

ESTUDO SOBRE AS PROTEINASES E AMILASES DE LARVAS DE
Zabrotes subfasciatus (Boh.)(COLEOPTERA:BRUCHIDAE)

FRANCISCO JOSÉ ALVES LEMOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM BIOQUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1988

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Francisco José Alves Lemos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

26/05/88

José Xavier Filho

Eneás Gomes Filho

José Tadeu Abreu de Oliveira

À: minha esposa, Valéria,
à memória de meu pai, Assis,
à minha mãe, Otilia
e a meus irmãos Assis, Fátima,
Socorro e Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador desta tese, professor Francisco de Assis de Paiva Campos, pela dedicação, objetividade e interesse no meu aperfeiçoamento.

Ao professor José Xavier Filho, pelos ensinamentos e convivência estimulante, dando-me o apoio indispensável para a realização deste trabalho.

Aos professores Enéas Gomes Filho e José Tadeu Abréu de Oliveira, pelas valiosas sugestões e discussões apresentadas durante a elaboração desta dissertação.

À professora Iracema Lima Ainouz, pelo apoio e incentivo nos meus momentos de perplexidade.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo, cooperação e amizade.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor e de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/PADCT), pelo convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará através do projeto "Bases Bioquímicas da Resistência de Sementes a Insetos".

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi executada.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xi
<u>RESUMO</u>	xiii
<u>ABSTRACT</u>	xiv
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	17
3 - <u>MÉTODOS</u>	18
3.1 - <u>Criação dos Insetos</u>	18
3.2 - <u>Preparação dos Homogenatos Intestinais de Zabrotes subfasciatus</u>	18
3.3 - <u>Determinação de Proteína</u>	19
3.4 - <u>Preparação das Soluções Utilizadas como Substrato</u>	19
3.4.1 - <u>Azo-caseína 1,5%</u>	19
3.4.2 - <u>Hemoglobina 1,0%</u>	19
3.5 - <u>Determinação de Atividade Enzimática de Z. subfasciatus</u>	20
3.5.1 - <u>Atividade Azo-caseinolítica</u>	20
3.5.2 - <u>Atividade Hemoglobínásica</u>	20
3.5.3 - <u>Atividade Amilásica</u>	21
3.6 - <u>Purificação Parcial das Proteinases e Amilases</u> .	21
3.7 - <u>Efeito de Alguns Ativadores e Inibidores de Proteinases Sobre as Atividades Proteolíticas</u>	22
3.8 - <u>Efeito dos Inibidores e Ativadores Sobre as Frações Amilásicas Parcialmente Purificadas</u>	23
3.9 - <u>Estabilidade Térmica da Atividade Amilásica</u>	23
3.10 - <u>Desenvolvimento de Zabrotes subfasciatus em Algumas Cultivares de Vigna unguiculata</u>	24
4 - <u>RESULTADOS</u>	25
4.1 - <u>Purificação Parcial das Proteinases e Alfa-Amilases de Zabrotes subfasciatus</u>	25

4.2 - <u>Determinação das Condições Ótimas de Ensaio da Atividade Proteolítica</u>	31
4.3 - <u>Efeito de Alguns Ativadores e Inibidores Sobre as Proteinases de Z. subfasciatus</u>	36
4.4 - <u>Determinação das Condições Ótimas de Ensaio da Atividade Amilásica</u>	38
4.5 - <u>Estudo de Ativação e Inibição das Amilases</u>	42
4.6 - <u>Efeito dos Inibidores Naturais de Alfa-Amilase Sobre as Frações AI E AII</u>	44
4.7 - <u>Efeito do NaCl e CaCl₂ na Estabilidade Térmica da Fração AII</u>	44
4.8 - <u>Desenvolvimento de Zabrotes subfasciatus em Algumas Variedades de Vigna unguiculata</u>	47
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	49
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	53
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		<u>Página</u>
1	Atividade azo-caseinolítica total durante o desenvolvimento de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	26
2	Cromatografia em coluna de Sephadex G-75 do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	27
3	Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose da fração proteolítica obtida em Sephadex G-75 ...	28
4	Efeito da temperatura sobre a atividade azo-caseinolítica total do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	32
5	Efeito do pH sobre a atividade azo-caseinolítica total do homogenato intestinal e frações PI e PII obtidas por cromatografia de troca iônica	33
6	Efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica total do homogenato intestinal e fração PII obtida por cromatografia de troca iônica	34
7	Efeito da concentração de azo-caseína sobre a atividade do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	35
8	Efeito da concentração de E-64 sobre a atividade de azo-caseinolítica total do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u> e <u>Callosobruchus maculatus</u>	39
9	Efeito da temperatura sobre a atividade amilolítica total das frações AI e AII obtidas por cromatografia do homogenato intestinal em Sephadex G-75	40

FIGURA

Página

- | | | |
|----|---|----|
| 10 | Efeito do pH sobre a atividade amilolítica total das frações AI e AII obtidas por cromatografia do homogenato intestinal em Sephadex G-75 | 41 |
| 11 | Efeito do NaCl e CaCl ₂ sobre a estabilidade térmica da fração AII. | 46 |

