

Avaliação do efeito de dois ésteres metílicos de ácidos graxos no perfil bioquímico e na atividade da Na, K ATPase de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

SILVA, L. N. D.¹; LIMA, L.A.R.S.³; ALVES, S.N.²; CORTES, V.F.¹; SANTOS, H.L.¹; BARBOSA, L.A.¹

RESUMO

Larvas de *C. quinquefasciatus* expostas a diferentes inseticidas, mostraram alterações bioquímicas significativas e um parâmetro útil para medir a atividade larvicida. O objetivo deste trabalho é investigar o efeito de dois ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) no conteúdo de glicose, lipídios, proteína e atividade Na, K-ATPase das larvas. As larvas foram expostas a DL50 dos FAMES por 1h. Glicose e triglicerídeos totais foram dosados por kits diagnósticos comerciais e concentração de proteína pelo método de Hartree. A atividade ATPásica foi medida pelo método de Fiske. Os resultados mostram que o tratamento com ambas as drogas causou uma ativação da Na,K-ATPase nas larvas e apenas o FAME 3 causou aumento da atividade na enzima purificada. Observaram-se diferenças significativas somente no conteúdo de proteínas totais das larvas. O aumento da atividade da Na,K-ATPase pode aumentar a necessidade de geração de ATP nas larvas, o que pode afetar o desenvolvimento larval.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*, inseticidas, P-ATPases, metabolismo.

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, produzidos no metabolismo secundário das plantas, têm se apresentado como fontes de materiais com atividade inseticida, larvicida e repelente^{1,2}. O caráter lipofílico de alguns inseticidas associado à espessura e composição lipídica da cutícula dos insetos

é responsável pela maior penetração do produto na cutícula e sua translocação até o alvo de ação^{3,4,5}.

É possível que extratos de plantas afetem tecidos como o corpo gorduroso⁶, que é o principal órgão de metabolismo intermediário em insetos funcionando como órgão armazenador de proteínas, lipídios e carboidratos, além de sintetizar proteínas da hemolinfa. A alteração da reserva energética na fase larval pode gerar prejuízo energético na fase adulta⁷.

As larvas de *Culex quinquefasciatus* vivem em um ambiente de salinidade variável e a sobrevivência dessas larvas depende da regulação da osmolaridade da hemolinfa⁸, papel que tem sido relacionado às ATPases, por realizarem o transporte de íons através da membrana. As ATPases tem sido alvo de inseticidas^{9,10}, e a caracterização dessas enzimas tem se tornado importante para otimizar o controle de insetos.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de dois ésteres metílicos de ácidos graxos, FAME 2 e FAME 3, sobre a atividade da Na,K-ATPase de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Além de avaliar o efeito dos dois FAMES sobre os níveis de glicose, proteínas, triacilglicerídeos e colesterol.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de *Culex quinquefasciatus* em quarto estágio foram separadas em três grupos com 40 larvas em cada. Um grupo foi exposto ao FAME 2 e outro ao FAME 3 por uma hora. Após a exposição das larvas aos bioinseticidas FAME 2 e FAME 3, essas foram maceradas em um homogeneizador tipo potter por 20 vezes em solução tampão contendo: Tris 6mM pH 6,8, imidazol 20 mM, sacarose 250 mM, EDTA 3 mM, SDS 0,01%, PMSF 2mM, ortovanadato 1mM. Posteriormente as amostras foram sonicadas, em gelo, em 4 pulsos de 15 s a 45% de potência com intervalo de 10s entre cada pulso. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 9000 rpm por uma hora a 4°C em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pelet ressuspenso em 1mL da solução.

¹ Universidade Federal de São João Del Rei – Laboratório de Bioquímica Celular – Campus Centro Oeste Dona Lindu- Divinópolis, Minas Gerais- Brasil. E-mail: liliandavids@hotmail.com.

