Tris/HCl pH 7	7,3 <sup>a,b</sup>
Citrato pH 6	7,3 <sup>a,b</sup>
Acetato pH 4	7,4 <sup>a,b</sup>
Acetato pH 3	8,0 <sup>a,b</sup>
Citrato pH 5	10,2 <sup>a</sup>

Em função da necessidade de realizar os procedimentos com as melhores condições de atuação tanto da enzima quanto do inibidor, o tampão de trabalho selecionado foi o pH 7, com atividade específica de 7,3, estatisticamente igual ao tampão citrato pH 5 e 6, sugerindo que a amilase fúngica pode conter mais de um tipo de unidade protéica que realiza a hidrólise do amido.

Num estudo realizado por Guandalini (2007) a atividade enzimática de amilase obtida do fungo *Metarhizium anisopliae* apresentou melhor atuação em pH 5. A enzima também foi analisada quanto à temperatura, indicando que a 50 °C o valor de atividade enzimática foi ótimo.

Frovolá et al (2001) estudaram a amilase produzida pelo fungo *Aspergillus flavipes* a máxima atividade foi verificada na faixa de temperatura entre 30 a 50 °C, mantendo seu valor durante 30 min a 50 °C e perdendo cerca de 30% da atividade aos 60 °C. Essa mesma enzima apresentou estabilidade e produtividade elevada quando inibidor de tripsina foi adicionado ao meio de cultura.

O estudo da enzima quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura mostrou que a alfa-amilase apresentou melhor estabilidade inicial em pH 6 e valores extremos de pH ocasionaram maiores alterações nessa estabilidade, conforme o esperado. Ao avaliar o pH ótimo (5,0), a enzima foi estável ao aumentar o tempo de reação até 180 min, apresentando pouca oscilação. No pH 6, a oscilação da atividade específica foi menor. Fato semelhante foi reportado por Guandalini (2007), onde a amilase manteve sua maior atividade na faixa de pH entre 5 a 6,5.

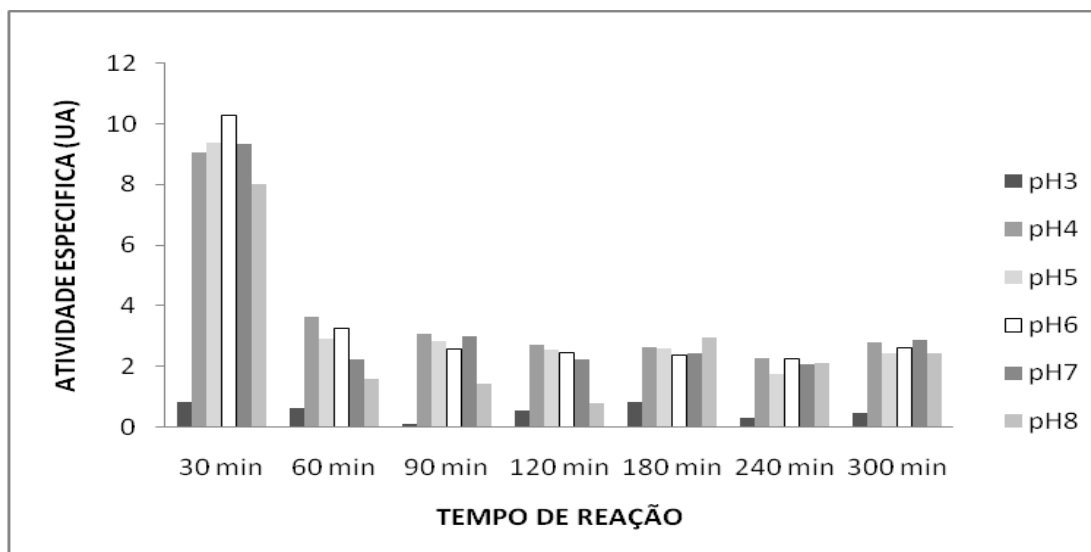


Figura 1 Estabilidade da amilase fúngica em diferentes pHs.

A atividade específica no pH 5 teve seu máximo entre 25 e 35°C no tempo de 30 minutos, com valor próximo de 3 mg enzima min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>; ao exceder essa temperatura ocorreu um declínio na atividade, sendo que em 60 °C a enzima foi praticamente inativada. Esses resultados diferem dos encontrados por Guandalini (2007), que ao estudar a estabilidade térmica de amilase obtida de outra espécie fúngica, o valor foi entre 10 °C a 50 °C. De acordo com Figueira et al (2000) a máxima estabilidade térmica de *Fusarium moniliforme* ocorreu na região próxima a 21 °C, semelhante ao verificado neste estudo.

Os resultados apresentados demonstraram constância na atividade enzimática na melhor temperatura (25 °C), fato que viabiliza o ensaio com inibidores enzimáticos, cuja reação inicia-se com pré-incubação da enzima e do inibidor (ODA et al, 1997) no intervalo de tempo utilizado na avaliação da estabilidade.

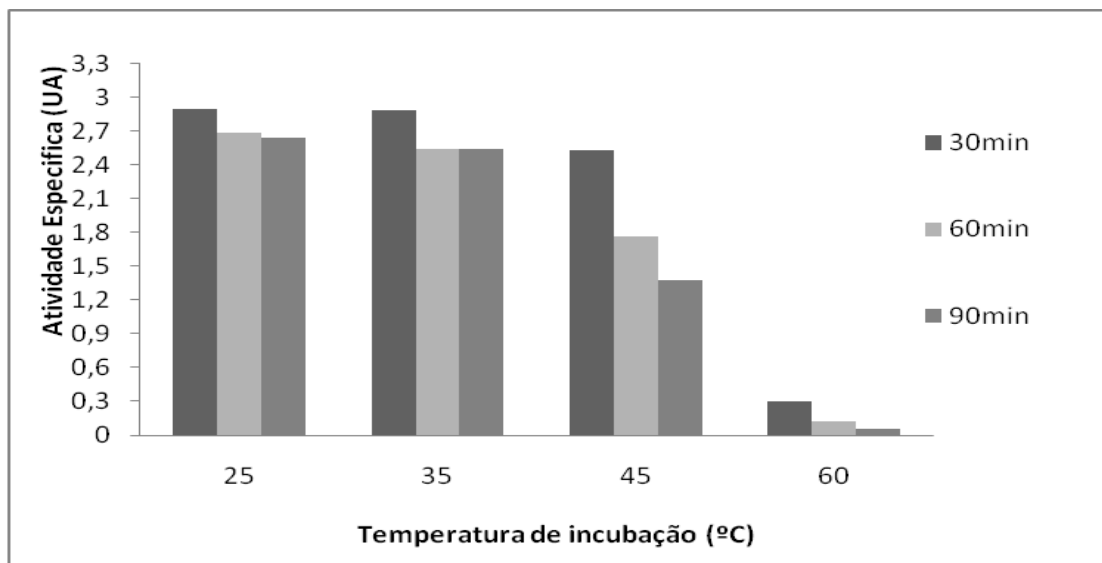


Figura 2 Estabilidade da amilase fúngica em diferentes temperaturas de incubação.

Em termos práticos, os resultados da caracterização reforçam que a amilase comercial pode ser empregada na substituição à enzima extraída de fungos, pois ambas tem como utilidade fornecer subsídio adequado para o estudo de inibidores enzimáticos, visando controle mediante mecanismos naturais de defesa das plantas (FIGUEIRA et al, 2000). Os resultados referentes à caracterização da enzima forneceram os parâmetros necessários ao estudo sobre inibidores, sendo interessante ainda a caracterização do inibidor para complementar a compreensão da interação inibidor- enzima.

### 3.3 Caracterização dos extratos contendo inibidores enzimáticos obtidos de cereais

As estabilidades da atividade dos inibidores de amilase em extratos de trigo (Figura 3), aveia (Figura 4) e arroz (Figura 5) durante armazenagem a -5 °C foram avaliadas num período de 60 dias, com exceção do último, em função da disponibilidade de extrato inibidor.

A maior atividade inicial em extrato de trigo foi observada no tratamento T2, que corresponde ao uso de etanol 70 %, 12 h de extração e cultivar de trigo Safira, justamente as melhores condições selecionadas para a obtenção do extrato contendo o inibidor.

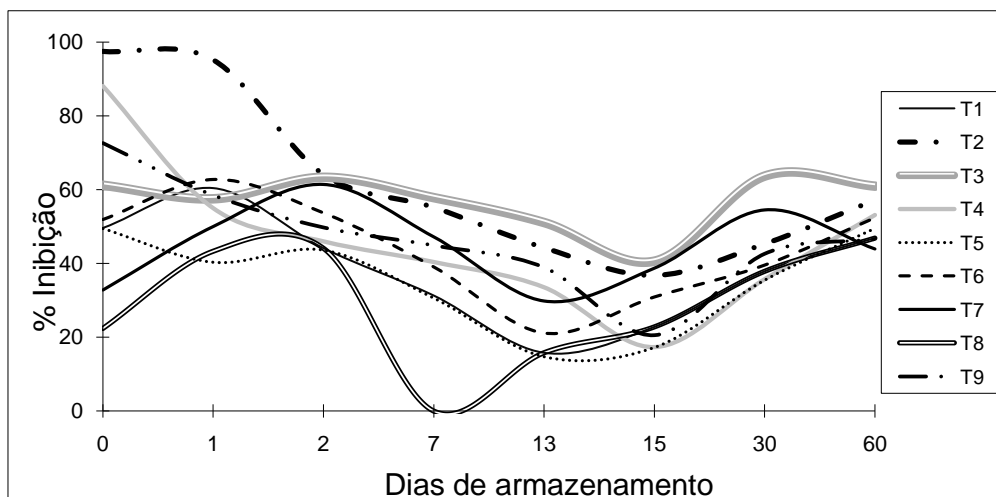


Figura 3 Estabilidade do inibidor extraído de trigo mediante congelamento

T1: etanol 70 %, cultivar Ônix, tempo extração 2 h; T2: etanol 70 %, cultivar Safira, tempo extração 12 h; T3: etanol 70 %, cultivar Pampeano, tempo extração 7 h; T4: etanol 82,5 %, cultivar Ônix, tempo extração 12 h; T5: etanol 82,5 %, cultivar Safira, tempo extração 7 h; T6: etanol 82,5 %, cultivar Pampeano, tempo extração 2 h; T7: etanol 95 %, cultivar Ônix, tempo extração 7 h; T8: etanol 95 %, cultivar Safira, tempo extração 2 h; T9: etanol 95 %, cultivar Pampeano, tempo extração 12 h.

Entre o 2º e 15º dias, a porcentagem de inibição reduziu cerca de 60 % e após 60 dias a redução foi de 40 %. Os tratamentos T1 (etanol 70 %, 2 h de extração e cultivar Ônix), T3 (etanol 70 %, 7 h de extração e cultivar Pampeano), T5 (etanol 82,5 %, 7 h de extração e cultivar Safira) e T6 (etanol 82,5 %, 2 h de extração e cultivar Pampeano) mantiveram a capacidade de inibição ao longo da armazenagem, com valor médio de 50 % para todos os tratamentos. Fato que pode estar relacionado com a concentração de etanol utilizada, visto que a extração com álcool menos hidratado pode aumentar a estabilidade do inibidor.

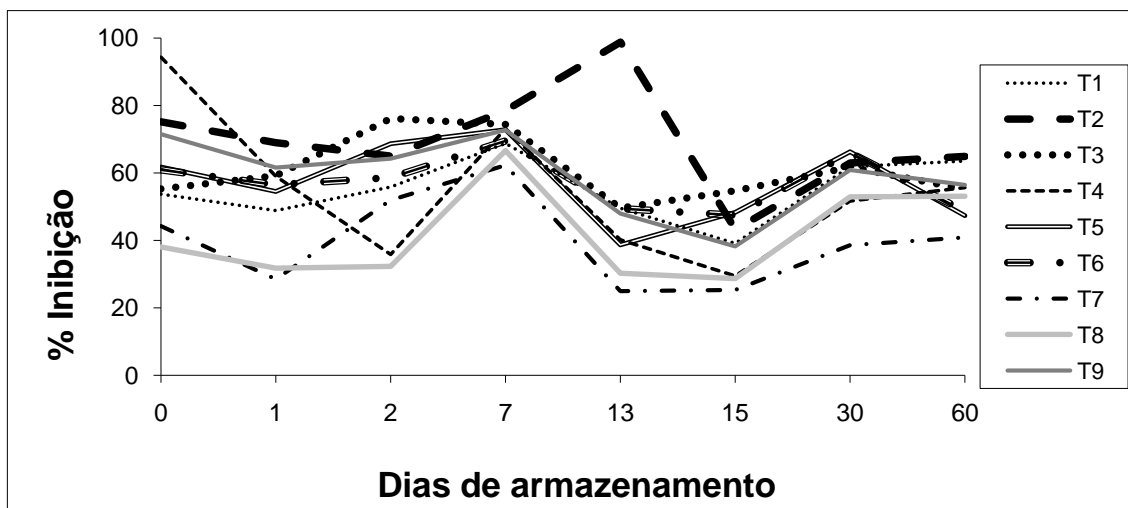


Figura 4 Estabilidade do inibidor extraído de aveia mediante congelamento

T1: etanol 70 %, cultivar Teixeirainha, tempo extração 2 h; T2: etanol 70 %, cultivar Temprana, tempo extração 12 h; T3: etanol 70 %, cultivar Pampa tempo extração 7 h; T4: etanol 82,5 %, cultivar Teixeirainha, tempo extração 12 h; T5: etanol 82,5 %, cultivar Temprana, tempo extração 7 h; T6: etanol 82,5 %, cultivar Pampa, tempo extração 2 h; T7: etanol 95 %, cultivar Teixeirainha, tempo extração 7 h; T8: etanol 95 %, cultivar Temprana, tempo extração 2 h; T9: etanol 95 %, cultivar Pampa, tempo extração 12 h.

Para os extratos de aveia, a maior inibição inicial foi verificada nos tratamentos T4 (etanol 82,5 %, 12 h de extração e cultivar Teixeirainha) e T2 (etanol 70 %, 12 h de extração e cultivar Temprana), sendo que a atividade reduziu 40 % e 11 %, respectivamente, de forma que a porcentagem de inibição manteve-se estável, na maioria dos tratamentos ao longo do período de armazenamento.

De acordo com a Figura 5, o tratamento 7 (etanol 95 %, 12 h de extração e cultivar de arroz BR 410) apresentou máxima capacidade de inibição, mantendo-se estável até o 15º dia. Nos demais experimentos ocorreram aumento da inibição durante o período de armazenamento.