LISTA DE TABELAS

TABELA		<u>Página</u>
1	Purificação das atividades proteolíticas do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u> por cromatografia em coluna de Sephadex G-75 seguida de fracionamento em coluna de DEAE-Sepharose	29
2	Purificação das atividades amilolíticas do homogenato intestinal de <u>Zabrotes subfasciatus</u> por cromatografia em coluna de Sephadex G-75 .	30
3	Efeito de alguns inibidores e ativadores de proteinases sobre as frações proteolíticas de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	37
4	Efeito de alguns ativadores e inibidores de amilases sobre as frações AI e AII de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	43
5	Efeito dos inibidores naturais de alfa-amilase sobre as frações amilolíticas de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	45
6	Performance do bruquídeo <u>Zabrotes subfasciatus</u> em algumas variedades de <u>Vigna unguiculata</u> ...	48

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

- A_{280} - Absorbância a um comprimento de onda de 280 nanometros
- A_{440} - Absorbância a um comprimento de onda de 440 nanometros
- AIA - Ácido iodoacético
- AI - fração amilásica obtida de Sephadex G-75 (PM 55000)
- AII - fração amilásica obtida de Sephadex G-75 (PM 28000)
- BAEE - alfa-N-benzoil-L-arginina etil ester
- BAPA - alfa-N-benzoil-DL-arginina-para-nitroanilida
- BANA - Benzoil-DL-arginina naftilamina
- BApNA - alfa-N-benzoil-DL-arginina-para-nitroanilida
- BTEE - alfa-N-benzoil-L-tirosina etil ester
- BTPNA - N-benzoil-L-tirosina nitroanilida
- ATEE - N-acetil-L-tirosina etil ester
- DEAE - Dietil aminoetil
- DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- DFP - diisopropil fluorofosfato
- DTP - 2,2'-ditiopiridina
- DTT - Ditionotreitól
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- E-64 - L-trans-epoxisuccinil-leucil-amida (4-guanidino) butano
- GPNA - L-glutaril-L-fenilalanina-naftilamina
- GPpNA - L-glutaril-L-fenilalanina-para-nitroanilida
- HPLC - Cromatografia líquida de alta performance
- Me₂SO - Dimetil sulfóxido
- NEM - N-etilmaleimida
- OVTI - Inibidor de tripsina de ovomucóide
- pCMB - Ácido para-cloromercuriobenzóico
- pHMB - Ácido para-hidroximercuriobenzóico
- PMSF - Fenilmetilsulfonyl fluoreto
- PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PI - Fração proteolítica obtida após Sephadex G-75 e DEAE-Sepharose

- PII - Fração proteolítica obtida após Sephadex G-75 e DEAE-Sepharose
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- SBTI - Inibidor de tripsina de soja de Kunitz
- TCA - Ácido tricloroacético
- TLCK - Tosil-L-lisina clorometil cetona
- TPCK - Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
- TAME - Para-tosil-L-arginina metil ester
- UA - Unidade de atividade

RESUMO

A atividade proteolítica do homogenato intestinal do bruquídeo Zabrotes subfasciatus foi purificada parcialmente por cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica. Como resultado, duas atividades proteolíticas diferentes foram observadas: uma atividade tipo cisteínica (fração PI) e uma outra do tipo aspártica (fração PII). A fração PI foi ativada pelos reagentes tiólicos cisteína e ditioneitol e inibida pelos inibidores de proteinases cisteínicas E-64, N-etilmaleimida, ditiopiridina e ácido iodoacético. Pepstatina A, um inibidor de proteinases aspárticas, não inibiu esta fração. O pH ótimo de 5,5, usando azo-caseína como substrato, é típico de proteinases cisteínicas. A fração PII, diferentemente, foi inibida completamente por pepstatina A e, praticamente, não sofreu inibição pelos inibidores de proteinases cisteínicas e serínicas testados. Esta fração apresentou um pH ótimo de 3,5 usando hemoglobina como substrato. O peso molecular da atividade proteolítica total foi estimado em cerca de 31000 por cromatografia de exclusão molecular.

A atividade amilolítica digestiva de Z. subfasciatus foi separada em duas frações: frações AI e AII que tinham pesos moleculares de aproximadamente 55000 e 28000, respectivamente. A fração AI comportou-se como uma exoamilase típica desde que ela foi indiferente a Ca^{++} e Cl^{-} e foi inibida pelos reagentes bloqueadores de grupos sulfidrílicos ácido iodoacético e N-etilmaleimida. A fração AII foi ativada por Ca^{++} e Cl^{-} e inibida por EDTA. Os inibidores proteicos de alfa-amilases de Phaseolus vulgaris e Triticum vulgaris inibiram fortemente a atividade da fração AII enquanto a fração AI foi somente ligeiramente inibida. A fração AI apresentou um pH ótimo de 4,5 e a fração AII de 5,0.

ABSTRACT

The proteolytic activity of the gut homogenate of de bruchid Zabrotes subfasciatus was partially purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Two different activities were separated: a cysteine type activity (fraction PI) and an aspartic type one (fraction PII). Fraction PI was activated by cysteine and dithiotreitol and was inhibited by E-64, N-ethylmaleimide, dithiopyridine and iodoacetic acid. Pepstatin A had no effect on this fraction. The optimum pH (5,5), using azo-casein as substrate is typical of cysteine proteinases. Fraction PII, was completely inhibited by pepstatin A but was not affected by cysteine and serine proteinases type inhibitors. This fraction had a pH otimum of 3,5, using haemoglobin as substrate. Molecular weight of the total activity was around 31,000 by gel filtration.