^{1,2} Universidade Federal de São João Del Rei-Campus Centro-Oeste Dona Lindu, 2Laboratório de Parasitologia; 3Laboratório de Produtos Naturais;Divinópolis, MG, Brasil

A dosagem de proteína das amostras obtidas foi realizada pelo método de Hartree¹¹.

A atividade ATPásica foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP pela Na, K-ATPase, usando o método colorimétrico de Fiske¹². Na dosagem da Na,K-ATPase purificada, a enzima foi incubada com diferentes concentrações dos FAMES por 20 minutos.

Para as dosagens de glicose, triglicérides, proteína e colesterol total foi feito um homogenato total das larvas. As larvas de *Culex quinquefasciatus* dos três grupos foram maceradas em um homogenizador de tecidos tipo Potter, em tampão Tris 20mM pH 7,4 em gelo. O homogenato total foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para as dosagens de proteína, glicose, triglicérides e colesterol. As dosagens de glicose e triacilglicerol foram realizadas por meio de kits diagnósticos comerciais Doles.

Foi utilizada uma alíquota da amostra das frações de membrana de eritrócitos e do homogenato total das larvas obtido anteriormente, para a extração dos lipídeos que foi realizada pelo método de Higgins¹³. A fração de membrana dos eritrócitos foi incubada com diferentes concentrações dos FAMES por 20 minutos antes de iniciar o procedimento da extração. A análise e determinação do colesterol também foi realizada baseada método descrito por Higgins¹³.

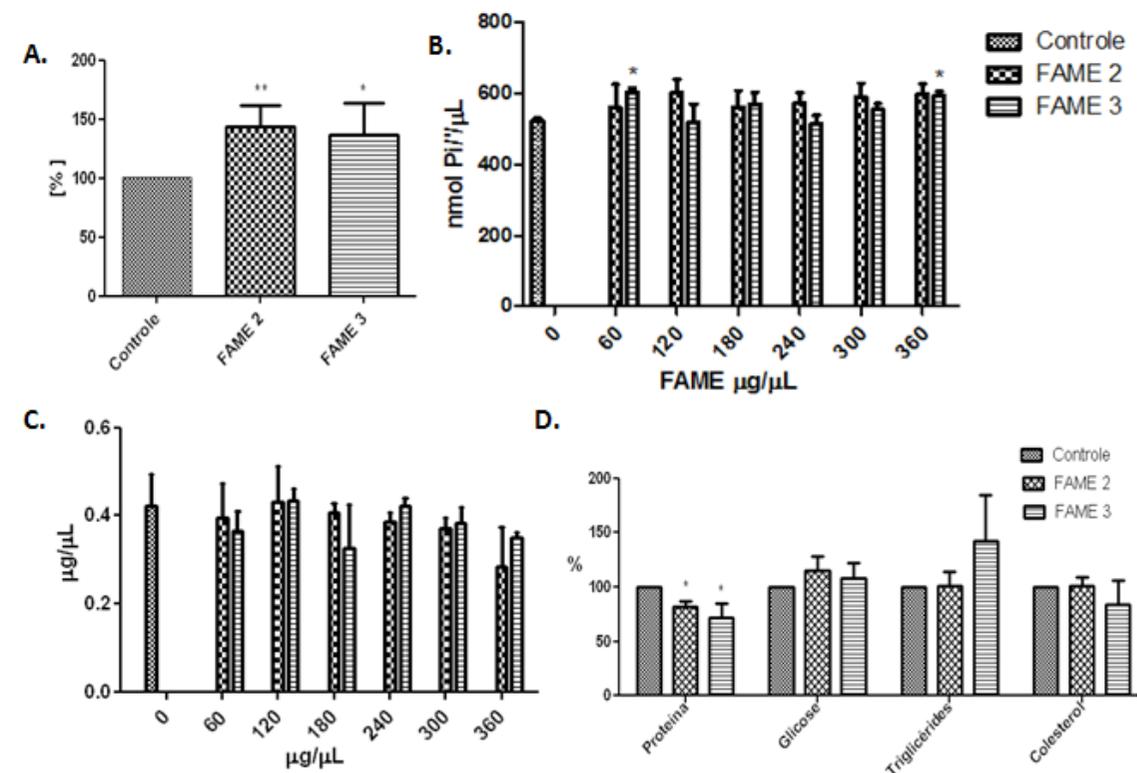
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um aumento significativo na atividade da Na,K-ATPase quando as larvas foram tratadas tanto com FAME 2 quanto com FAME 3. Quando a Na,K-ATPase purificada foi incubada com os dois compostos somente o FAME 3, nas concentrações de 60 µg/µL e 360 µg/µL, foram capazes de aumentar a atividade da enzima. Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de colesterol, glicose e triacilglicerídeos das larvas. Porém houve uma diminuição no conteúdo