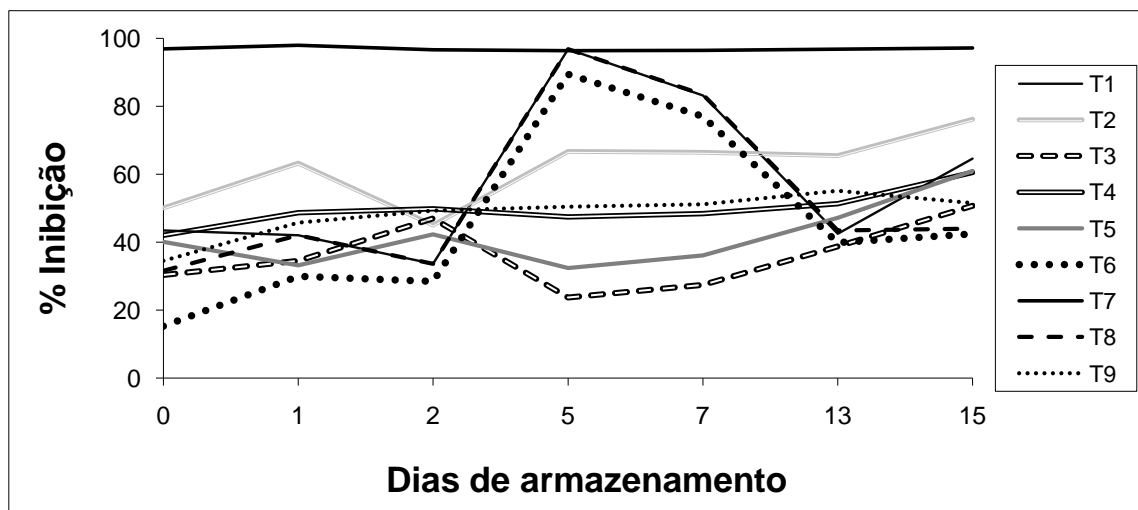


Figura 5 Estabilidade do inibidor extraído de arroz mediante congelamento

T1: etanol 70 %, cultivar BR410, tempo extração 2 h; T2: etanol 70 %, cultivar BR417, tempo extração 12 h; T3: etanol 70 %, cultivar BR424 tempo extração 7 h; T4: etanol 82,5 %, cultivar BR410, tempo extração 12 h; T5: etanol 82,5 %, cultivar BR417, tempo extração 7 h; T6: etanol 82,5 %, cultivar BR424, tempo extração 2 h; T7: etanol 95 %, cultivar BR410, tempo extração 7 h; T8: etanol 95 %, cultivar BR417, tempo extração 2 h; T9: etanol 95 %, cultivar BR424, tempo extração 12 h.

Em estudo realizado por Finardi-Filho (1990) caracterizando inibidores de amilase extraído de feijão (*Phaseolus vulgaris*) na temperatura de 0 °C, cerca de 40 % da estrutura do inibidor se dissociou em presença de agentes químicos, como a uréia e detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e baixa temperatura. Isso está relacionado com as características de ligação de baixa energia, eletrostáticas e dipolo-dipolo, responsáveis pela manutenção da estrutura dos inibidores (WHITAKER, FINARDI-FILHO e LAJOLO, 1988).

Cabe ressaltar que nas melhores condições de extração dos inibidores enzimáticos de arroz, aveia e trigo, o extrato apresentou maior estabilidade. Na literatura são poucos os estudos que relacionam a estabilidade do inibidor de amilase mediante o armazenamento a frio e foi realizado neste trabalho porque é importante avaliar os efeitos decorrentes, visto que em função do procedimento de extração, a amostra precisa ser armazenada sob refrigeração para posterior utilização. Em estudo realizado por Xavier (2006) a atividade de amilase foi reduzindo 14 %, 52 % e 70 % ao longo dos 6 meses de armazenamento.

Ênfase deve ser dada à defesa nas condições naturais de desenvolvimento, onde inicia a integridade da cadeia produtiva de alimentos. Assim é interessante avaliar o efeito da umidade do grão visto que a contaminação dos grãos por micro-organismos de campo pode ocorrer especialmente sob alta umidade e temperatura que podem comprometer a capacidade desses inibidores.

Entre os cereais estudados, a aveia apresentou inibição superior ao arroz e trigo, de 88 % no tempo zero e 65 % ao final do experimento, de acordo com a Tabela 3.

A porcentagem de inibição em arroz foi maior no tempo zero em todas as umidades (20, 50 e 80 %). Ao longo do intervalo estudado a inibição foi diminuindo, mostrando que essas condições de umidade reduzem a eficiência do inibidor. Com isso, fica sugerido que condições climáticas podem alterar a ação preventiva desses inibidores ao ataque fúngico. Esta possibilidade foi bem demonstrada pelo efeito da umidade a 80 % sobre o extrato contendo o inibidor, que apresentava 75 % de inibição no tempo zero e decaía para 26 % no oitavo dia de experimento. A maneira como os cereais foram cultivados também podem influenciar nesses resultados, visto que as cultivares estudadas foram desenvolvidas para atender as condições de cultivo de diferentes estados da região sul do Brasil.

Tabela 3 Percentual de inibição (%) dos extratos de arroz, aveia e trigo sob diferentes condições de umidade e tempo.

Amostra e seus teores de umidade	Dias				
	0	1	2	4	8
Arroz 20 %	69 <sup>b</sup>	13 <sup>i</sup>	26 <sup>h</sup>	41 <sup>e,f,g</sup>	43 <sup>d,e,f</sup>
Arroz 50 %	63 <sup>c</sup>	27 <sup>h</sup>	42 <sup>d,e,f</sup>	41 <sup>e,f,g</sup>	44 <sup>d,e</sup>
Arroz 80 %	75 <sup>a</sup>	36 <sup>g</sup>	38 <sup>f,g</sup>	47 <sup>d</sup>	26 <sup>h</sup>
Aveia 20 %	90 <sup>A</sup>	55 <sup>E</sup>	62 <sup>C,D,E</sup>	66 <sup>C,D,E</sup>	59 <sup>D,E</sup>
Aveia 50 %	88 <sup>A</sup>	58 <sup>E</sup>	83 <sup>A</sup>	78 <sup>A,B,C</sup>	65 <sup>C,D,E</sup>
Aveia 80 %	87 <sup>A</sup>	62 <sup>C,D,E</sup>	83 <sup>A,B</sup>	75 <sup>A,B,C,D</sup>	67 <sup>B,C,D,E</sup>
Trigo 20 %	62 <sup>4,5</sup>	42 <sup>7,8</sup>	56 <sup>5,6</sup>	48 <sup>6,7</sup>	36 <sup>7,8</sup>
Trigo 50 %	71 <sup>3,4</sup>	36 <sup>7,8</sup>	80 <sup>2,3</sup>	95 <sup>1</sup>	78 <sup>2,3</sup>
Trigo 80 %	90 <sup>1</sup>	33 <sup>8</sup>	99 <sup>1</sup>	97 <sup>1</sup>	74 <sup>3,4</sup>

Letras maiúsculas diferem estatisticamente entre si entre as diferentes umidades de arroz. Letras minúsculas diferem estatisticamente entre si entre as diferentes umidades de aveia. Números diferem estatisticamente entre si entre as diferentes umidades de trigo.

Na germinação de sementes de monocotiledôneas, como os cereais, as giberelinas presentes no escutelo se movem para a aleurona, que constitui camada superficial do endosperma e promovem síntese de enzimas hidrolíticas, incluindo as amilases (BOGATEK et al, 2006; COPELAND e MCDONALD, 1995). O processo é dirigido por balanço nos teores de inibidores e promotores ativos, sendo iniciado ao estimular o promotor, que diminui a atividade dos inibidores enzimáticos. Baseado neste mecanismo, a interrupção de processo germinativo provavelmente decorre da inativação de inibidores (KADOZAWA, FIGUEIRA e HIROOKA, 2002). Fato que demonstra, além de outras evidências, que com o aumento do período de armazenamento dos grãos em diferentes condições de umidade, estes ficaram mais propensos à germinação, ocasionando uma redução da atividade dos inibidores.



As umidades de 20, 50 e 80 % não afetaram significativamente os inibidores obtidos de aveia, sugerindo que estes são mais resistentes às variações do ambiente e possivelmente menos susceptíveis a contaminação microbiana, que pode estar relacionado com sua composição química. Outro fator a ser considerado é que há diferenças na síntese enzimática nos estádios que antecedem a maturidade dos grãos, além da relação entre a resistência contra fungos e à presença de proteínas antifúngicas, envolvendo partes específicas da planta (GUO et al, 1999). Cordero et al (1992) demonstraram que na folha de milho ocorria acúmulo de proteínas antifúngicas, após inoculação do patógeno. Em feijão, a maior atividade de inibidores de tripsina ocorria também nas folhas, aumentando conforme o crescimento (WELHAM et al, 1998). Elliot et al, 2003 estudando a atividade inibidora de xilanase não verificaram que esta ocorria em grãos germinados de trigo, indicando possível susceptibilidade perante *Aspergillus niger*.

Neste trabalho o trigo com 20 % de umidade apresentou extrato com menor capacidade de inibição. A maior atividade inibitória foi observada no período de 4 dias de incubação, na umidade de 50 % e 80 %, com inibição superior a 95 %, decaindo em cerca de 70 % ao final do experimento. A crescente atividade inibitória de amilase no trigo com 50 % de umidade pode ser característica inerente do genótipo, que foi capaz de manter elevada atividade do inibidor. Outra hipótese seria a infecção natural por patógenos e a indução na produção de inibidor de trigo.

Conforme os primeiros relatos sobre a estrutura química, os inibidores de amilase possuem de 2 a 4 cadeias peptídicas formando uma estrutura quaternária e a ruptura de tais estruturas é ocasionada pela presença de agentes dissociantes com emprego de temperaturas elevadas (LAJOLO e FINARDI FILHO, 1985)

Os resultados apresentados na Tabela 4 permitiram verificar que inibidores de arroz e aveia apresentam melhores condições de atuação em pH 7, enquanto que para trigo, o pH 6 foi estatisticamente superior aos demais. De maneira geral o uso de pH próximo a neutralidade ou levemente ácido foi o que apresentou maior atividade inibitória.

Outros autores, tais como Gibbs e Ali (1998) ao caracterizar e purificar um inibidor de feijão branco verificaram que a máxima atividade ocorria em pH 6,9. O pH para maior atividade inibitória com inibidores de outras fontes foi entre 4 e 9 (FRELS e RUPNOW, 1985). Figueira et al (2003) obtiveram valores ótimos de inibição extraído de milho em pH 6,5 e a medida em que o pH tornava-se mais básico, menor era a atividade inibitória. Estes compostos foram semelhantes ao deste trabalho.

Tabela 4 Atividade específica do inibidor em diferentes tampões

Tampão	Inibidor de arroz <sup>1,2</sup>	Inibidor de aveia <sup>1,2</sup>	Inibidor de trigo <sup>1,2</sup>
Acetato pH 3	6,612 ± 0,05 <sup>b,c</sup>	2,989 ± 0,05 <sup>F</sup>	7,643 ± 0,00 <sup>3</sup>
Acetato pH 4	6,637 ± 0,03 <sup>b,c</sup>	3,660 ± 0,01 <sup>E</sup>	7,871 ± 0,09 <sup>2,3</sup>
Citrato pH 5	6,464 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,571 ± 0,03 <sup>C</sup>	8,324 ± 0,09 <sup>2</sup>
Citrato pH 6	7,394 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,806 ± 0,00 <sup>B</sup>	9,581 ± 0,00 <sup>1</sup>
Tris- HCl pH 7	8,725 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,034 ± 0,01 <sup>A</sup>	7,386 ± 0,03 <sup>3</sup>
Tris- HCl pH 8	7,142 ± 0,01 <sup>b,c</sup>	3,933 ± 0,00 <sup>D</sup>	5,689 ± 0,06 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Média ±desvio-padrão. Médias seguidas de letras/ números diferentes apresentam diferença significativa na mesma coluna através do Teste de Tukey a um nível de significância de 0,05. <sup>2</sup> Resultados expressos em mg amido hidrolisado mL<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A Figura 6 representa os resultados referentes à estabilidade dos extratos inibidores em seu melhor tampão de atuação, sendo observado que o extrato obtido de trigo apresentou menor estabilidade, pois após a primeira hora inicial houve um grande decréscimo na atividade específica. O comportamento dos extratos de arroz e aveia foi semelhante, pois apesar de apresentarem menor atividade específica inicial, foram estáveis até 120 min.

A estabilidade em diferentes pHs também foi analisada em inibidores de amilase obtidos de milho, sendo que em pH próximo a neutralidade os resultados foram mais satisfatórios (FIGUEIRA et al, 2003). Em estudo de atividade inibitória de amilase com inibidor purificado de trigo, Franco e colaboradores (2000) obtiveram aproximadamente 100% de inibição sobre insetos, em tampão fosfato pH 5,5. A monitorização da estabilidade de inibidores de protease extraído de leguminosas mostrou alta estabilidade em extremos de pH ácido e básico (LOPES, 2006). No entanto, um inibidor de tripsina obtido de vagens verde manteve sua atividade inalterada na faixa de pH entre 2 a 12 (GOMES, 2004). Essas diferenças nos resultados da estabilidade de inibidores de amilase, protease e tripsina reforçam a idéia de que estas substâncias apresentam comportamentos bastante distintos em função do tipo de matéria-prima, enzima e organismo alvo utilizados na extração e nos ensaios de inibição.

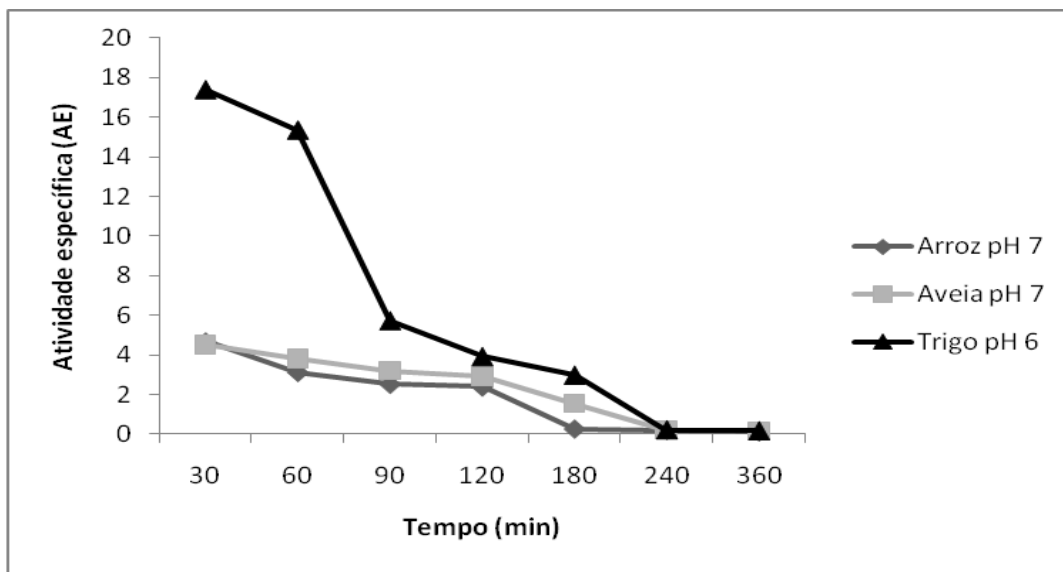


Figura 6 Estabilidades no melhor tampão de atuação dos extratos de arroz, aveia e trigo contendo inibidores enzimáticos

A faixa utilizada para o estudo da temperatura ótima de atuação dos inibidores foi entre 25 °C a 60 °C. De acordo com a Tabela 4, na temperatura de 25 °C a atividade específica de todos os inibidores estudados foi estatisticamente superior às demais.