The digestive amylase activity of Z. subfasciatus was separated in two fractions: Fraction AI and AII had molecular weights of approximately 55,000 and 28,000 respectively. Fraction AI behaved as a typical exoamylase once it was indifferent to Ca^{++} and Cl^{-} and was inhibited by the sulphidrilic blocking reagents iodoacetic acid and N-ethylmaleimide. Fraction AII was activated by Ca^{++} and Cl^{-} and inhibited by EDTA. Protein inhibitors of amylases from Phaseolus vulgaris and Triticum vulgaris strongly inhibited the activity of fraction AII while fraction AI was only slightly inhibited. Fraction AI had a pH optimum of 4,5 and fraction AII of 5,0,

1 - INTRODUÇÃO

Uma grande parcela da produção anual de sementes é perdida em consequência de estragos causados por insetos. Esta perda se dá no campo e, principalmente, durante estocagem das sementes (BRADER, 1982; FOARD et al., 1983).

Durante o processo de estocagem, procura-se evitar a predação das sementes através de condições sanitárias adequadas e da utilização de pesticidas. Ambas as formas de controle são onerosas e inviáveis para o pequeno produtor (BRADER, 1982). No campo, o uso intensivo de inseticidas, muitas vezes de forma totalmente inadequada, tem levado a consequências desastrosas ao meio-ambiente. Com o declínio das classes de inseticidas disponíveis (os insetos têm desenvolvido resistência a todas as principais classes de inseticidas comercializadas) (BRATTSTEN et al., 1986) e com os crescentes custos monetário e ambiental do uso destas substâncias, torna-se de grande importância o desenvolvimento de técnicas de controle de insetos predadores que sejam econômicas, eficientes e não poluidoras.

Nas duas últimas décadas, tem havido esforços no sentido de se entender quais mecanismos as plantas lançam mão para evitar herbivoria excessiva (JANZEN, 1979). Estes estudos têm mostrado que as plantas sintetizam e acumulam metabólitos secundários (p. ex.: inibidores de proteinases e alfa-amilases, lectinas, alcalóides, flavonóides, aminoácidos não-protéicos, etc.) cujos papéis fisiológicos são desconhecidos mas que, devido à sua diversidade, multiplicidade e padrões únicos de ocorrência, provavelmente constituem uma importante estratégia defensiva das plantas, limitando o número de insetos que as podem infestar (KOGAN, 1986; MOONEY et al., 1983). O entendimento destes mecanismos de defesa poderá levar a formas efetivas e econômicas de controle de pragas, através da seleção e melhoria de variedades vegetais com

altos teores de um ou vários metabólitos tóxicos ao predador alvo (SHILDES, 1987). Uma segunda alternativa seria a modificação do genoma vegetal pela introdução de genes que codifiquem para proteínas tóxicas a determinados insetos (HORSCH et al., 1985; WEBB, 1986; VAECK et al., 1987; THORNBURG et al., 1987). Entre estas proteínas estão os inibidores de proteínases e amilases, cujas presenças em altas concentrações na dieta de um inseto poderá determinar conseqüências deletérias para seu crescimento e desenvolvimento (FOARD et al., 1983; VAECK et al., 1987). Como em essência esta estratégia vai ocasionar a inibição de enzimas digestivas do inseto alvo, para sua aplicação é fundamental o conhecimento prévio destas enzimas e das proteínas que efetivamente as inibam.

1.1 - Zabrotes subfasciatus - Importância Agronômica e Biológica

O bruquídeo Z. subfasciatus é originário do Novo Mundo e está amplamente distribuído nas Américas Central e do Sul, África, Índia e norte da Ásia, além de alguns registros de ocorrência na Europa (DAVIES, 1972; MEIK & DOBIE, 1986). Juntamente com Achanthoscelides obtectus é considerado uma praga especialista das espécies Phaseolus vulgaris e Phaseolus lunatus embora, ocasionalmente, possa infestar outras espécies de legumes (MEIK & DOBIE, 1986; PIMBERT, 1985; McFARLANE & WEARING, 1967). Em Uganda, onde ocorreu o seu primeiro estudo, Z. subfasciatus tornou-se uma importante praga de P. vulgaris e Vigna unguiculata muito embora, em outras regiões, existam poucas observações de infestação desta última espécie (DAVIES, 1972; MEIK & DOBIE, 1986). As razões determinantes deste fato ainda não são compreendidas, embora se conjecture que Z. subfasciatus teria uma desvantagem competitiva em relação aos outros insetos que infestam V. unguiculata e que somente em condições ambientais semelhantes às encontradas em Uganda a infestação desta espécie seria favorecida.

Pelo menos, em condições de laboratório (temperatura de 27°C e 70% de umidade relativa) C. maculatus não mostrou nenhuma vantagem competitiva sobre Z. subfasciatus (MEIK & DOBIE, 1986).

É possível também que Z. subfasciatus não tenha ainda ocorrido em muitas regiões onde se cultiva V. unguiculata. No Brasil inexistem dados que indiquem que este inseto seja um predador importante de V. unguiculata. Ele adapta-se melhor a baixas altitudes e climas quentes e, por sua pouca capacidade de dispersão, ataca somente sementes armazenadas (CARVALHO & ROSSETO, 1968).

