

# Efeito da umidade na ação de inibidores enzimáticos em cereais

**Freitas, C.H.; Bretanha, C.C; Pagnussatt, F.A.; Garda-Bufferon, J.; Badiale-Furlong, E.**

## **Introdução**

Os grãos são ricos em diferentes inibidores protéicos que agem sobre a  $\alpha$ -amilase e outras enzimas degradando os polissacarídeos e controlando a atividade enzimática, evitando com isso a germinação precoce e dificultando a ação de patógenos. Inibidores de  $\alpha$ -amilases já foram descritos em feijão e cereais, conforme FIGUEIRA et al. (2003) e MARSARO-JÚNIOR et al (2005). Entre os cereais, o trigo destaca-se como a principal fonte, embora aveia, milho e arroz também possuam inibidores enzimáticos.

O aumento natural de defesa dos vegetais pode aumentar a produtividade na agricultura e a segurança alimentar. Baseado nisso, a identificação dos inibidores enzimáticos e a caracterização do seu mecanismo de ação com ênfase em cereais cultivados na região sul torna-se uma ferramenta útil no controle de patógenos, especialmente de fungos que atacam os grãos no campo e ao longo do armazenamento.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da umidade e do tempo de incubação na eficiência de inibidores enzimáticos presentes em arroz, aveia e trigo.

## **Metodologia**

As sementes de arroz foram fornecidas pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), trigo pela empresa OR Melhoria de Sementes e aveia pela Universidade de Passo Fundo. As amostras foram submetidas 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.

A extração dos inibidores foi realizada homogeneizando-se 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 o período inicial de 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, adicionou-se 10 mL de solvente e a extração foi reiniciada por um período menor, centrifugada e o sobrenadante recolhido, repetindo-se o procedimento. Após reunir as alíquotas de cada extração, o sobrenadante foi filtrado e utilizado como fonte de inibidores enzimáticos, em duplicata.

Os extratos contendo inibidores de amilase foram incubados com  $\alpha$ -amilase fúngica comercial (Fungamyl® 800 L) 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 0,1N. O iodo residual foi medido por iodometria, sendo a absorbância

do complexo medida a 620 nm, em quadruplicata. 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.

## Resultados e Discussão

Entre os cereais estudados, a aveia apresentou inibição superior ao arroz e trigo, de 88% no tempo zero e 64% ao final do experimento, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 Inibição (%) em arroz, aveia e trigo sob diferentes condições de umidade e tempo

Amostra	Dias				
	0	1	2	4	8
Arroz 20%	69 <sup>b</sup>	13 <sup>1</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>

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, indicando que essas condições de umidade interferiram na eficiência do inibidor, que atua de forma preventiva ao ataque fúngico. Esta possibilidade foi confirmada ao observar o efeito da umidade a 80% sobre o extrato contendo o inibidor, com valor de 75% no tempo zero, decaindo para 26% no oitavo dia de experimento.

As umidades de 20, 50 e 80% não afetaram significativamente os inibidores dos grãos de aveia, sugerindo que estes são mais resistentes às variações do ambiente quanto à resistência a contaminação microbiana, provavelmente em função de sua composição química.

O trigo com 20% de umidade apresentou 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 concentração de inibidor. Outra hipótese seria a infecção natural por patógenos e a indução na produção de inibidor de trigo.

## Conclusão

As diferentes umidades influenciaram na ação de inibidores enzimáticos do arroz e trigo sobre a amilase fúngica, sendo que na aveia não houve diferença significativa.

A inibição foi diminuída em torno de 2 vezes entre o tempo zero e 8 dias na amostra de arroz.

### **Referências**

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.

MARSARO-JÚNIOR, A.L.; et al. 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.