Tabela 5 Atividade específica em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Inibidor de arroz <sup>1,2</sup>	Inibidor de aveia <sup>1,2</sup>	Inibidor de trigo <sup>1,2</sup>
25	0,68 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,80 ± 0,162 <sup>A</sup>	16,57 ± 0,151 <sup>1</sup>
35	0,42 ± 0,29 <sup>b</sup>	3,42 ± 2,42 <sup>B</sup>	16,56 ± 0,076 <sup>1</sup>
45	0,36 ± 0,25 <sup>c</sup>	4,10 ± 1,07 <sup>B</sup>	12,55 ± 0,175 <sup>2</sup>
60	0,42 ± 0,31 <sup>b</sup>	3,11 ± 1,80 <sup>C</sup>	1,17 ± 0,058 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras/ números diferentes apresentam diferença significativa na mesma coluna através do Teste de Tukey a um nível de significância de 0,05. <sup>2</sup> Resultados expressos em mg amido hidrolisado mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A partir desses resultados, o inibidor foi submetido a ensaio de estabilidade térmica no período de 30 a 300 min, pois na temperatura escolhida (25 °C), tanto o extrato bruto contendo o inibidor quanto a enzima utilizada apresentaram maior atividade.

Na Figura 7 observou-se que o inibidor extraído de arroz, aveia e trigo mantiveram sua atividade máxima durante 30 minutos. A partir de 120 min a atividade reduziu e aos 180 min houve um decréscimo da atividade em aproximadamente 75%. O inibidor extraído da aveia apresentou menor atividade em todo o período de incubação em relação aos demais.

Ao comparar os resultados encontrados neste trabalho com os reportados por Figueira et al (2003), verificou-se que estes autores, ao caracterizar um inibidor de milho obtiveram uma estabilidade na temperatura de 100 °C durante 30 min; enquanto que um

inibidor de feijão foi estável a 80 °C durante 10 min, apresentando alta resistência ao calor, porque após 1 h a atividade inibitória reduziu cerca de 20-30% (VALENCIA-JIMENEZ, VALENCIA e DE-SÁ, 2008).

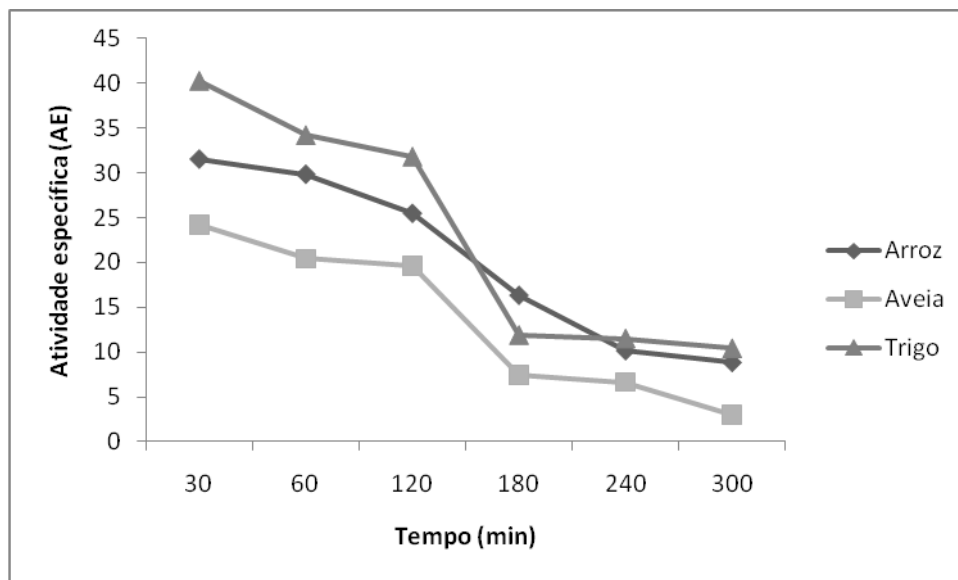


Figura 7 Atividade inibitória (%I) do inibidor de arroz, aveia e trigo após tratamento com diferentes tempos de incubação a 25 °C.

Inibidores de alfa-amilase também foram avaliados sob diferentes formas de processamento, em tubérculos como a batata-doce e inhame, indicando que possuem diferenças quanto à estabilidade térmica. Os inibidores do inhame foram praticamente inativados na temperatura de 90 - 100 °C durante 24 h, enquanto que nas mesmas condições, 10 % da atividade do inibidor da batata-doce foi mantida. A farinha preparada com esses tubérculos manteve pequenas quantidades de inibidor (REKHA e PADMAJA, 2002). Em contraste com esses resultados Tan et al (1984) reportaram que inibidores de tripsina e quimiotripsina extraídos de feijão foram resistentes ao calor a seco e a inativação só foi possível com tratamento térmico úmido.

Os resultados aqui descritos indicaram que a caracterização *in vitro* dos inibidores de amilase obtidos de arroz, aveia e trigo representam um passo importante para a seleção de um inibidor capaz de impedir ou reduzir o ataque de micro-organismos, com base nas suas melhores condições de atuação. Isso reforça a necessidade de caracterizar cada inibidor extraído de diferentes cereais, pois apresentam comportamentos bastante distintos quanto a estabilidade térmica.

### 3.4 Estudo do mecanismo e da constante de inibição enzimática

Após a realização de ensaios com concentrações variáveis de inibidor e substrato (amido) foi construído o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para visualização do

tipo de inibição proporcionada pelos inibidores extraídos de arroz, aveia e trigo, de acordo com as Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

Os parâmetros cinéticos observados na ausência e presença do inibidor de arroz, (Figura 8), ilustraram uma inibição de amilase do tipo incompetitiva no início do experimento; enquanto que na maior concentração de inibidor ocorreu uma diminuição da  $V_{max}$  e aumento do  $K_m$ , característico de uma inibição mista, com um gráfico que forma uma intersecção no quadrante esquerdo (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

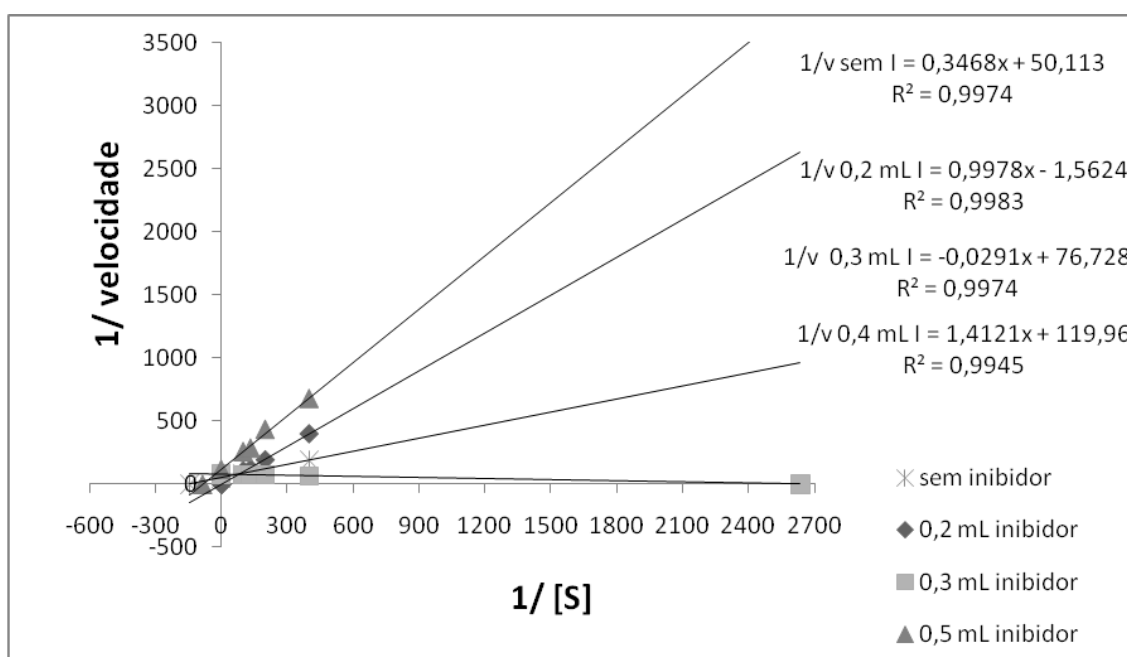


Figura 8 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de arroz

0,2 mL inibidor: 0,31 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,3 mL inibidor: 0,47 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,5 mL inibidor: 0,78 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>.

A Figura 9 representa o gráfico com os resultados encontrados para o inibidor extraído de aveia e nele observou-se que a inibição inicial também foi do tipo incompetitiva, uma vez que ocorreu uma diminuição tanto nos valores de  $K_m$  quanto de  $V_{máx}$ . Com o aumento da concentração de inibidor o comportamento foi alterado, com características de uma inibição mista.

Uma inibição incompetitiva sugere que o inibidor se liga ao complexo enzima-substrato, mas não pode liberar a enzima, enquanto que na inibição mista a ligação do inibidor não afeta a ligação do substrato e vice-versa (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

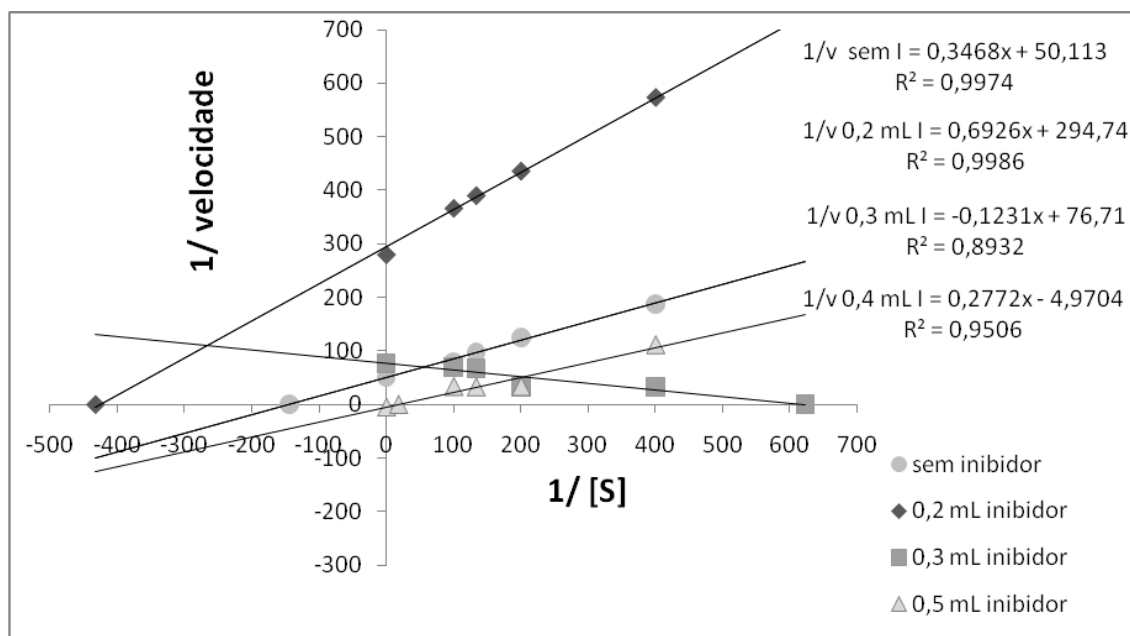


Figura 9 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de aveia

0,2 mL inibidor: 0,58 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,3 mL inibidor: 0,87 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,5 mL inibidor: 1,45 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>.

Inibição competitiva clássica foi verificada nas menores concentrações de inibidor de trigo, semelhante ao encontrado por Gibbs e Alli (1998) ao caracterizar e purificar um inibidor extraído do feijão. Porém, uma inibição mista foi verificada com o aumento das concentrações de inibidor, de acordo com a Figura 10. Esses resultados revelaram que com o aumento da concentração de amido, a inibição competitiva foi revertida, porém, o inibidor encontrou outra maneira de se ligar a enzima e impedir a degradação do amido.

De uma maneira geral, a cinética da inibição para os extratos de arroz, aveia e trigo permitiu classificá-los como inibidores do tipo misto. A partir desses resultados, investigações para determinar os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do inibidor são interessantes em função da necessidade em avaliar o seu papel fisiológico nos cereais.

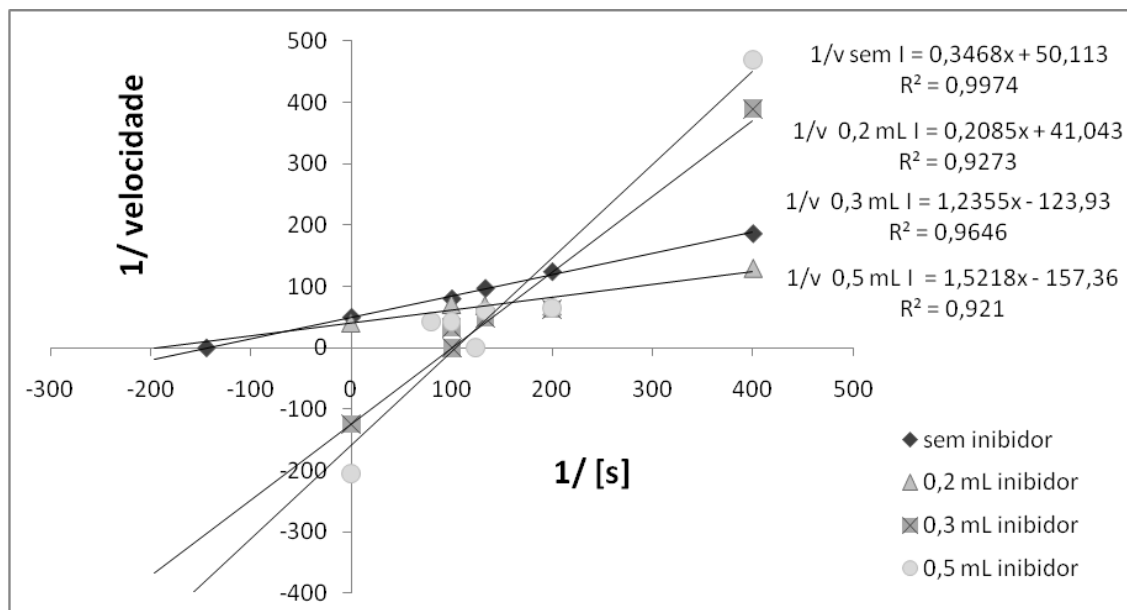


Figura 10 Demonstração da velocidade de reação da inibição enzimática em diferentes concentrações de amido na ausência e presença de extrato inibidor de trigo

0,2 mL inibidor: 0,79 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,3 mL inibidor: 1,19 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>; 0,5 mL inibidor: 1,96 mg proteína g amostra<sup>-1</sup>.

Os gráficos obtidos levaram em consideração os valores da intersecção com o eixo 1/v e de inclinação das retas de tendência do gráfico de duplo-recíproco e as concentrações de inibidor usadas. A partir disso, foram determinados os valores da constante de inibição ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) na ausência e presença dos extratos inibidores obtidos de arroz, aveia e trigo, de acordo com a Tabela 6. Ao comparar os resultados obtidos para o  $K_m$ , a maior afinidade inicial ocorreu para o inibidor de aveia, com valor de 0,0023, porém a afinidade da enzima pelo substrato foi mantida na presença do inibidor de trigo na medida em que ocorria o aumento da sua concentração, com valor final de 0,0097. O extrato inibidor de arroz apresentou comportamento contrário à aveia, pois inicialmente a afinidade era menor ( $K_m$  de 0,6375) e com o decorrer do estudo, houve um aumento da mesma.

O menor valor de  $K_m$ , verificado ao longo da cinética de inibição com extrato de trigo, refletiu a alta afinidade do sítio catalítico do ligante (enzima) para reconhecer e se ligar aos analitos (inibidores). Esses resultados também indicaram que o complexo formado entre o inibidor de trigo, amilase fúngica comercial e amido foi mais estável que o formado com aveia, indicando o elevado potencial desses inibidores para atuarem como um mecanismo de defesa ao ataque fúngico.