Z. subfasciatus é um inseto pequeno, medindo de 1,8 a 2,5mm de comprimento, que tem uma cor variando de marrom escura a preta e possui um acentuado dimorfismo sexual (GALLO et al., 1970). A fêmea é maior do que o macho e tem duas manchas brancas nos élitros. O macho, por sua vez, tem uma cor marrom pubescente uniforme. O período médio de vida para os adultos é de 11 dias para as fêmeas e de 13,8 dias para os machos em condições de 28-32°C e 70-75% de umidade relativa. Entretanto, a longevidade entre fêmeas diminui à medida que elas ovipositam mais, sendo de 22,2 o número médio de ovos postos (CARVALHO & ROSSETO, 1968). A fêmea deposita seus ovos na superfície das sementes e as larvas recém-emergidas penetram na semente onde completam seu desenvolvimento (24,5 dias nas condições ideais de 32,5°C e 70% de umidade relativa) (HOWE & CURRIE, 1964). À medida que se desenvolvem as larvas mudam quatro vezes (4 instares) antes da pupação. Durante o quarto instar as larvas formam as janelas pupais ao se alimentarem da superfície inferior da testa. As janelas pupais facilitam a emergência dos adultos que têm suas peças bucais voltadas para elas (HOWE & CURRIE, 1964).

O canal alimentar de larvas de Z. subfasciatus enrola-se quatro vezes sobre si mesmo e divide-se em três regiões perfeitamente distintas: intestino anterior, médio e posterior (VATS, 1973). O intestino anterior é um pequeno e estreito tubo que mede entre 0,45 e 0,50mm de comprimento, consistindo de faringe e esôfago. O intestino médio, medindo de 3 a 5mm, ocupa a maior parte da cavidade do corpo, dividin-

do-se em intestino médio anterior que é dilatado em forma de saco (estômago) e intestino médio posterior que é mais estreito e tubular. A parede do intestino médio anterior consiste principalmente de células secretoras, enquanto o intestino médio posterior possui um reduzido número de células que teriam uma função de absorção. O intestino posterior tem de 1,2 a 1,5mm de comprimento, é tubular e enrolado sobre si mesmo consistindo de íleo e cólon.

O único registro de nosso conhecimento na literatura sobre algum aspecto da bioquímica deste inseto refere-se à presença de transaminases durante seu desenvolvimento e envelhecimento (KAUR et al., 1985). Segundo estes autores, os aumentos das atividades das enzimas glutamato-piruvato transaminase (GPT) e glutamato-oxalacetato transaminase (GOT) estão relacionados com o aumento do conteúdo protéico durante os estágios larval e de adulto. Por outro lado, a reduzida atividade destas duas transaminases parece estar correlacionada com os processos degradativos que levam ao envelhecimento e morte, concluindo-se daí que estas enzimas estão relacionadas com os processos anabólicos.

1.2 - Proteinases de Insetos

Ao pensarmos que existem milhares de espécies diferentes de insetos, vivendo nos mais diversificados ambientes e alimentando-se das mais diferentes dietas, é fácil compreendermos que não existe um padrão único de fisiologia e bioquímica da digestão entre os insetos. Desta forma, os tipos e propriedades das enzimas responsáveis pela digestão de amido, proteína e lipídio em insetos são muito pouco conhecidos, com exceção de algumas estudadas em espécies de importância médica e agrônômica (APPLEBAUM, 1985).

// Até recentemente a idéia generalizada era de que, à exceção de algumas poucas espécies, os insetos utilizavam-se unicamente de proteinases serínicas para digerirem as proteí

nas presentes em suas dietas. Nos últimos anos, registros freqüentes da ocorrência de proteinases cisteínicas e aspárticas no trato digestivo de insetos têm ocorrido e mesmo a presença de metaloproteinases já foi detectada (APPLEBAUM, 1985).

Esta multiplicidade de proteinases pode ser vista no caso dos insetos hematófagos das ordens Hemiptera e Diptera. Os insetos hematófagos hemípteros, aparentemente, fazem uso de proteinases cisteínicas e aspárticas ao contrário dos dípteros hematófagos que utilizam proteinases serínicas na digestão das proteínas do sangue (APPLEBAUM, 1985). Dentre os hemípteros, Rhodnius prolixus foi estudado por HOUSEMAN & DOWNE (1980) que demonstraram a presença de uma proteinase tipo catepsina B no homogenato intestinal. Esta enzima hidrolisava os substratos sintéticos BApNA e BANA e era inibida por AIA e TLCK, mas não pelo inibidor de tripsina de soja enquanto que os reagentes tiólicos cisteína e glutatona a ativavam. A catepsina B encontrada em Triatoma phyllosoma pallidipennis (HOUSEMAN & DOWNE, 1981) mostrou-se semelhante à de R. prolixus, apresentando um pH ótimo de 5,5. R. prolixus e T. phyllosoma pallidipennis possuem também uma atividade mais ácida (HOUSEMAN & DOWNE, 1981; HOUSEMAN & DOWNE, 1982b) que no caso de R. prolixus foi separada por DEAE-Celulose e hidrolisava hemoglobina a um pH ótimo de 2,8. Os inibidores de proteinases aspárticas pepstatina e diazoacetilnorleucina inibiram esta atividade assim como os reagentes alquilantes TLCK e AIA. A proteinase ácida de Triatoma phyllosoma pallidipennis hidrolisava hemoglobina a um pH ótimo de 3,8. Cimex hemipterus e C. lecturalis também contêm catepsina B e uma proteinase ácida que hidrolisava hemoglobina a um pH ótimo de 3,4 (HOUSEMAN & DOWNE, 1982a). Estas duas proteinases possuem características semelhantes à dos dois hemípteros referidos anteriormente.