de proteínas totais das larvas tratadas com ambos os compostos. Não foi possível observar diferença significativa no conteúdo de colesterol de membrana de eritrócitos após terem sido incubados com os FAMES.

Nossos dados sugerem que o tratamento com o FAME pode interagir diretamente com a Na,K-ATPase. Mesmo que o conteúdo de colesterol da membrana não tenha se alterado, é possível que a modulação dos FAMES na atividade da Na,K-ATPase aconteça através de uma perturbação do microambiente da membrana plasmática, que ao ser modificado pela interação com os FAMES muda a disposição tridimensional da Na,K-ATPase e com isso altere a sua atividade. Experimentos para quantificação e dosagem dos fosfolipídeos de membrana são necessários para explorar melhor essa possibilidade.

Figura 1: Dosagem da atividade Na, K ATPásica de larvas de *Culex quinquefasciatus* (A); Dosagem de atividade de Na,K-ATPase purificada de rim de porco (B); Dosagem de colesterol de membrana de eritrócitos (C) Dosagem de proteínas, glicose, triglicérides e colesterol total(D).



CONCLUSÕES

Os FAMES demonstraram serem compostos moduladores da atividade da Na,K-ATPase. Além disso, apenas o perfil protéico foi alterado pelo tratamento de 1h nas larvas. O aumento da atividade da Na,K-ATPase pode aumentar a necessidade de geração de ATP nas larvas, o que pode afetar o desenvolvimento larval.

REFERÊNCIAS

- (1) COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGELICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 304-309, 2005.
- (2) MURUGAN, K., MURUGAN, P., NOORTHEEN, A. Larvicidal and Repellent Potential of *Alhizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Biores technol.** 98:198-201, 2007.
- (3) HOLLINGWORTH, R.M. The biochemical and physiological basis of selective toxicity. In: WILKINSON, C.F. (Ed.). **Insecticide biochemistry and physiology**. New York : Plenum, 1976. p.431-506.
- (4) HOY, M.A. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, E. (Eds.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York : Chapman and Hall, p.203-236, 1990.
- (5) GUEDES, R.N.C.; LIMA, J.O.G.; ZANUNCIO, J.C. Seletividade dos inseticidas deltametrina, fenvalerato e fenitroton para *Podisus connexivus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Porto Alegre, v.21, n.3, p.339-346, 1992.
- (6) CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes**. London: Chapman & Hall, v.1.1996.]
- (7) CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 770p, 1998.
- (8) CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction**. Vol.I . London: Chapman & Hall. 2000
- (9) GHASUDDIN, S.M. & F. MATSUMURA. DDT inhibition of Ca⁺⁺-Mg-ATPase from peripheral nerves and muscles of lobster, *Homarus americanus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 103: 31-37, 1981.
- (10) PING, G., L. YANPING & L. SHIGUI. Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. **Pestic. Biochem. Physiol.** 80: 157-162, 2004.
- (11) HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. 1972
- (12) FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. J. *Biol. Chem.* 66, 375-400,1925.
- (13) HIGGINS, G. *Biological Membranes*. Pratical approach series (Findlay J.B.C. and Evans W.H. Editors) IRL Pres Oxford - Washington D.C. 104-1037, 1987.