Tabela 6 Valores de  $K_{ms}$  e  $V_{max}$  na presença e ausência de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo

Reação	$K_m$	$V_{max}$
Sem inibidor	0,0069	0,0200
0,2 mL inibidor arroz mg proteína <sup>-1</sup>	0,6375	0,6389
0,3 mL inibidor arroz mg proteína <sup>-1</sup>	0,0004	0,0130
0,5 mL inibidor arroz mg proteína <sup>-1</sup>	0,0120	0,0084
0,2 mL inibidor aveia mg proteína <sup>-1</sup>	0,0023	0,0034
0,3 mL inibidor aveia mg proteína <sup>-1</sup>	0,0210	0,013
0,5 mL inibidor aveia mg proteína <sup>-1</sup>	0,0556	0,2012
0,2 mL inibidor trigo mg proteína <sup>-1</sup>	0,0050	0,0240
0,3 mL inibidor trigo mg proteína <sup>-1</sup>	0,0099	0,0081
0,5 mL inibidor trigo mg proteína <sup>-1</sup>	0,0097	0,0064

#### 4 CONCLUSÃO

Os extratos alcoólicos dos cereais contendo inibidores de amilase apresentaram maior especificidade para a amilase Fungamyl® do que para as demais enzimas estudadas, destacando-se como mais estável em pH 6 e 7 e temperatura de 25 °C, portanto a amilase denominada comercialmente de Fungamyl® apresentou propriedades que permitem empregá-la para o estudo de inibidores enzimáticos .

O estudo das propriedades dos extratos brutos contendo os inibidores demonstrou que estes apresentaram comportamentos distintos entre as espécies e sugerem que seus potenciais são fortemente afetados por condições ambientais.

A partir desta etapa será necessário purificar estes inibidores para avaliar sua eficiência na defesa contra contaminação fúngica e aplicar o conhecimento em programas genéticos capazes de aumentar a resistência desses grãos a determinados fungos.



## REFERÊNCIAS

- ABES, J.I., SIDENIUS, U.; SVENSSON, B. Arginine is essential for the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochem. J.**, v. 293, p. 151-155, 1993.
- BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J. BADIALE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-e Toxin in Malt Amylase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 53, n. 3, 2010.
- BELIËN, T., et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 407–414, 2005.
- BLOCH Jr, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect  $\alpha$ -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat d-purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, p. 101-104, 1991.
- BOGATEK, R.; GNIĄZDOWSKA, A.; ZAKRZEWSKA, W.; ORACZ, K.; GAWROŃSKI, S.W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. **Biologia Plantarum**, v. 50, p.156-158, 2006.
- CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica**. Ed. Thompson Learning, São Paulo, 5<sup>a</sup> ed.; 2007.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CHEN, X.; XU, G.; LI, X.; LI, Z.;YING, H. Purification of an  $\alpha$ -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 765-768, 2008.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 735-746, 1992.
- CHOUDHURY A, MAEDA, K.; MURAYAMA,R.; DIMAGNO, E.P. Character of a wheat amylase inhibitor preparation and effects on fasting human pancreaticobiliary secretions and hormones. **Gastroenterology**, v. 1, p. 1313–1320, 1996.
- COPELAND, L. O.; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 3 ed. London: Chapman and Hall, 1995.
- CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Induction of PR proteins in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium verticillioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 189-200, 1992.
- DIXON, M.; WEBBER, E.C.; THERONE, C.J.R.; TRIPTON, K.F. **Inhibition and activation**. In Enzymes. Academic Press, New York, p. 332-381, 1979.
- ELLIOTT, G.O.; MCLAUCHLAN,W.R.; WILLIAMSON, G.; KROON, P.A.A.D. A wheat xylanase inhibitor protein (XIP-I) accumulates in the grain and has homologues in other cereals. **Journal of Cereal Science**. v. 37, n. 2, p. 187-194; 2003.
- FAKHOURY, A.M.; WOLOSHUK, C.P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal  $\alpha$  amylases by a lectinlike protein from *Lablab purpureus*. **Molecular Plant Microbe interaction**. n. 14, p. 955-961, 2001.
- FENG, G.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.; REECK, G.R.  $\alpha$ -amylase inhibitors from wheat: amino acids sequence and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylases. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426, 1996.

- FINARDI-FILHO, F. **Estrutura molecular comparativa dos iso-inibidores de  $\alpha$ -amilase do feijão** (*Phaseolus vulgaris*). São Paulo: USP, 1990. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1990.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y.; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. "Characterization of a Hydrophobic Amylase Inhibitor from Corn (*Zea mays*) Seeds with Activity Against Amylase from *Fusarium verticillioides*", **Biochemistry and Cell Biology**, vol. 93, no. 8, p. 917-922, 2003.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; DE SÁ, M.C.; IDA, E.I.; HIROOKA, E.Y. Produção e caracterização de amilase de *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 1326, 2000
- FRANCO, O.L.; RIGDEN D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁI, M.F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insects  $\alpha$ -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; BLOCH Jr, C.; SILVA, C.P.; GROSSI DE SÁ, M.F. Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 8, p. 2166–2173, 2000.
- FRELS, J. M.; RUPNOW, J. H. Characterization of two  $\alpha$ -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 5, p. 72-77, 1985.
- FROLOVA, G.M.; SIL'CHENKO, A.S.; PIVKIN, M.V.; MIKHAILOV, V.V. Amylases of the Fungus *Aspergillus flavipes* Associated with *Fucus evanescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 134–138, 2002.
- GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Journal of Pest Science**. v. 52, p.165–175, 1998.
- GIBBS, B.F.; ALLI, F. Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 31, n. 3, p. 217-225, 1998.
- GOMES, C.E.M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. Rio Grande do Norte: UFRN, 2004. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.
- GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Campinas: Unicamp, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- GUO, B.Z.; CLEVELAND, T.E.; BROWN, R.L.; WINDSTROM, N.W.; LYNCH, R.E.; RUSSIN, J.S. Distribution of antifungal proteins in maize kernels tissues using immunocytochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 295-299, 1999.
- IULEK, J., FRANCO, O.L., SILVA, M., SLIVINSKI, C.T., BLOCK Jr., C., RIGDEN, D.J., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.32, p. 1195–1204, 2000.
- KADOZAWA, P.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Inibidores de enzimas contra *Fusarium moniliforme* durante a germinação de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 249-258, 2002.
- LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Purificação do inibidor de alfa-amilase do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) var. Rico 23. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.4, p. 1-11, 1984.

- LAYER, P.; CARLSON, G.L.; DIMAGNO, E.P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans, **Gastroenterology**, v. 88, p. 1895–1902, 1985.
- LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytopagous insects. **Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109, 2002.
- LYONS, A.; RICHARDSON, M.; TATHAM, A.S.; SHEWRY, P.R. Characterization of homologous inhibitors of trypsin and alpha-amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 915, p. 305–313, 1987.
- LOPES, J.L.S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. Universidade de São Carlos, Instituto de Física, 2006.
- MEDINA, J.; HUEROS, G.; CARBONERO, P. Cloning of cDNA, expression, and chromosomal location of genes RT encoding the three types of subunits of the barley tetrameric inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase. **Plant Mol. Biol.**, v. 23, p. 535–542, 1993.
- NAKASE, M.; et al. Rice (*Oryza sativa* L.)  $\alpha$ -amylase inhibitors of 14-16 kda are potential allergens and products of a multigene family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2624-2628, 1996.
- ODA, Y.; MATSUNAGA, T.; FUKUYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MORIMOTO, T. Tertiary and quaternary structures of 0.19 R-Amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å Resolution. **Biochemistry**, v. 36, p. 13503-13511, 1997.
- PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A.R.L.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.3, p.892-896, 2000.
- PEREIRA, R.A. de. **Inibidores protéicos e seu potencial uso no controle de insetos-praga de importância para a cultura do café e do feijão**. Brasília: UnB, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2005).
- PEREIRA, M.E.; DÖRR, F.A.; PEIXOTO, N.C.; LIMA-GARCIA, J.F.; BRITO, G.G. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n11, p. 1633-1641, 2005.
- PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M.C.M.; NETO, O.B.O.; FIGUEIRA, E.L.Z.; JIMENEZ, A.V.; DE-SÁ, M.F.G. An  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009–2016, 2006.
- RAKWALL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA-N-S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor : tight regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v. 263, p. 189-198, 2001.
- REKHA, M.R.; PADMAJA, G. Alpha-amylase inhibitor changes during processing of sweet potato and taro tubers. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 285–294, 2002.
- RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v. 6, p. 235-253, 1980-1981.
- ROY, I.; GUPTA, M. N. Purification of a 'double-headed' inhibitor of alpha-amylase / Proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, v. 9, p. 239-245, 2000.
- SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; BARBER, D.; LOPEZ-OTIN, C.; ARMENTIA, A.; SALCEDO, G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated

subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity, **Biochemical Journal**, v. 281, p. 401–405, 1992.

SILANO, V.  **$\alpha$ -Amylase inhibitors**. In: Enzymes and their roles in cereal technology (edited by Kruger J.E. Lineback D. and Stauffer, C.E.), p. 141-199, 1987.

TAN, N.H.; RAHIM, Z.H.A.; KHOR, H.T.; WONG, K.C. Chymotrypsin inhibitor activity in winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 163–166, 1984.

TERASHIMA, M.; HAYASHI, N.; THOMAS, B.R.; RODRIGUEZ, R.L.; KATOHA, S. Kinetic parameters of two rice  $\alpha$ -amylase oligosaccharide degradation. **Plant Science**, v. 116, p. 9-14, 1996.

VALÊNCIA, A.; BUSTILLO, A.E.; OSSA, G.E.; CHRISPPEELS, M.J.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect. Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p. 207–213, 2000.

VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA, J.W.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Activity of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive  $\alpha$ -amylase of the coffee berry borer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2315-2320, 2008.

XAVIER, L.P. **Purificação parcial, propriedades e purificação cinética de proteases tripsina-like do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis***. Viçosa:UFV, 2006. Tese (Doutorado em Pós-Graduação em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2006.

WELHAM, T.; O'NEILL, M.O.; JOHNSON, S.; WANG, T.L.; DOMONEY, C. Expression patterns of genes encoding seed trypsin inhibitors in *Pisum sativum*. **Plant Science**, v. 131, p. 13-24, 1998.

WHITAKER, J.R.; FINARDI-FILHO, F.; LAJOLO, F.M. Parameters involved in binding of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitor with black bean inhibitor: role of sulfhydryl groups, chloride calcium, solvent composition and temperature. **Biochimie**, Paris, v.70, p. 1153-1161, 1988.

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

## **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO POR COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE CEREAIS**

## RESUMO

Os cereais são fontes de inibidores enzimáticos que agem sobre a  $\alpha$ -amilase, alterando a disponibilidade do amido e podem representar uma ferramenta útil para a resistência dos vegetais ao ataque de patógenos, tais como fungos de campo e armazenamento. O trabalho objetivou avaliar os efeitos inibitórios *in vitro* de extratos de variedades de arroz, aveia e trigo sobre o desenvolvimento de fungos toxigênicos. Os compostos inibidores foram extraídos com etanol e testados nas concentrações de 20 mg proteína mL<sup>-1</sup> e 40 mg proteína mL<sup>-1</sup>. As propriedades antifúngicas de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo foram testadas pelo método de ágar diluído, utilizando como resposta o teor de glucosamina produzido pela biomassa de *Fusarium graminearum* e *Aspergillus flavus*. Durante os 14 dias de incubação do *Fusarium graminearum* as maiores inibições de crescimento fúngico foram alcançadas em presença do extrato de aveia. Os demais extratos também inibiram significativamente o crescimento fúngico com relação ao controle, entre 22 e 54%. Os resultados indicaram que as matrizes estudadas são potenciais fonte de compostos inibidores e podem exercer um efeito inibitório no desenvolvimento de fungos toxigênicos.

Palavras chave: inibidores enzimáticos, propriedade antifúngica, glucosamina.

## ABSTRACT

Cereals are sources of enzymatic inhibitors which act upon  $\alpha$ -amylase disturbing starch distribution, aggregating to the vegetable a higher resistance to the attack of pathogens, such as field and storage fungi. Therefore, the objective of this work was evaluating inhibitor effects of rice, wheat and oat in the development of toxigenic fungi through *in vitro* tests. Compounds were extracted utilizing ethanol and protein quantities between 20 mg protein mL<sup>-1</sup> e 40 mg protein mL<sup>-1</sup>. Anti-fungal properties from the extracts were analyzed utilizing the diluted agar method, the response was measure through the sum of glucosamine produce by *Fusarium graminearum* and *Aspergillus flavus* biomass. During 14 days of incubation *Fusarium graminearum* inhibition was greater in the oat extract presence. Supplementary extracts inhibited significantly fungi development when compared to the control experiment (22% for wheat and 54% for rice). Results show that the substrates studied are potential sources of inhibitor compounds and may generate a inhibitor effect in the development of toxigenic fungi.

**Key Words:** enzymatic inhibitors, Anti-fungi properties, glucosamine.

## 1 INTRODUÇÃO

Em função de sua composição química, os cereais são caracterizados pela susceptibilidade ao ataque microbiano, responsáveis por perdas na agricultura, pois, além de causarem doenças e injúrias, se alimentam dos tecidos da planta, reduzindo a produtividade e a qualidade do produto (HOSENEY, 1991, McKEVITH, 2004) A contaminação dos grãos é inevitável uma vez que muitas espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Fusarium* são também fitopatogênicas e ocasionam doenças de difícil controle em cultivo de cereais (KABAL, DOBSON e VAR, 2006).

O crescimento fúngico pode ser inibido por métodos físicos ou químicos, porém diante da toxicidade dos métodos químicos existentes, algumas investigações têm sido dirigidas na busca de produtos naturais com efeitos antifúngicos para aplicação em alimentos e plantações (HOLMES, BOSTON e PAYNE, 2008). Entre os compostos naturalmente presentes em vegetais, destacam-se aqueles com capacidade de inibição da atividade microbiana, tais como inibidores de alfa-amilase (HARUTA et al, 2001) que podem alterar o ambiente de crescimento do fungo, interferir na expressão do gene regulador da biossíntese ou ainda bloquear a atividade da enzima presente no trato gastrointestinal do micro-organismo (HOLMES, BOSTON e PAYNE, 2008).

Esses inibidores funcionam como substratos específicos das amilases digestivas dos insetos (FIGUEIRA et al, 2003) ou micro-organismos (FERNANDES et al, 2007), causando uma deficiência em aminoácidos, que influencia no crescimento e desenvolvimento dos mesmos, o que pode causar a morte devido a inibição das amilases digestivas ou pela produção maciça dessas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (FENG et al, 1996). Dentre muitas matérias-primas para a obtenção de compostos com esta propriedade antifúngica, destacam-se os cereais ou suas porções sub-utilizadas na agroindústria (BERI e GRUPTA, 2007; FRANCO et al, 2002; IULEK et al, 2000;) e legumes (GROSSI-DE-SA et al, 1997; ISHIMOTO et al, 1996; LAJOLO e FINARDI-FILHO, 1984).