CHESEMAN & GOODING (1985) estudaram as proteinases dos dípteros hematófagos Glossina morsitans, G. morsitans palpalis, G. morsitans submorsitans, G. palpalis palpalis, G. palpalis gambiensis em fase adulta e de G. morsitans

morsitans em fase larval. Estas proteinases foram separadas por técnicas de troca iônica e exclusão molecular e caracterizadas utilizando-se caseína e substratos sintéticos. Todas apresentavam atividade tipo tripsina e quimiotripsina. A tripsina de G. morsitans morsitans foi inativada por TLCK, RMSF e 2-mercaptoetanol (GOODING, 1974). BOROVSKI (1985) buscou a presença de atividade tríptica e quimiotríptica no intestino médio de Stomoxys calcitrans ao usar BTEE e TAME e os inibidores TPCK e TLCK. Ele detectou unicamente a presença de tripsina, sendo esta enzima inibida por TLCK e pelo inibidor de tripsina isolado do tórax do próprio inseto. HOUSEMAN et al. (1987), ao utilizarem intestino médio posterior no estudo das proteinases de S. calcitrans, detectaram atividade tríptica e quimiotríptica: tripsina hidrolisava BANA e TAME e seu pH ótimo era 8,0, enquanto quimiotripsina hidrolisava BTEE a pH 8,0. Por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100) foram determinados os pesos moleculares da tripsina (19500) e de duas quimiotripsinas (27500 e 64000). KUNZ (1978) observou uma multiplicidade de proteinases do tipo serínica em fêmeas adultas do mosquito Aedes aegypti tendo sido detectadas oito diferentes endopeptidases após SDS-PAGE e coramento negativo do gel contendo gelatina. A atividade proteolítica do extrato bruto foi observada ser primordialmente do tipo tripsina, desde que TAME (substrato específico para tripsina) foi hidrolisado dez vezes mais rapidamente do que o substrato quimiotríptico BTEE, enquanto que DFP inibiu completamente a hidrólise de TAME e "azocoll". Por filtração em gel, os pesos moleculares das tripsinas foram estimados como variando de 20000 a 23000. A atividade tríptica extraída do intestino de fêmeas adultas de Aedes aegypti foi também estudada por GRAF & BRIEGEL (1985). Eles a isolaram por cromatografia de troca iônica e de afinidade e demonstraram a presença de 5 principais isoenzimas pelo uso de ³H-DFP como marcador em géis de poliacrilamida após eletroforese, tendo observado que estas enzimas possuíam pesos moleculares variando de 26700 a 32000. Por outro lado, a focalização isoelétrica revelou cerca de 20 isoenzimas trípti

cas com pIs variando entre 4,0 e 5,4.

Queratinas são proteínas relativamente insolúveis e resistentes a proteólise por possuírem um grande número de pontes de dissulfeto. Um pequeno número de insetos se especializou em dietas que têm a queratina como proteína predominante (penas, pelos, etc.). Na tentativa de compreender o processo de digestão da queratina, as proteínas digestivas de Tineola bisseliella e Attagenus megatoma foram estudadas. WARD (1975) observou no intestino médio de larvas de T. bisseliella atividades contra os substratos trípticos BANA e BAPA e contra BTEE, um substrato quimiotríptico. Ambas as atividades foram inibidas por DFP, sendo detectadas múltiplas formas de tripsina e uma única enzima tipo quimiotripsina pareceu estar presente. De interesse foi a presença de uma atividade metaloproteinásica sensível a EDTA e insensível a DFP e que possuía um pH ótimo alcalino. BAKER (1976, 1981) observou a presença de múltiplas formas de tripsina e quimiotripsina no intestino médio de larvas de A. megatoma. As tripsinas hidrolisavam TAME, BAEE e BApNA e eram inibidas por PMSF, TLCK, SBTI e OVTI, apresentando pesos moleculares entre 20000 e 25000. Sua composição de aminoácidos era semelhante às de tripsina de mamíferos. As quimiotripsinas hidrolisavam BTEE, ATEE, BTpNA, GPpNA e foram completamente inibidas por PMSF e TPCK. Estes insetos que digerem queratina mantêm condições fortemente redutoras em seus intestinos médios e, assim, são capazes de reduzir as ligações S-S destas proteínas, permitindo sua subsequente hidrólise pelas proteinases intestinais (BAKER, 1976, 1981).

Insetos que se alimentam de detritos encontrados em meios aquáticos ou pantanosos, locais onde vivem, possuem grande variedade de atividade proteolítica a fim de que possam aproveitar suas escassas disponibilidades de proteína (MARTIN et al., 1981, 1985). Estes pesquisadores observaram atividades proteolíticas bastante elevadas nos intestinos médios de Pycnopsychi guttifer, Phryganea sp, Agripnia vestita e Prosimolium fuscum devidas a altos níveis de proteinases alcalinas. SHARMA et al. (1984) demonstraram que a

alta atividade proteolítica em Tipula abdominalis era decorrente da presença de uma multiplicidade de proteinases principalmente do tipo serínica que foram detectadas pelo emprego dos substratos TAME, BTEE e GPNA. A atividade proteolítica total foi sensivelmente inibida por PMSF e tinha um pH ótimo acima de 11.