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade antimicrobiana de alimentos, que podem ser divididos em testes *in vitro* e de aplicação. Estes podem ser chamados de métodos de triagem e incluem alguns testes, nos quais os compostos não são aplicados diretamente no produto sob condições de uso. Geralmente, estes testes produzem informações preliminares para determinar o uso potencial do composto teste. O segundo tipo inclui testes, onde um antimicrobiano é aplicado diretamente no fungo avaliado (DAVIDSON e PARISH, 1989).



O aumento natural de defesa dos vegetais pode aperfeiçoar a produtividade na agricultura e a segurança alimentar. Esses mecanismos de defesa são uma solução desejável por diminuir o risco de contaminação secundária para o ecossistema, pelo fato de reduzir os problemas oriundos dos agrotóxicos, somando-se a vantagem da utilização de componentes inerentes da planta (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Com isso, o trabalho objetivou avaliar os efeitos inibitórios *in vitro* de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparo dos extratos brutos contendo os inibidores enzimáticos**

A amostra de arroz cultivar BR 424 (*Oryza sativa* L.) fornecida pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), aveia cultivar UPFA 22 Temprana (*Avena sativa* L.) pela Universidade de Passo Fundo e trigo cultivar Safira (*Triticum aestivum* L.) pela empresa OR Melhoramento de Sementes, foram moídas em moinho de facas e peneiradas à granulometria de 42 mesh.

A extração dos inibidores foi realizada homogeneizando a amostra com solvente na proporção 1:5 etanol 70% para aveia e trigo e 95% para arroz durante 12 horas dividido em 8h + 2h + 2h. Após a primeira extração com 25 mL de etanol, a suspensão foi centrifugada a 2250 G durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante recolhido. Ao precipitado, foram adicionados 10 mL de solvente e a extração foi reiniciada por um período menor, centrifugada e o sobrenadante recolhido a cada intervalo de agitação. As alíquotas de cada extração foram homogeneizadas, filtradas e empregadas no teste de inibição enzimática, em duplicata.

Para os ensaios *in vitro*, foram preparadas alíquotas de 7 mL e 14 mL de inibidores enzimáticos extraídos de aveia, 13 mL e 26 mL de inibidores enzimáticos extraídos de arroz e 5,5 mL e 11 mL de inibidores enzimáticos extraídos de trigo, volume correspondente a 20 mg e 40 mg de proteína solúvel por mL de amostra, respectivamente. Cabe salientar que para evitar o efeito do solvente no desenvolvimento fúngico esses extratos contendo inibidores de amilase foram secos sob nitrogênio, seguido da adição de 4 mL de água estéril e agitação da mistura em banho ultrassônico, para posterior adição ao meio de cultura.

### **2.2 Determinação de proteína solúvel nos extratos**

A determinação de proteínas do extrato bruto contendo inibidores enzimáticos de arroz, aveia e trigo foi realizada pelo método de Lowry (1951), cuja reação colorimétrica

envolve a oxidação dos aminoácidos aromáticos da proteína com o reagente fenol; utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro Varian Cary 100 a 660 nm e comparadas com a curva padrão de solução de albumina de soro bovino (0,3 a 2,5 mg mL<sup>-1</sup>).

### 2.3 Espécies fúngicas

As espécies fúngicas *Rhizopus oryzae* CCT 1217, *Aspergillus flavus* CCT 7760 e *Fusarium graminearum* CQ 244, esta cedida pelo Laboratório de Epidemiologia de Plantas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foram mantidas e crescidas em ágar batata dextrose por um período de 7 dias para os dois primeiros fungos e 14 dias para o último micro-organismo citado. Após o período de crescimento, a superfície do ágar foi lavada com solução estéril de Tween 80 a 0,1%, para retirada de esporos e a sua concentração estimada por contagem microscópica direta utilizando câmara de Neubauer.

### 2.4 Efeito *in vitro* de extratos inibidores sobre o desenvolvimento fúngico

O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro” observando o desenvolvimento ou inibição dos microrganismos em placas contendo no meio agar batata dextrose em duas concentrações (20 mg e 40 mg) de proteínas solúveis de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo.

O meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 120°C, após o resfriamento foram adicionados os extratos inibidores diluídos diretamente no meio de cultura com concentrações de proteína solúvel conhecidas, preparando-se para cada concentração 26 mL de meio mais 4 mL de extrato, operações estas realizadas sob condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, tipo B2).

Para as placas controle foram adicionadas as mesmas quantidades de água estéril. Após a solidificação dos meios, foram adicionados ao centro das placas 250 µL; 39,5 µL e 500 µL da solução de esporos contendo 4 x 10<sup>6</sup> esporos *Rhizopus oryzae*. mL<sup>-1</sup>; 4 x 10<sup>6</sup> esporos *A. flavus* mL<sup>-1</sup> e 4 x 10<sup>6</sup> esporos *F. graminearum* mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A incubação em câmara de germinação modelo Tecnal TE – 403, em temperatura de 30°C foi realizada durante 7 ou 14 dias, de acordo com cada fungo. As determinações foram feitas em duplicata para cada condição em estudo.

A atividade antifúngica foi observada pela incubação dos inibidores juntamente com os esporos dos fungos em meio de cultura ágar batata dextrose propícios ao crescimento de tais espécies e avaliada pela observação visual do crescimento do micélio, comparada com placas controle; além da determinação do teor de glucosamina presente (DEL RÍO et al, 2003; NGUEFACK et al, 2004).

Durante o desenvolvimento do fungo, foram efetuadas as retiradas das placas nos 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias de incubação para *Rhizopus oryzae*. e *Aspergillus flavus* e nos 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias de incubação para *Fusarium graminearum*, tendo como referência o desenvolvimento controle do fungo no meio de cultura sem adição de extratos (NGUEFACK et al, 2004). Para o cálculo da porcentagem de inibição fúngica foi utilizada a fórmula descrita na Equação 1:

$$I = \frac{100 \times (C - T)}{C} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

I = porcentagem de inibição

C = teor de glucosamina do fungo no meio controle

T = teor de glucosamina do fungo no meio contendo o inibidor

Após a retirada das placas nos dias pré-determinados, as mesmas foram congeladas para posterior quantificação do teor de glucosamina.

## 2.5 Determinação do teor de glucosamina

Em 1 g de fungo foi adicionado 5 mL de HCl 6M e a mistura autoclavada a 121°C por 8 minutos. Após a amostra ter sido resfriada e filtrada, foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com água destilada. Dessa solução foram transferidos 1mL para balão de 25mL com adição de uma gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (p/v). Em seguida, foram realizadas a neutralização com solução de NaOH 3N e a titulação reversa com KHSO<sub>4</sub> 1% (p/v) e o volume do balão completado com água destilada.

Após a etapa de extração, 1mL da solução foi transferida para tubo de ensaio e acrescentado 1 mL de solução acetil-acetona em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5N colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Resfriada as amostras, foram adicionados 6 mL de etanol e 1mL de reagente de Erlich (2,67g DAB - p\_dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15mL de etanol e 15 mL ácido clorídrico) para incubação durante 10 minutos a 65°C em estufa com circulação de ar. Para determinação da n acetil glucosamina foram determinadas as unidades de absorvância em espectrofotômetro (Varian Cary 100) a 530nm com curva padrão de glucosamina (0,01 a 0,2g/L) em água (AIDDO et al,1981). As análises foram realizadas em triplicata.

## 2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos no teste de atividade antifúngica foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conteúdos de proteína solúvel nos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo foram de 70,4 mg de proteína g amostra<sup>-1</sup>, 131 mg de proteína g amostra<sup>-1</sup> e 179 mg de proteína g amostra<sup>-1</sup>, respectivamente.

O teste inicial para a escolha da quantidade ideal de proteína presente em cada extrato inibidor foi realizada no 7º dia de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae*, sendo sua biomassa quantificada pelo método da glucosamina, que é um composto presente na parede celular dos fungos, e os resultados expressos em mg glucosamina g fungo<sup>-1</sup>, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 Teor de glucosamina do fungo *Rhizopus oryzae* em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo em diferentes concentrações protéicas

Extratos	mg proteína mL extrato <sup>-1</sup>	mg glucosamina g fungo <sup>-1</sup>
Controle	-	4,27 <sup>d</sup>
Arroz	20	10,76 <sup>a,b</sup>
	40	8,65 <sup>c</sup>
Aveia	20	11,35 <sup>a</sup>
	40	11,93 <sup>a</sup>
Trigo	20	8,85 <sup>b,c</sup>
	40	5,63 <sup>d</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de confiança de 95% em relação ao controle.

O extrato de arroz na menor concentração apresentou menor crescimento fúngico, porém, os resultados da Tabela 1 demonstraram que o teste para a escolha da quantidade de proteína necessária para ocasionar inibição no fungo *Rhizopus oryzae* não apresentou resultados satisfatórios. Isso sugere que para inibir o desenvolvimento desse fungo, esses extratos na forma em que foram obtidos, não foram eficientes. Cabe salientar que o *Rhizopus oryzae* não é classificado como toxigênico e nem fitopatogênico, mas foi utilizado pelo simples fato de tratar-se de um micro-organismo de rápido crescimento e útil para testes rápidos, além de ser considerado GRAS (Generally Recognized as Safe).

Em alguns casos pode ser observado que a inibição fúngica não está relacionada com a concentração de proteínas nos extratos, como por exemplo, no extrato inibidor de arroz e trigo que apesar de possuir concentração protéica superior, não inibiu o desenvolvimento das colônias em todo o período de incubação.

Como o teste inicial de atividade antifúngica empregando o fungo *Rhizopus oryzae* não se mostrou promissor para a triagem da ação dos extratos inibidores, incluindo as questões quantitativas testadas, foi escolhida a maior quantidade de proteína para adição ao meio de crescimento fúngico nos testes posteriores, para a verificação da ação antifúngica dos inibidores com os fungos toxigênicos *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados referentes ao teor de glucosamina encontrado após o período de crescimento dos fungos na ausência e presença dos extratos inibidores.

Nenhum dos extratos apresentou inibição total sobre o fungo *Aspergillus flavus*, mesmo com o uso de 40 mg proteína mL amostra<sup>-1</sup>, o que sugere que estes extratos precisariam ser mais concentrados para inibir esta espécie fúngica, conforme verificado na Tabela 2. Velluti et al (2004) salientaram que o comportamento verificado em alguns fungos em relação à diminuição do crescimento com o aumento da concentração de extrato requer um estudo específico, pois fatores como tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos podem interferir no seu comportamento.

Tabela 2 Teor de glucosamina do fungo *Aspergillus flavus* em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo

Extratos	Dias		
	3 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>
Controle	2,202 <sup>c</sup>	1,895 <sup>c,d</sup>	1,113 <sup>e</sup>
Arroz	3,386 <sup>b</sup>	1,345 <sup>c,d</sup>	3,463 <sup>a,b</sup>
Aveia	1,455 <sup>d,e</sup>	2,005 <sup>c,d</sup>	4,208 <sup>a</sup>
Trigo	2,315 <sup>c</sup>	0,927 <sup>e</sup>	2,343 <sup>c</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de confiança de 95% em relação ao controle.

Ao relacionar a medida de glucosamina com o conteúdo inibitório dos extratos de arroz foi verificado uma redução do crescimento fúngico no 3<sup>o</sup> dia, pois a porcentagem de inibição foi de 34%. A partir do 7<sup>o</sup> dia, o fungo conseguiu se desenvolver mesmo em presença do inibidor. O extrato de trigo inibiu 51% o crescimento de *A.flavus* no 5<sup>o</sup> dia de experimento, mostrando comportamento bastante interessante, pois o teor de glucosamina encontrado no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias foram próximos e maiores que o observado no período intermediário de análise. A aveia não apresentou capacidade inibitória ao desenvolvimento do fungo.

A ausência de inibição pode estar relacionada com a pequena quantidade de inibidor utilizada no ensaio. Esses inibidores de alfa-amilase são potenciais moléculas a serem utilizadas em programas de melhoramento vegetal, sendo foco de importantes linhas de

pesquisa que avaliam a atividade, especificidade e efeitos tóxicos em organismos não-alvo (CARLINI e GROSSI DE SÁ, 2002; MOSCA et al, 2008) e no caso deste estudo *in vivo* seria necessário rever as condições de aplicação do extrato no meio de cultura visto que seus efeitos não estão consistentes como o observado no estudo *in vitro* com a Fungamyl.

Estes resultados também indicaram a necessidade de se identificar os diferentes compostos inibidores presentes nesses extratos, pois a sua estrutura pode estar relacionada com o maior ou menor poder de inibição do crescimento fúngico.

Cabe salientar que além dos cereais, outras matérias-primas são utilizadas em testes de atividade antifúngica, como por exemplo tomilho e óleos essenciais que foram adicionados ao tomate e conseguiram inibir o desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* (OMIDBEYGI, 2007).

O acompanhamento do crescimento das colônias do fungo *Fusarium graminearum* em presença de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo estão apresentados na Tabela 3. Todos os extratos inibidores reduziram o crescimento do fungo, sendo que os menores teores de glucosamina foram verificados no 7º dia.

Tabela 3 Teor de glucosamina do fungo *Fusarium graminearum* em presença dos extratos inibidores de arroz, aveia e trigo

Extratos	Dias		
	5º	7º	14º
Controle	1,442 <sup>a</sup>	0,192 <sup>e</sup>	1,003 <sup>a,b,c,d</sup>
Arroz	1,262 <sup>a,b</sup>	0,088 <sup>e</sup>	0,906 <sup>b,c,d</sup>
Aveia	0,818 <sup>c,d</sup>	0,128 <sup>e</sup>	0,746 <sup>d</sup>
Trigo	1,199 <sup>a,b,c</sup>	0,149 <sup>e</sup>	0,712 <sup>d</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de confiança de 95% em relação ao controle.

Apesar do extrato inibidor de arroz apresentar a maior capacidade de inibição no 7º dia, com valor de 54%; maior variação entre os resultados foi observada, pois no 5º e 14º dias a capacidade de inibição foi de 13% e 12%, respectivamente.

Os resultados com extratos obtidos de aveia foram mais consistentes, visto que a inibição foi de 43%, 34% e 28% ao longo dos experimentos (Figura 1). Os inibidores extraídos do trigo também foram eficientes ao ataque do *Fusarium graminearum*, pois a inibição foi praticamente constante, com valor médio de 23%.

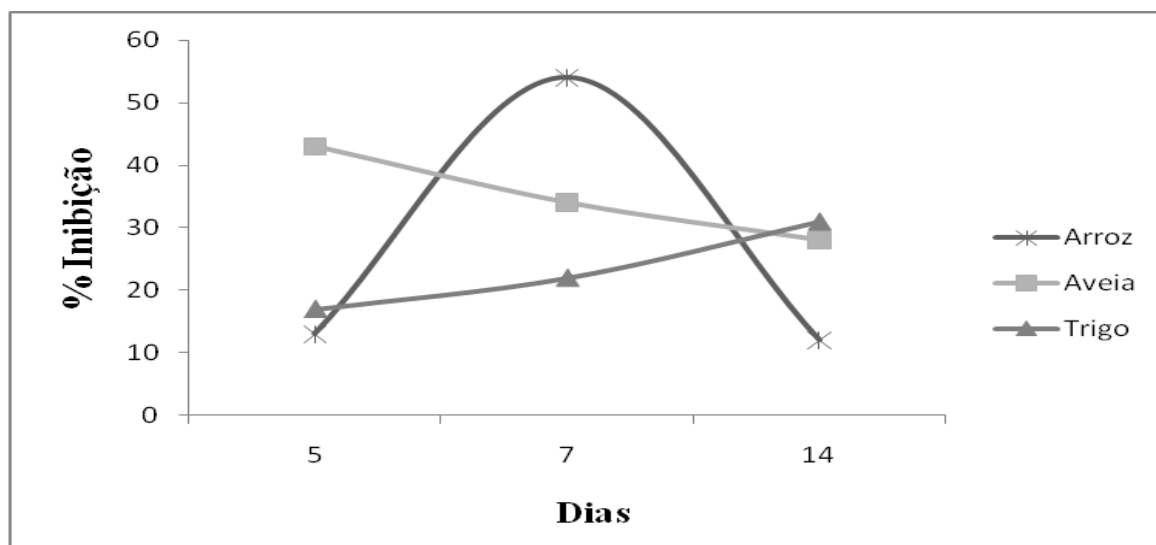


Figura 1 Porcentagem de inibição do fungo *Fusarium graminearum* na presença de extratos inibidores de arroz, aveia e trigo em relação ao controle

A existência de uma glicoproteína isolada do trigo foi reportada por Caruso e colaboradores (2001), sendo que essa substância apresentou atividade inibitória contra *Fusarium culmorum*, indicando o papel protetor ao ataque de patógenos. Essa mesma proteína teve sua estrutura básica estudada e os autores concluíram que essa substância é capaz de entrar no interior da célula fúngica, deixando a parede celular intacta. Após estar inserida no citoplasma da célula do hospedeiro, a atividade antifúngica da proteína é exercida sobre o RNA endógeno (BERTINI et al, 2009). Lee et al (2007) relataram também que um isolado de arroz conseguiu suprimir o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus*.

A caracterização de uma glicoproteína obtida de *Urginea indica*, uma planta popular do oriente, permitiu verificar seu efeito fungicida, pois inibiu completamente o crescimento de *Fusarium oxysporum* (DEEPAK et al, 2003). Extratos com propriedades antifúngicas também foram isolados de sementes de jojoba e apresentaram moderada inibição para os micro-organismos, sendo que *Fusarium oxysporum* foi o menos sensível a esse extrato (ABBASSY et al, 2007).

Outras espécies de micro-organismos, como *Bacillus vallismortis* também foram estudadas em relação a capacidade de impedir a proliferação de fungos fitopatogênicos. Os resultados desse estudo demonstraram que o extrato inibiu 90% e 50% o crescimento de *Alternaria alternata* e *Fusarium graminearum*, respectivamente (ZHAO et al, 2010).

Kadozawa et al (2006) verificaram possível desempenho de inibidores enzimáticos na germinação na defesa do milho contra *Fusarium verticillioides* e *Sitophilus zeamais*. Figueira et al (2003) também observaram a capacidade de extratos de milho em inibir o

desenvolvimento de *Fusarium verticillioides*, além de insetos, que muitas vezes propiciam condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico.

Estes relatos sugerem que a defesa dos vegetais tendo como base os inibidores de amilase parece ser mais eficiente para organismos fitopatogênicos, tais como os fungos do gênero *Fusarium*. No caso deste trabalho, este aspecto ficou bem claro quando se observa os resultados de inibição do desenvolvimento dos fungos *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

#### **4 CONCLUSÃO**

O desempenho dos extratos de arroz, aveia e trigo confirmaram a sua eficiência antifúngica, para *Fusarium graminearum* utilizando a determinação do teor de glucosamina.

O resultado menos satisfatório sobre o fungo *Aspergillus flavus* sugere que em trabalhos futuros outros parâmetros de controle devam ser observados para melhor entendimento do resultado.

Os extratos, por se tratarem de misturas complexas, devem ser purificados e identificados, com o intuito de elucidar a ação destes compostos sobre o comportamento dos fungos.



## REFERÊNCIAS

- ABBASSY, M.A.; ABDELGALEIL S.A.M.; BELAL, A.S.H.; RASOUL, M.A.A. Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 345–350, 2007.
- AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.
- BERI, V.; GRUPTA, R. Acetylcholinesterase inhibitors neostigmine and physostigmine inhibit induction of alpha-amylase activity during seed germination in barley, *Hordeum vulgare* var. Jyoti. **Life Sciences**, v.80, p. 2386-2388, 2007.
- BERTINI, L.; CAPORALE, C.; TESTA, M.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. **FEBS Letters**, v. 583, p. 2865–2871, 2009.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 743–750, 2001.
- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. **Food Technology**, p. 148-155, January, 1989.
- DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M.; ORTUNO, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. **Food Chemistry**, n. 83, p. 75-78, 2003.
- DEEPAK, A.V.; THIPPESWAMY, G.; SHIVAKAMESHWARI, M.N.; BHARATHI- SALIMATH, P.; Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal activity from bulbs of *Urginea indica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 735–742, 2003.
- FENG, G.H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.S.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.; REECK, G.R.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Wheat: Amino Acid Sequences and Patterns of Inhibition of Insect and Human  $\alpha$ -Amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.5, p.419-426, 1996.
- FERNANDES, L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, n.1, p. 43-51, 2007.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a Hydrophobic Amylase Inhibitor from Corn (*Zea mays*) Seeds with Activity Against Amylase from *Fusarium verticillioides*. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 8, p. 917-922, 2003.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI DE SA, M.F.. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insects  $\alpha$ -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.
- GROSSI DE SA, M.F.; ISHIMOTO, M.; MIRKOV, T.E.; COLUCCI, G.; BATEMEN, K.; CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta: An International Journal of Plant Biology**, v. 203, p. 295–303, 1997.
- HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n.3, p.347-359, 2001.

- HOLMES, R.A.; BOSTON, R.S.; PAYNE, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 559–572, 2008.
- HOSENEY, R.C. **Principio de ciencia e tecnologia de los cereales**. Zaragoza: Acribia. 1991.
- IULEK, J., FRANCO, O.L., SILVA, M., SLIVINSKI, C.T., BLOCK Jr., C., RIGDEN, D.J., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.32, p. 1195–1204, 2000.
- ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 309-315, 1996.
- KABAL, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p. 593-619, 2006.
- KADOZAWA, P.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Inibidores de enzimas contra *Fusarium moniliforme* durante a germinação de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 249-258, 2002.
- LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Purificação do inibidor de  $\alpha$ -amilase do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) var Rico 23. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 1-11, 1984.
- LEE, J.R.; SEONG-CHEOL, P.; MI-HYUN, K.; JI-HYUN, J.; MI-RIM, S.; HO-LEE, D.; GYEONG-CHEON, M.; YOONKYUNG, P.; KYUNG-SOO, H.; SANG-YEOL, L. Antifungal activity of rice Pex5p, a receptor for peroxisomal matrix proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, p. 941–946, 2007.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- McKEVITH, B. Nutricional aspects of cereal, **Nutrition Bulletin**, vol. 29, 2004, pp. 111-142.
- MOSCA, M.; BONIGLIA, C.; CARRATU, B.; GIAMMARIOLI, S.; NERA, V.; SANZINI, E.. Determination of  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 192-195, 2008.
- NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P. H.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p. 329-334, 2004.
- OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v. 18, p. 1518–1523, 2007.
- VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, Lleida, v. 21, p. 649-656, Aug, 2004.
- ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, p. 292–297, 2010.

## **CAPÍTULO IV**

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A extração de inibidores enzimáticos dos cereais cultivados na região Sul do Brasil foi possível, sendo que a melhor condição para aveia e trigo foi obtida ao utilizar o sistema de extração etanol 70 % e 12 horas de agitação, com inibição em torno de 90 %. Nas cultivares de arroz, o extrato bruto inibiu 96 % da ação da enzima amilase em ensaios *in vitro*, quando se empregou como extrator etanol 95 % e 7 h de extração.

Os extratos alcoólicos dos cereais contendo inibidores de amilase apresentaram maior especificidade para a amilase Fungamyl® do que para as demais enzimas estudadas, destacando-se como mais estável em pH 6 e 7 e temperatura de 25 °C, o que indica que a amilase denominada comercialmente de Fungamyl® apresentou propriedades físico-químicas e de especificidade que permitem empregá-la como indicativo de potencial anti-fúngico em tecidos cereais.

Os extratos inibidores de arroz, aveia e trigo caracterizados físico-quimicamente como prolaminas, apresentaram atividade inibidora específica média para amilase fúngica de 62; 33 e 18, respectivamente, expressos em % inibição  $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ .

O desempenho dos extratos obtidos de cereais confirmou a sua eficiência contra o desenvolvimento de *Fusarium graminearum*, pois todos restringiram seu crescimento em meio de cultura.

A partir desta etapa será necessário purificar estes inibidores para avaliar sua eficiência na defesa contra contaminação micotoxicológica e aplicar o conhecimento em programas genéticos capazes de aumentar a resistência desses grãos a determinados fungos ou extraí-los dos vegetais para outros fins.

## REFERÊNCIAS

- ABBASSY, M.A.; ABDELGALEIL S.A.M.; BELAL, A.S.H.; RASOUL, M.A.A. Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 345–350, 2007.
- ABES, J.I.; SIDENIUS, U.; SVENSSON, B. Arginine is essential for the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 151-155, 1993.
- AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BADIALE, E. **Variação de metionina em feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados**. Campinas: Unicamp, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola Universidade Estadual de Campinas, 1979.
- BADIALE-FURLONG, E.; VALENTE SOARES, L.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxin and fungi in wheat stored in elevators in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995.
- BADIALE-FURLONG, E.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA-SOARES, L. A. Enzymatic determination of soluble and insoluble dietary fiber in rice and wheat bran. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 48, n. 4, p. 35-44, 1998.
- BARAJ, E.;GARDA-BUFFON, J. BADIALE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-e Toxin in Malt Amylase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 53, n. 3, 2010.
- BARBIERI, L.; BATELLI, M.G.; STIRPE, F. Ribosome- inactivating proteins from plantas. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1154, p. 237-282, 1993.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.
- BEBER, R.C.; DE FRANCISCO, A.; ALVES, A.C.; DE SÁ, R.M.; OGLIARI, P. Caracterização química de genótipos brasileiros de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciencia de alimentos:Acta Científica Venezolana**, v. 53, p. 202–209, 2002.
- BELIËN, T., CAMPENHOUT, S.V.; VAN ACKER, M.; VOLCKAERT, G. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 407–414, 2005.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997.
- BEN - ELARBI, M.; KHEMIRI, H.; JRIDI,T.; BEN HAMIDA, J. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v.332, p. 426–432, 2009.
- BERI, V.; GRUPTA, R. Acetylcholinesterase inhibitors neostigmine and physostigmine inhibit induction of alpha-amylase activity during seed germination in barley, *Hordeum vulgare* var. Jyoti. **Life Sciences**, v.80, p. 2386-2388, 2007.
- BERTINI, L.; CAPORALE, C.; TESTA, M.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. **FEBS Letters**, v. 583, p. 2865–2871, 2009.

BETCHEL, D.B.; POMERANZ, Y. Ultrastructure and cytochemistry of mature oat (*Avena sativa* L.) endosperm. The aleurone layer and starchy endosperm. **Cereal Chemistry**, v. 58, n.1, p. 61-69. 1981.

BIZZOTTO, C.S. **Obtenção de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina: emprego da pancreatina e da corolase pp**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

BLANCO-LABRA, A.; ITURBE-CHIÑAS, F.A. Purification and characterization of an  $\alpha$  – amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). **Journal Food Biochemistry**, v.5, p. 1-17, 1981.

BLOCH Jr, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect  $\alpha$ -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat d-purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, p. 101-104, 1991.

BOBBIO, F.O; BOBBIO P. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Varela, 1989.

BOGATEK, R.; GNAZDOWSKA, A.; ZAKRZEWSKA, W.; ORACZ, K.; GAWROŃSKI, S.W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. **Biologia Plantarum**, v. 50, p.156-158, 2006.

BONIGLIA, C.; CARRATÙ, B.; DI STEFANO, S.; GIAMMAROLI, S.; MOSCA, M.; SANZINI, E. Lectins, trypsin and  $\alpha$ -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 689-693, 2008.

BORGHT, A.V.D.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W.S.; DELCOUR, J.A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main process and the factors involved. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 221-237, 2005.

BRASIL. EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Origem e história do arroz**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> Acesso em: 17 set 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução-RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 set 2005.

BRASIL. Resolução – RDC nº 274, de 16 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 2002. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 mar.2009.

BRUTUS, A., RECA, I.B.; HERGA, S.; MATTEI, B.; PUIGSERVER, A.; CHAIX, J.C.; JUGE, N.; BELLUNCAMPI, D.; GIARDINA, T.. A family 11 xylanase from the pathogen *Botrytis cinerea* is inhibited by plant endoxylanase inhibitors XIP-I and TAXI-I. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 160–166, 2005.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L. & PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica**. 5 ed. São Paulo: Ed. Thompson Learning; 2007.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.

CARNEIRO, L.M.T.A.; BIAGI, J.D. FREITAS, J.G.; CARNEIRO, M.C.; FELÍCIO, J.C. Diferentes épocas de colheita, secagem e armazenamento na qualidade de grãos de trigo comum e duro. **Boletim SBCTA**, v. 31, n.1, p. 25-32, 1997.

- CARREIRA, R.L.; RAMOS, C.S.; SILVA, M.R.; LOPES, C.O. Jr; SILVESTRE, M.P.C.; PIROZI, M.R. Emprego de metodologia enzimática na obtenção de extratos protéicos de farinha de trigo, **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 919-922, 2009.
- CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 743–750, 2001.
- CASTRO, E. M. et al. **Qualidade de grãos de arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.
- CHEATAN, S.; SREERAMA, Y.M.; MALLESCI, N.G. Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. **Food Chemistry**, v.111, p. 187–191, 2008.
- CHEN, S.X.; HAMMOND, D.J.; KLOS, A.M.; WOOD, W.D.; WYDICK, J.E; WYTOLD, L.R. Chromatographic purification of human  $\alpha_1$  proteinase inhibitor from dissolved Cohn fraction IV-1 paste. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 207-218, 1998.
- CHEN, X.; XU, G.; LI, X.; LI, Z.; YING, H. Purification of an  $\alpha$ -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 765-768, 2008.
- CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; RUSSIN, J.S.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus*  $\alpha$  –amylase. **Phytopathology**, v. 89, p. 902-907, 1999.
- CHEN, Y.-J.; CHEN, Y.-Y.; WU, C.T.; YU, C.C.; LIAO, H.F. Prolamin, a rice protein, augments anti-leukaemia immune response. **Journal of Cereal Science**, v.X, p.1-9, 2010.
- CHRISTELLER, J.T.; FARLEY, P.C.; RAMSAY, R.J.; SULLIVAN, P.A.; LAING, W.A. et al. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, n.1, p. 160-167, 1998.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 735-746, 1992.
- CHOUDHURY A, MAEDA, K.; MURAYAMA,R.; DIMAGNO, E.P. Character of a wheat amylase inhibitor preparation and effects on fasting human pancreaticobiliary secretions and hormones. **Gastroenterology**, v. 1, p. 1313–1320, 1996.
- CISTERNAS, J.R.; VARGAS, J.; MONTE, O. **Fundamentos de Bioquímica Experimental**. São Paulo: Editora Atheneu, 2ª Ed., 2001.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. **Grãos, safra 2009/ 2010, janeiro 2010**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra>>. Acesso em: 22 mar. 2010.
- COPELAND, L. O.; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 3 ed. London: Chapman and Hall, 1995.
- CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Induction of PR proteins in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium verticillioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 189-200, 1992.
- COUTO, R.C.; LEMOS-MENDES, G.R.; FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. Condições de cultivo e de processamento de arroz e seu efeito na atividade de lipases. **Mostra de Produção Universitária**, Universidade Federal do Rio Grande, 2009.
- DAS, G., SEN-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, v. 69, p. 497–501, 1992.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. **Food Technology**, p. 148-155, January, 1989.