Dentre os insetos da ordem Lepdoptera, Bombyx mori foi estudado por SASAKI & SUSUKI (1982) e SASAKI et al (1985). Eles isolaram duas endoproteinases do homogenato intestinal deste inseto: uma delas com uma atividade tipo tripsina, separável em três isoenzimas, com pesos moleculares de 22000 e inibidas por DFP, TLCK, leupeptina, antipaína, HgCl₂ e pelo inibidor Bowman-Birk de soja e tendo pH ótimo em torno de 10 com BAPNA como substrato; a outra endoproteinase encontrada foi mostrada ser do tipo quimiotríptica uma vez que necessitava para sua atividade de dois aminoácidos hidrofóbicos nas posições P1 e P4 do substrato. Em razão deste fato, esta enzima não hidrolisava os substratos quimiotrípticos BTpNA e GPpNA, sendo sua atividade inibida por DFP, quimostatina e inibidor Bowman-Birk de soja, não sendo afetada por TLCK, TPCK, leupeptina, antipaína e reagentes sulfidrílicos. Uma endoproteinase tipo tripsina foi isolada por MILLER et al. (1974) de intestino médio de larvas de Maduca sexta. Esta tripsina apresentou carácter aniônico e peso molecular de 24000, sendo inibida por TLCK, ovomucóide, DFP, PMSF e TLCK. Proteinases serínicas foram encontradas também em homogenato intestinal de Trichoplusia ni por PRITCHETT et al., (1981) apresentando pH ótimo de 9,8 com caseína como substrato.

Os coleópteros representam a maior ordem entre os insetos e muitos dos trabalhos sobre as proteinases destes animais têm sido feitos com espécies de interesse agrônômico. Adultos de quatro espécies do gênero Carabus (C. auronitus, C. punctatoauratus, C. lineatus e C. splenders) foram estudados por VAJE et al. (1984), sendo detectadas atividades tipo tripsina e quimiotripsina. Ambas são afetadas pelo inibidor de tripsina de soja, inibidor de tripsina de "lima bean", inibidor de calicreína de pâncreas e ovomucóide de galinha.

Experimentos de focalização isoeletrica indicaram um grande número de proteinases serínicas apresentando uma grande variabilidade entre as espécies de Carabus. Da mesma forma, Pterostichus melanarius, estudado por GOODING & HUANG (1969) mostrou possuir atividades tríptica e quimiotríptica, tendo a tripsina apresentado peso molecular de 16600 e quimiotripsina de 20800. Foi também observado que a atividade total, usando hemoglobina desnaturada como substrato, tinha pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 47°C. Tripsina e quimiotripsina foram inibidas por PMSF e TPCK somente inibia tripsina. BAKER et al. (1984) detectaram em intestinos de larvas de Cylas formicarius elegantulus a presença de uma atividade tipo tripsina ao usar BApNA como substrato, sendo que nenhuma atividade tipo quimiotripsina foi observada ao utilizar-se BTPNA como substrato.

Insetos da família Bruchidae, ordem Coleoptera, são geralmente predadores de grãos estocados. Até o momento as espécies Callosobruchus maculatus e Acanthoscelides obtectus são as únicas cujas proteinases foram estudadas em algum detalhe. XAVIER-FILHO & COELHO (1980) mostraram que C. maculatus possuía uma forte atividade proteolítica em pH ácido ao usar hemoglobina e azocaseína como substratos. GATEHOUSE et al. (1985) utilizaram vicilina (uma proteína de reserva de sementes de Vigna unguiculata), mioglobina e azoalbumina como substratos para a detecção de atividade proteolítica em larvas de C. maculatus quando observaram um pH ótimo entre 5,4 e 5,6 para a hidrólise de vicilina e de 5,4 para a hidrólise de mioglobina e azoalbumina. Estas atividades foram afetadas pelos inibidores de proteinases cisteínicas leupeptina, pCMB e pHMB, enquanto que PMSF e TPCK não a inibiram. O aumento desta atividade por DTT reforçou a idéia de que as proteinases digestivas de C. maculatus são dependentes de grupos SH. Posteriormente, KITCH & MURDOCK (1986) ampliaram a caracterização desta atividade. Eles observaram que os reagentes tiólicos DTT, cisteína, glutatona e β -mercaptoetanol as ativavam, havendo uma inibição acentuada da hidrólise de ³H-hemoglobina na presença de pCMB, NEM, AIA, E-64 e antipai

na. Além disto, pepstatina A, um inibidor de proteinases aspartáticas, inibiu também esta atividade, mas de forma moderada. CAMPOS et al. (submetido para publicação) obtiveram por cromatografia de troca iônica o fracionamento da atividade azocaseinolítica de larvas de C. maculatus em três componentes, todos com pesos moleculares de aproximadamente 25000, sendo igualmente afetados por inibidores de proteinases cisteínicas (E-64, NEM, AIA, TLCK e TPCK) e ativados por DTT e cisteína. Estes autores observaram também que o inibidor de papaína isolado de sementes de Vigna unguiculata, hospedeira deste inseto, inibiu fortemente estas três atividades, enquanto que inibidores de proteinases serínicas isolados de V. unguiculata e de sementes de outras espécies de plantas não as inibiam. Outro bruquídeo estudado quanto à classe mecanística de suas proteinases foi A. obtectus (WIEMAN, 1986) em que a principal proteinase digestiva de suas larvas foi purificada até a homogeneidade, possuindo, também, características próprias das proteinases cisteínicas. Um trabalho recente com o besouro de batata do Colorado (Leptinotarsa decemlineata) (WOLFSON & MURDOCK, 1987) mostrou que as larvas deste inseto também possuem uma atividade proteinásica do tipo cisteínica.