DEEPAK, A.V.; THIPPESWAMY, G.; SHIVAKAMESHWARI, M.N.; BHARATHI- SALIMATH, P.; Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal activity from bulbs of *Urginea indica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 735–742, 2003.

DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M.; ORTUNO, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* **Food Chemistry**, n. 83, p. 75-78, 2003.

DE SOUZA, C.E.M. **Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação de hidroclorotrizina e cimetidina em plasma humano e aplicação em estudos de farmacocinética comparada.** Pernambuco: UFPe, 2008. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

DIKBAS, N.; KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n.2, p. 179-182, 2008.

DIXON, M.; WEBBER, E.C.; THERONE, C.J.R.; TRIPTON, K.F. **Inhibition and activation.** In Enzymes. New York : Academic Press, p. 332-381, 1979.

DONEGAN, K.K.; SEIDLER, R.J.; FIELNAD, V.J.; SCHALLER, D.L.; PALM, C.J.; GANIO, L.M.; CARDWELL, D.M.; STEINBERGER, Y. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod population. **Journal of Applied Ecology**, v. 34, n.3, p. 767-777, 1997.

DORNEZ, E.; GEBRUERS, K.; JOVE, I.J.; KETELAERE, B.; LENARTZ, J.; MASSAUX, C.; BODSON, B.; DELCOUR, J.A.; COURTIN, C.M. Effects of fungicide treatment, N-fertilisation and harvest date on arabinoxylan, endoxylanase activity and endoxylanase inhibitor levels in wheat kernels. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 190-200, 2008.

DORS, G.C.; PINTO, R.H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, p. 219-224, 2009.

DOYLE, M.E. **Fusarium mycotoxins.** Food Research Institute. Madison: University of Wisconsin, 1997.

ELIAS, M.C. **Secagem e armazenamento de grãos em média e pequenas escalas.** Pelotas: Universitária, 2000.

ELLIOTT, G.O.; MCLAUCHLAN, W.R.; WILLIAMSON, G.; KROON, P.A.A.D. A wheat xylanase inhibitor protein (XIP-I) accumulates in the grain and has homologues in other cereals. **Journal of Cereal Science**. v. 37, n. 2, p. 187-194; 2003.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos – uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Educs, 2004.

FAKHOURY, A.M.; WOLOSHUK, C.P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal  $\alpha$  amylases by a lectinlike protein from *Lablab purpureus*. **Molecular Plant Microbe interaction**. n. 14, p. 955-961, 2001.

FAO/WHO. **Protein quality evaluation**, 1991.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Produção mundial de grãos e arroz.** Disponível em <http://<http://fao.org>>. Acesso em: 06 set 2008.

FENG, G.H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.S.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Wheat: Amino Acid Sequences and Patterns of Inhibition of Insect and



- Human  $\alpha$ -Amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.5, p.419-426, 1996.
- FERNANDES, L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, n.1, p. 43-51, 2007.
- FERNANDEZ – PINTO, V.E.; TERMMINIELLO, V.C.; BASILICO, J.C.; RITIENI, A.. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.157-162, 2008.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R.I. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion and Biotechnology**, v. 15, p. 155-161, 2004.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; DE SÁ, M.C.; IDA, E.I.; HIROOKA, E.Y. Produção e caracterização de amilase de *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 1326, 2000
- FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a Hydrophobic Amylase Inhibitor from Corn (*Zea mays*) Seeds with Activity Against Amylase from *Fusarium verticillioides*. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 8, p. 917-922, 2003a
- FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v. 87, n.3, p. 233-240, 2003b.
- FINARDI-FILHO, F. **Estrutura molecular comparativa dos iso-inibidores de  $\alpha$ -amilase do feijão** (*Phaseolus vulgaris*). São Paulo: USP, 1990. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1990.
- FLOSS, E.L. **Produção e industrialização de aveia**. In: FIOREZE, I. (Ed.). Pólo de desenvolvimento científico e tecnológico- núcleo alimentos. Passo Fundo: EdiUPF, 1998. p. 55-88.
- FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. **Developments in microbial extracellular enzymes**. In: Topics in enzyme and fermentation biotechnology. Chichester: Editora A. Wiseman, v. 3, 1979.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; BLOCH Jr, C.; SILVA, C.P.; GROSSI DE SÁ, M.F. Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities, **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 8, p. 2166–2173, 2000.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁI, M.F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insects  $\alpha$ -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.
- FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W.  $\alpha$ -Amylase inhibitory effect of 3 $\beta$ -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food Chemistry**, v. 116, p. 285–288, 2009.
- FRELS, J. M.; RUPNOW, J. H. Characterization of two  $\alpha$ -amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**, v. 5, p. 72-77, 1985.
- FROLOVA, G.M.; SIL'CHENKO, A.S.; PIVKIN, M.V.; MIKHAILOV, V.V. Amylases of the Fungus *Aspergillus flavipes* Associated with *Fucus evanescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 134–138, 2002.
- GARRETT, H.R.; GRISHAM, M.C.H. **Biochemistry**. Saunders College Publishing, USA, 1995.

- GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Journal of Pest Science**. v. 52, p.165–175, 1998.
- GIBBS, B.F.; ALLI, I. Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 31, n.3, p.217-225, 1998.
- GILANI, G.S.; COCKELL, K.A.; SEPEHR, E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods, **Journal of AOAC International**, v. 88, n.3, 2005.
- GOMES, C.E.M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. Rio Grande do Norte: UFRN, 2004. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.
- GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anizopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Campinas: Unicamp, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- GUARIENTI, E. **Qualidade industrial do trigo**. 2. ed. Passo Fundo: EMBRAPA- CNPT, 1996.
- GUO, B.Z.; CLEVELAND, T.E.; BROWN, R.L.; WINDSTROM, N.W.; LYNCH, R.E.; RUSSIN, J.S. Distribution of antifungal proteins in maize kernels tissues using immunochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 295-299, 1999.
- GOESAERT, H.; SLADE, L.; LEVINE, H.; DELCOUR, J.A. Amylases and bread firming – an integrated view. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 345–352, 2009.
- GÓMEZ-LEYVA, J.F.; BLANCO-LABRA, A. Bifunctional  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22KDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14KDa. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 177–183, 2001.
- GONZÁLEZ, H.H.L.; PACIN, A.; RESNIK, S.L.; MARTINEZ, E.J. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinean wheat in 1993. **Mycopathologia**, v.135, p. 129-134, 1996.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2 ed., 1994.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; MIRKOV, E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta: An International Journal of Plant Biology**, v. 203, p. 295–303, 1997.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- GUTKOSKI, L.C.; EL-DASH, A.A. Avaliação da estabilidade hidrolítica em produtos de aveia tratados hidrotermicamente. **Boletim CEPPA**, v. 16, n.2, p. 171-180, 1998.
- GUTKOSKI, L.C.; NODARI, M.L.; NETO, R.J. Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 91-97, 2003.
- GUTKOSKI, L.C.; PAGNUSSATT, F.A.; SPIER, F.; PEDÓ, I. Efeito do teor de amido danificado na produção de biscoitos tipo semi-duros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 787-792, 2007.
- GUTKOSKI, L.C.; PEDÓ, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. p. 191.

HACKBART, H. **Ocratoxina A e Citrinina em arroz: um estudo de metodologia, ocorrência e relação com variáveis abióticas**. Rio Grande: FURG, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

HAQ, I.; ALI, S. e IQBAL, J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 921-924, 2003.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n.3, p.347-359, 2001.

HAZEL, C.M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 51-59, 2004.

HENNEQUIN, C.; ABACHIN, E.; SYMOENS, F.; LAVARDE, V.; REBOUX, G.; NOLARD, N.; BERCHE, P. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3586-3589, 1999.

HOLMES, R.A.; BOSTON, R.S.; PAYNE, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 559-572, 2008.

HOSENEY, R.C. **Principio de ciencia e tecnologia de los cereales**. Zaragoza: Acribia. 1991.

HUANG, W.Y.; TIETZ, N.W. Determinations of amylase isoenzymes in serum by use of a selective inhibitor. **Clinical Chemistry**, v. 28, n.7, p. 1525-1527, 1982.

IULEK, J.; FRANCO, L.O.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C.T.; BLOCH, C.Jr.; RIGDEN, D.J.; SÁ, M.F.G.de. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, p. 1195-1204, 2000.

IRGA. Instituto Rio-Grandense do Arroz. **Arroz: um alimento nobre e econômico**. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>> .Acesso em: 06 set 2009.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 309-315, 1996.

IULEK, J., FRANCO, O.L., SILVA, M., SLIVINSKI, C.T., BLOCK Jr., C., RIGDEN, D.J., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.32, p. 1195-1204, 2000.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Phage display of a double-headed proteinase inhibitor: analysis of binding domains of potato proteinase inhibitor II. **Molecular Breeding**, v.1, n.2, p. 181-191, 1995.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, cap. 2, 1985. p. 17-57.

KABAL, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p. 593-619, 2006.

KADOZAWA, P.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.L. Inibidores de enzimas contra *Fusarium moniliforme* durante a germinação de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 249-258, 2002.

- KANDRA, L.; ZAJÁČZ, J.; REMENYK, J.; GYEMÁNTI, G. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary  $\alpha$ -amylases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, p. 824-828, 2005.
- KARLSON, P.; PULIDO, F. **Manual de Bioquímica**. 2 ed. Barcelona: Editorial Marin, 1967. 323 p.
- KEARSLEY, M.W.; DZIEDIC, S.Z. **Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives**. Chapman e Hall, 1995.
- KENT, N.L. **Introducción para Estudiantes de ciencia de los alimentos y agricultura**. Zaragoza: Acribia, 1991. 221 p.
- KRITVHEVSKI, D. Dietary fiber, **Annual Review of Nutrition**, v.8, p.301-328, 1988.
- KRONBAUER, E.A.W.; PERALTA, R.M.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M. Produção de xilanases por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **Boletim CEPPA**, v. 25, n.2, p. 207-216, 2007.
- LAJOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F. Purificação do inibidor de  $\alpha$ -amilase do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) var Rico 23. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 1-11, 1984.
- LANDRY, J. Comparison of extraction methods for evaluating zein content of maize grain. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 188-189, 1997.
- LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109, 2002.
- LAYER, P.; CARLSON, G.L.; DIMAGNO, E.P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans, **Gastroenterology**, v. 88, p. 1895-1902, 1985.
- LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; SILVA, L.M.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C.; NASCIMENTO, M.D.S.B. Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico. **Revista Newslab**, ed. 70, 2005.
- LEE, J.R.; SEONG-CHEOL, P.; MI-HYUN, K.; JI-HYUN, J.; MI-RIM, S.; HO-LEE, D.; GYEONG-CHEON, M.; YOONKYUNG, P.; KYUNG-SOO, H.; SANG-YEOL, L. Antifungal activity of rice Pex5p, a receptor for peroxisomal matrix proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, p. 941-946, 2007.
- LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. Tradução da 2ª edição americana, supervisão: José Reinaldo Magalhães. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.
- LEMONS, M.R.J.; SOARES, L.A.S. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. **Revista Óleos e Grãos**, p. 40-47, nov-dez. 1999.
- LÉVÊQUE, E.; JANE, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, p. 3-14, 2000.
- LIU, Z. H., CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.49-52, 2005.
- LOPES, J.L.S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. São Paulo: USP, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Física, Universidade de São Carlos, 2006.
- LORI, G.A., SISTERNA, M.N., HAIDUKOWSKI, M., RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological Research**, v. 158, p. 29-35, 2003.

- LORINI, L. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 80 p.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.]
- LUMEN, B.O.; CHOW, H. Nutritional quality of rice endosperm. In: LUH, B. S. (Ed.). **Rice utilization**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1995. p. 363-395.
- LUZ, C.A.S.; DA LUZ, M.L.G.S.; BIZZI, L.T.; FALK, L.C.; ISQUIERDO, E.P.; LOREGIAN, R. Relações granulométricas no processo de brunimento de arroz. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v.25, n.1, p.214-221, jan./abr. 2005.
- LYONS, A.; RICHARDSON, M.; TATHAM, A.S.; SHEWRY, P.R. Characterization of homologous inhibitors of trypsin and alpha-amylase from seeds of rye (*Secale cereale L.*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 915, p. 305–313, 1987.
- MACKINTOSH, S.H.; MEADE, S.J.; HEALY, J.P.; SUTTON, K.H.; LARSEN, N.G.; SQUIRES, A.M.; GERRARD, J.A. Wheat glutenin assemble into a nanostructure with unusual structural features. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 157-162, 2009.
- MANO, Y.; KAWAMINAMI, K.; KOJIMA, M.; OHNISHI, M.; ITO, S. Comparative composition of brown rice lipids (lipid fractions) of indica and japonica rices. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.63, n.4, p.619-626, 1999.
- MAROCHI, M.A.; VALENTE-SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n.2, p. 17-20, 1996.
- MARQUART, L.; JACOBS, D.R.; SLAVIN, J.L. Whole grains and health an overview. **Journal of the American College Nutrition**, v.19, p. 289-290, 2000.
- MARSARO-JÚNIOR, A.L. LAZZARI, S.M.N.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n.3, p. 443-450, 2005.
- MATSUO, T. **Science of the rice plant. V. II - Physiology**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1995. 1245 p.
- MÁTUS-CÁDIZ, M.A.; HUCL, P.; PERRON, C.E.; TYLER, R.T. Genotype X environment interaction for grain color in hard white spring wheat. **Crop Science**, v. 43, p. 219-226, 2003.
- McKNIGHT, I.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene Alimentar**, v.14, n.72, p.35 – 45, 2000.
- McKEVITH, B. Nutritional aspects of cereal. **Nutrition Bulletin**, v. 29, p. 111-142, 2004.
- MENEZES, B.S.; RIVERO-MEZA, S.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. **Efeito do uso de pesticidas na composição centesimal do arroz e seus co-produtos**. VII Mostra de Produção Universitária, Universidade Federal do Rio Grande, 2008.
- MEDINA, J.; HUEROS, G.; CARBONERO, P. Cloning of cDNA, expression, and chromosomal location of genes RT encoding the three types of subunits of the barley tetrameric inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 535–542, 1993.
- MENDICHI, R.; FISICHELLA, S.; SAVARINO, A. Molecular weight, size distribution and conformation of Glutenin from different wheat cultivars by SECeMALLS. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 486-493, 2008.
- MENEZES, T.J.B. Fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Documento 110, 2007.

MIRANDA, M.Z.; MORI, C.; LORINI, I. **Qualidade do trigo brasileiro – safra 2004**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 92 p.

MITCHEL, D.A.; ILYAS, R.; DODDS, A.W.; SIM, R.B. Enzyme-independent, orientation-selective conjugation of whole human complement C3 to protein surfaces. **Journal of Immunological Methods**, v. 337, p. 49-54, 2008.

MOSCA, M.; BONIGLIA, C.; CARRATU, B.; GIAMMARIOLI, S.; NERA, V.; SANZIN, E. Determination of  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 192-195, 2008.

MORRISON, W.R. Cereal lipids. In: POMERANZ, Y. **Advances in Cereal Science and Technology**, Saint Paul, v. 2, 1978. p. 221-288.

MOSS, O.M. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 73, p. 80S-88S, 1992.

MOTOMURA, M.; LOURENÇO, C.E.; VENTURINI, D.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Screening and isolation of anti- *Fusarium moniliforme* compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.213-217, 1996.

MUCCILLI, V.; CUNSOLO, V.; SALETTI, C.R.; FOTI, S.; MARGIOTTA, B.; SCOSSA, F.; MASCI, S.; LAFIANDRA, D. Characterization of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 134-139, 2010.

MUNDSTOCK, C.M. **Cultivo dos cereais de estação fria: trigo, cevada, aveia, centeio, alpiste, triticale**. Porto Alegre: NBS, 1983. 265 p.

MUNDY, J.; HEJGAARD, J.; SVENDSEN, J. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous  $\alpha$ -amilase and subtilisin. **FEBBES Letters**, v.167, p. 210-214, 1984.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal  $\alpha$ -amylases: an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005.

MURPHY, J.P.; HOFFMAN, L.A. **The origin, history, and production of oat**. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (Ed.) *Oat science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p. 1-28.

NAKASE, M.; ADACHI, T.; URISU, A.; MIYASHITA, T.; ALVAREZ, A.M.; NAGASAKA, S.; AOKI, N.; NAKAMURA, R.; MATSUDA, T. Rice (*Oryza sativa* L.)  $\alpha$ -amylase inhibitors of 14-16 kda are potential allergens and products of a multigene family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2624-2628, 1996.

NANDI, S.; DAS, G.; SEN-MANDI, S.  $\beta$ -amylase activity as an Index for germination potential in rice. **Annals of Botany**, v. 75, p. 463-467, 1995.

NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 201-205, 1997.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P. H.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p. 329-334, 2004.

O'CALLAGHAN, M., GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review at Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

- ODA, Y.; MATSUNAGA, T.; FUKUYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MORIMOTO, T. Tertiary and quaternary structures of 0.19 R-Amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å Resolution. **Biochemistry**, v. 36, p. 13503-13511, 1997.
- ODIBO, F.L.C.; ULBRICH-HOFMANN, R. Thermostable alpha-amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. **Acta Biotechnologica**, v. 21, n. 2, p. 141-153, 2001.
- O'CONNOR, M.C.; McGEENEY, K., F. Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic alpha-amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 658, 387-396, 1981.
- O'DONNELL, M.; FITZGERALD, O.; MCGEENEY, K. Differential serum amylase determination by use of an inhibitor, and design of a routine procedure. **Clinical Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 560-566, 1977.
- OERKE, E.C.; DEHNE, H.W.; SCHOËNBECK, F.; WEBER, A. **Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops**, Amsterdam: Elsevier, 1994.
- OLIVA, G.; IULEK, J.; IDA, E.I. Crystallization and preliminary crystallographic studies of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*). **Acta Crystallographica D**, v. 52, p. 1016-1017, 1996.
- OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.
- OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO J.; SALES, M.P. Cysteine proteinase and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n.1, p. 91-104, 2003.
- OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v. 18, p. 1518–1523, 2007.
- OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2 ed. London: Longmans, 1924. 154 p.
- PALMER, T. **Understanding enzymes**. Ed. Ellis Horwood, 1981.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnological Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2000.
- PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A.R.L.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.3, p.892-896, 2000.
- PARK, Y.E.; BAIK, B.K.; LIM, S.T. Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and *in vitro* digestibility of waxy maize starch gel. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 43–48, 2009.
- PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 171-180, 2004.
- PEDÓ, I.; SGARBIERI, V.C. Caracterização química de cultivares de aveia (*Avena sativa* L), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n.2, p. 78-83, 1997.
- PEREIRA, R.A. de. **Inibidores protéicos e seu potencial uso no controle de insetos-praga de importância para a cultura do café e do feijão**. Brasília: UnB, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2005).
- PEREIRA, M.E.; DÖRR, F.A.; PEIXOTO, N.C.; LIMA-GARCIA, J.F.; BRITO, G.G. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-



like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n11, p. 1633-1641, 2005.

PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M.C.M.; NETO, O.B.O.; FIGUEIRA, E.L.Z.; JIMENEZ, A.V.; DE-SÁ, M.F.G. An  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009–2016, 2006.

PETERSON, M.P. Composition and Nutritional Characteristics of Oat Grain and Product. In: MARSHALL, H.G.; SOLLELS, M.S. **Oat science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, Inc., 1992. p. 266-287.

PETERSON, D.M.; SMITH, D. Changes in nitrogen and carbohydrate fractions in developing oat groats, **Crop Science**, v. 16, n.1, p. 67-71, 1976.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, M.N.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.179-187, 2006.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, n.1, p. 79-85, 2001.

POSNER, E.S. Wheat. In: KULP, K.; PONTE, J.G. **Handbook of cereal science and technology**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p.1-29.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos – volume 2**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2002. 226 p.

RAKWALL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA-N-S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor : tight regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v. 263, p, 189-198, 2001.

RANGEL, A.; SARAIVA, K.; SCHWENGBER, P.; NARCISO, M.S.; DOMONT, G.B.; FERREIRA, S.T.; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds, **Food Chemistry**, v. 87, p. 491-499, 2004.

RANI, K.U.; PRASADA-RAO, U.J.S.; LEELAVATHI, K.; HARIDAS-RAO, P. Distribution of Enzymes in Wheat Flour Mill Streams. **Journal of Cereal Science**, v.34, p. 233–242, 2001.

RAO, V.; MULVANEY, S.; DEXTER, J. Distribution of Enzymes in Wheat Flour Mill Streams. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 233-242, 2001.

RASPER, V. F. Quality evaluation of cereal and cereal products. In: LORENZ, K. J. and KULP, K. (ed.) **Handbook of cereal science and technology**, New York: Marcel Dekker, 1991. p 595-638.

RASPER, V.F.; WALKER, C.E. Quality evaluation of cereals and cereal products. In: KULP, K.; PONTE, J.G. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2ª ed., 2000. p.505-537.

RAVEN, P.H.; et al. **Biologia Vegetal**. 5ª edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. 728 p.

REGULY, J.C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: produção de enzimas e engenharia das fermentações**. Pelotas: UFPel, v. 3, 2000. 217 p.

REKHA, M.R.; PADMAJA, G. Alpha-amylase inhibitor changes during processing of sweet potato and taro tubers. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 285–294, 2002.

RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v. 6, p. 235-253, 1980-1981.



- RICHARDSON, M.; CAMPO, F.A.P; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M.L.R; MAIA, G.M.C; YARWOOD, A. The amino acid sequence and relative (inhibitory) site of the major trypsin iso-inhibitor (DE 5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochemical and Biophysical Acta**, v.. 872, p. 134-140, 1986.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- ROY, I.; GUPTA, M. N. Purification of a 'double-headed' inhibitor of alpha-amylase / Proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, v. 9, p. 239-245, 2000.
- SABORNI, A.A.; KARBASSI, F. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylases. **Thermochimica Acta**, v. 362, p. 121-129, 2000.
- SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; BARBER, D.; LOPEZ-OTIN, C.; ARMENTIA, A.; SALCEDO, G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity, **Biochemical Journal**., v. 281, p. 401-405, 1992.
- SAURA-CALIXTO, F. Fibra dietética de manzana: hacia nuevos tipos de fibras de alta calidad. **Alimentaria**, v. 242, p. 57-61, 1993.
- SAURA-CALIXTO, F.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; GÖNI, J. Contribution of cereals to dietary fibre and antioxidant intakes: Toward more reliable methodology. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 291-294, 2009.
- SCHOLLENBERGER, B- M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANCK, DROCHNER, W. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 317-32, 2005.
- SCHRÖDTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.
- SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. Capítulo 9, p.675-804.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Varela, 1996. p. 186-193.
- SHAINKIN, R.; BIRK, Y. Alpha-amylase inhibitors from wheat isolation and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 221, p. 502-513, 1970.
- SHELTON, D.R.; LEE, W.J. **Cereal Carbohydrates**. In: KULP, K.; PONTE, J.G. Handbook of cereal science and technology. New York: Marcel Dekker, 2ª ed., 2000. p. 385-415.
- SHOBANA,S.; SREERAMA, Y.N.; MALLESHI, N.G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of alpha-glucosidase and pancreatic amylase. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1268-1273, 2009.
- SILANO, V. **alpha-Amylase inhibitors**. In: Enzymes and their roles in cereal technology (edited by Kruger J.E. Lineback D. and Stauffer, C.E.), p. 141-199, 1987.
- SILVA, R.F. da; ASCHERI, J.L.R.; PEREIRA, R.G.F.A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 18, n.3, p. 325-330, 2007.
- SILVEIRA, C.O; SOUZA, C.F.V. Variações do método de quantificação da proteína solúvel em soja desativada utilizada na alimentação animal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, n.2, p. 117-127, 2007.
- SIMIONI, D.; GUTKOSKI, L.C.; ELIAS, M.C.; DEUNER, C.C.; PAGNUSSATT, F.A.; OLIVEIRA, M. Secagem intermitente e armazenamento de aveia cultivar UPFA 20 Teixeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.2, p. 211-217, 2007a.

- SIMIONI, D.; WEBBER, F.H.; GUTKOSKI, L.C.; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, L.C.; AOSANI, E. Caracterização química de cariopses de aveia branca. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 18, n.2, p. 191-196, 2007b.
- SIVAKUMAR, S.; et al. Inhibition of insect pest  $\alpha$ -amylases by little and Wnger millet inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.85, p. 155-160, 2006.
- SVIHUS, B.; UHLEN, A.K.; HARSTAD, O.M. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, p. 303-320, 2005.
- SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association Off Official Analytical Chemists**,v. 72, p. 22-26, 1989.
- SOUZA, E.J.; MARTIN, J.M.; GUTTIERI, M.J.; O'BRIEN, K.M.O.; HABERNICH, D.K.; LANNING, S.P.; McLEAN, R.; CARLSON,G.R.; TALBERT, L.E.. Influence of genotype, environment and nitrogen management on spring wheat quality. **Crop Science**, v. 44, p. 425-432, 2004.
- SOUZA, S.R; STARCK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Teores e qualidades das proteínas de reserva do arroz em função de aplicação suplementar de N. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.5, p. 575-583, 1993.
- STORCK, C.R.; SILVA, L.P.; FAGUNDES, C.A.A. Categorizing rice cultivars based on differences in chemical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p. 333–341, 2005.
- STRYER, L. **Bioquímica**. Espanha: Editora Reverte, 1979.
- SVENSSON, B. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 141- 157, 1994.
- SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 145– 156, 2003.
- SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 145– 156, 2004.
- SWEENWEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, n. 43, p. 141-158, 1998.
- TAN, N.H.; RAHIM, Z.H.A.; KHOR, H.T.; WONG, K.C. Chymotrypsin inhibitor activity in winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 163–166, 1984.
- TANAWAKI, M.; IAMANAKA, B.T.; BANHE, A.A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruits pulps. **Journal Food Micology**, v.2, n.1, p. 291-302, 1999.
- TANAWAKI, M.; SILVA, N. Fungos deterioradores de alimentos – ocorrência e detecção. **Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL**, Campinas - SP; 1996. 74 p.
- TANG; S.; HETTIARACHCHY;N.S.; SHELLHAMMER,T.H. Protein extraction from heat stabilized defatted rice bran: physical processing and enzyme treatments. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 7444-7448, 2002.
- TEDRUS, G.A.S.; ORMENESE, R.C.S.C.; SPERANZA, S.M.; CHANG, Y.K.; BUSTOS, F.M. Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade dos pães. **Revista SBCTA**, v. 21, n.1, p. 20-25, 2001.
- TERASHIMA, M.; HAYASHI, N.; THOMAS, B.R.; RODRIGUEZ, R.L.; KATOHA, S. Kinetic parameters of two rice  $\alpha$ -amylase oligosaccharide degradation. **Plant Science**, v. 116, p. 9-14, 1996.

- TRIPATHI, P.; LEGGIO, L.L.; MANSFELD, J.; ULBRICH-HOFMANN, R.; KAYASTHA, A.M.  $\alpha$ -Amylase from mung beans (*Vigna radiata*) – Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modeling. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1623-1631, 2007.
- UCHIDA, R.; NASU, A.; TOKUTAKE, S.; KASAI, K.; TOBE, K.; YAMAJI, N. New enzymatic synthesis of 6<sup>3</sup>-modified maltooligosaccharides and their inhibitory activities for human  $\alpha$ -amylases. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 69-76, 1998.
- VALÊNCIA, A.; BUSTILLO, A.E.; OSSA, G.E.; CHRISPPEELS, M.J.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p. 207–213, 2000.
- VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA, J.W.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Detection of  $\alpha$ -amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic PhastGels. **Analytical Biochemistry**, v.366, p. 113-115, 2007.
- VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA, J.W.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Activity of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive  $\alpha$ -amylase of the coffee berry borer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2315-2320, 2008.
- VALENTE-SOARES, L. **Curso Básico de Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. São Paulo: Editora Manole, v,1, 337 p. 2006.
- VECHIA, A.D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.2, p 324-327, 2007.
- VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, v. 21, p. 649-656, 2004.
- XAVIER, L.P. **Purificação parcial, propriedades e purificação cinética de proteases tripsina-like do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis***. Viçosa:UFV, 2006. Tese (Doutorado em Pós-Graduação em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- WANG, J.;SHI, Z.Y; WANG, X.S.; SHEN, G.Z.; ZHANG, J.L. The expression pattern of a rice proteinase inhibitor gene OsPI8-1 implies its role in plant development. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n.14, p. 1519-1529, 2008.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P. **Fermentation and enzyme technology**. Nova York: Wiley-Interscience. 1979.
- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza, Espanha: Editora Acribia S. A., 1995. 228p.
- WEBER, F.H.; GUTKOSKI, L.C.; ELIAS, M.C. Caracterização química de cariopses de aveia (*Avena sativa* L) da cultivar UPF 18. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p., 2002.
- WELHAM, T.; O'NEILL, M.O.; JOHNSON, S.; WANG, T.L.; DOMONEY, C. Expression patterns of genes encoding seed trypsin inhibitors in *Pisum sativum*. **Plant Science**. v. 131, p. 13-24, 1998.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food science**. 2 ed. Marecl Dekker Inc., 1994.
- WHITAKER, J.R.; FINARDI-FILHO, F.; LAJOLO, F.M. Parameters involved in binding of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitor with black bean inhibitor: role of sulfhydryl groups, chloride calcium, solvent composition and temperature. **Biochimie**, Paris, v.70, p. 1153-1161, 1988.
- WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**, 5<sup>o</sup> ed. Cambridge: University Press, 2000. 784p.

WOLZAK, A.; BRESSANI, R.; BRENES, R.G. A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins, **Quality Plantarum Foods Human Nutrition**, v.31, n.1, p. 31-43, 1981.

YAMASAKI, Y.  $\alpha$ -Amylase in germinating millet seeds. **Phytochemistry**, v. 64, p. 935–939, 2003.

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

ZDRADEK, C.P. **Otimização de crescimento dos fungos comestíveis *P. ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais**. Rio Grande: FURG, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2001.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, p. 292–297, 2010.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.