Muito embora o número de espécies de insetos da ordem Coleoptera estudado com relação às suas proteinases digestivas seja ainda limitado, os dados acima apresentados para C. maculatus, A. obtectus e L. decemlineata parecem sugerir que os insetos fitófagos desta ordem dependem, pelo menos parcialmente, de proteinases cisteínicas para digerirem as proteínas presentes em suas dietas.

1.3 - Amilases de Insetos

Ao contrário das amilases presentes em plantas e em mamíferos, apenas um pequeno número de amilases de insetos tem merecido estudos mais detalhados acerca de suas proprie-

dades físico-químicas.

APPLEBAUM et al. (1961) estudaram a atividade amilásica do intestino médio de larvas de Tenebrio molitor com o objetivo de obterem dados que pudessem ser comparados com aqueles obtidos com as mais bem estudadas alfa e beta amilases de origem vegetal e animal. Fazendo uso de vários reagentes foi observado o seguinte: Ca^{+2} e Cl^{-} ativavam ligeiramente a atividade amilásica de T. molitor, Hg^{+2} , Cu^{+2} e ácido ascórbico a inibiam totalmente, enquanto que cisteína não a afetava e glutatona a inibia ligeiramente. Para obtenção da atividade amilásica máxima um pH de 5,4 e temperatura de 25°C mostraram-se ideais. BUONOCORE et al., (1976) purificaram a alfa-amilase de T. molitor por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-albumina de trigo encontrando um peso molecular de 68000, pI de 4,0 e um baixo teor de aminoácidos sulfurados. Esta alfa-amilase era dependente de Ca^{+2} e ativada por Cl^{-} .

PODOLER & APPLEBAUM (1971a; 1971b) publicaram dois trabalhos bastante criteriosos sobre a amilase de Callosobruchus chinensis. Eles a purificaram até a homogeneidade e demonstraram sua natureza alfa-amilásica através de hidrólise de dextrina limite (obtida pela hidrólise da amilopectina pela beta-amilase) e pelo seu modo de ação sobre vários substratos.

Aprofundando os estudos com amilases de insetos TERRA et al. (1977) estudaram a amilase presente em homogenato intestinal de Rhyncosciara americana e mostraram que esta enzima apresentava atividade máxima entre os pHs 6,8 e 8,0 e uma temperatura de 50°C, sendo dependente de Ca^{+2} e ativada por Cl^{-} mais intensamente do que pelos íons Br^{-} e I^{-} . Os reagentes sulfidrílicos beta-mercuriobenzoato e iodoacetato não a inibiam enquanto Hg^{+2} e Cu^{+2} a inibiam de modo competitivo e não competitivo, respectivamente.

Duas amilases foram examinadas com detalhes em adultos de Drosophila pseudoobscura por YARDLEY & MARTIN (1982). O caráter de alfa-amilase destas enzimas foi demonstrado pela hidrólise de dextrina limite e pela inibição por EDTA e

pelo inibidor de alfa-amilase de trigo. Posteriormente, trabalhando com o mesmo inseto, YARDLEY et al. (1983) observaram que dietas contendo amido produziam uma atividade amilásica significativamente maior que dietas regulares e/ou glicosadas sendo que, nos adultos, esta atividade amilásica foi maior do que nos outros estágios de desenvolvimento.

BAKER (1983) comparando as propriedades enzimáticas de homogenatos intestinais de larvas de Sitophilus granarius e Sitophilus zeamais observou que os pHs ótimos das alfa-amilases eram de 5,0 e 4,75 e seus Kms de 0,07% e 0,13% para S. granarius e S. zeamais, respectivamente. Ambas as enzimas tiveram suas atividades aumentadas na presença de Cl^- e Ca^{+2} e mostraram-se com padrões de ação sobre a amilase semelhantes ao da alfa-amilase pancreática de porco, sendo ainda inibidas fortemente por NaHCO_3 e por extratos brutos de farinha de trigo. Prosseguindo os estudos com Sitophilus BAKER & WOO (1985) purificaram e caracterizaram parcialmente as amilases dos adultos de S. oryzae e S. granarius. S. oryzae possui duas isoenzimas com pIs de 3,70 e 3,76 enquanto S. granarius possui uma única amilase com pI de 3,76. Todas estas três enzimas possuem pesos moleculares de 56000, foram ativadas por Cl^- e estabilizadas por Ca^{+2} . BAKER (1987) purificou duas isoenzimas (RW-1 e RW-2) do adulto de S. oryzae por HPLC tendo observado que elas possuíam pHs ótimos entre 4,5 e 5,0, pesos moleculares de 56000 e composição de aminoácidos similares. Seus padrões de ação sobre a amilose foram típicos de alfa-amilase e se mostraram idênticos. Quanto à hidrólise de amido solúvel, as duas isoenzimas comportaram-se diferentemente: RW-1 com Km de 0,246% e Vm de 837UA/mg de proteína e RW-2 com Km de 0,066% e Vm de 308UA/mg de proteína. Frações de inibidores de alfa-amilase de trigo purificadas por HPLC inibiram diferentemente as isoenzimas RW-1 e RW-2.

WEBER et al (1985) purificaram, por cromatografia de afinidade, duas amilases larvais (I e II) de Phoracantha semipunctata. A amilase I apresentou pH ótimo de 6,0 e a amilase II de 5,3. Foi observado também que a amilase I tinha

padrões de hidrólise semelhantes aos de uma exoamilase (beta-amilase) enquanto que a amilase II tinha padrões de ação e produtos de hidrólise típicos de uma endoamilase (alfa-amilase). Além disto, estas duas amilases foram ativadas por cloreto.

1.4 - Inibidores Naturais de Proteinases e alfa-Amilases em Plantas

Os inibidores naturais de proteinases são ubíquos na natureza onde são encontrados em tecidos animais, vegetais e em microorganismos (RYAN, 1973; RICHARDSON, 1977; XAVIER-FILHO & CAMPOS, no prelo). Estas proteínas estão presentes na maioria das plantas até agora investigadas e embora muito se conheça acerca de suas propriedades químicas e físicas, localização subcelular, etc., seu papel biológico ainda continua sujeito a especulações (RYAN, 1973; XAVIER-FILHO & CAMPOS, no prelo).

O possível papel desses inibidores como proteínas de reserva tem como suporte sua presença em concentrações relativamente altas em órgãos tais como sementes e tubérculos, assim como pelo alto teor de aminoácidos sulfurados que estas proteínas usualmente contêm, o que faz pensar que elas atuariam como tipos especiais de proteínas de reserva (RICHARDSON, 1977; PUZSTAI, 1967). Um possível papel para os inibidores de proteinases no controle de atividade proteolítica endógena em sementes foi também sugerido (BAUMGARTNER & CHRISPPEELS, 1976; SALMIA & MIKOLA, 1980; ABE et al., 1980; BELOZERSKII et al., 1982).

Recentemente tem sido dada muita ênfase para o possível papel dos inibidores de proteinases como agentes de defesa das plantas contra o ataque de insetos. Em alguns casos, tem sido demonstrado que estes inibidores podem afetar sobremaneira o crescimento e desenvolvimento de populações de insetos (GATEHOUSE & BOULTER, 1983; SHUCKLE & MURDOCK,

1983; LIPKE & FRAENKEL, 1954; BROADWAY & DUFFEY, 1986; XAVIER-FILHO & CAMPOS, no prelo). A sugestão de que os inibidores de proteinases seriam componentes importantes do arsenal de defesa das plantas contra o ataque de insetos foi impulsionada pelos trabalhos do grupo de C.A. Ryan nos Estados Unidos. GREEN & RYAN (1972) observaram a rápida indução da síntese de inibidores de tripsina e quimiotripsina em folhas de tomata e batata, seguindo-se injúria causada pelo besouro da batata do Colorado. O evento primário após a injúria parece ser a liberação de um composto (proteinase inhibitor inducing factor" - PIIF) que é originado de heteropolissacarídeos presentes nas paredes celulares das folhas. Este composto é translocado para as folhas situadas muitas vezes a grandes distâncias do local de injúria, e lá ele induz a síntese de inibidores de proteinases e outras proteínas que interfeririam nos processos digestivos dos insetos agressores (RYAN et al., 1986). Esta indução da síntese de inibidores de proteinases em resposta à injúria se constitui também num exemplo clássico de defesa induzida e é, até o momento, o único exemplo em plantas que é razoavelmente entendido tanto com relação ao sinal sistêmico que induz a resposta como também na capacidade deste sinal de regular a expressão de genes em plantas (THORNBURG et al., 1987).

Outro trabalho clássico que põe em evidência o papel dos inibidores de proteinases como agentes de defesa das plantas foi realizado por GATEHOUSE et al. (1979). Estes pesquisadores sugeriram que o alto teor de inibidores de tripsina na cultivar TVu 2027 de Vigna unguiculata era o fator responsável pela resistência deste cultivar ao bruquídeo Callosobruchus maculatus. No entanto, esta sugestão tem sido refutada por estudos feitos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (CAMPOS et al., submetido para publicação; XAVIER-FILHO & CAMPOS, no prelo) que mostraram não haver nenhuma correlação entre os níveis de inibidores de proteinases serínicas e resistência ao bruquídeo C. maculatus entre cultivares de V. unguiculata com diferentes graus de resistência a este inseto. Por exem-

plo, as cultivares suscetíveis CE-11 e CE-524 possuem níveis de inibidores de proteinases serínicas similares aos de TVu 2027 que é uma cultivar resistente. Além disto, as larvas de C. maculatus se utilizam de proteinases cisteínicas para digerirem as proteínas do feijão e estas proteinases não são afetadas pelos inibidores de proteinases serínicas presentes em V. unguiculata (CAMPOS et al., submetido para publicação).

Ao contrário dos estudos sobre os inibidores de proteinases somente nos últimos anos é que considerável progresso tem sido feito no estudo dos inibidores de alfa-amilase presentes em plantas (WARCHALEWSKI, 1983). Estes inibidores são de ocorrência comum em plantas e microorganismos, sendo que muitos dos inibidores de origem vegetal já foram estudados em detalhe, tanto em relação às suas estruturas primárias (CAMPOS & RICHARDSON, 1984; WARCHALEWSKI, 1983) como também em relação às suas propriedades físico-químicas (MARSHAL, 1975; RICHARDSON, 1980; MUNDY et al., 1983; XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1984), sendo que alguns destes inibidores têm a interessante propriedade de também inibir a atividade de proteinases serínicas (CAMPOS & RICHARDSON, 1983; MUNDY et al., 1983), como também compartilham genes ancestrais comuns com proteínas de reserva de sementes e com a taumatina, uma proteína doce (RICHARDSON et al., 1987).

O papel biológico dos inibidores de alfa-amilase em plantas ainda é incerto (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1984; POWERS & CULBERTSON, 1982). Até recentemente, acreditava-se que as amilases presentes em plantas não seriam inibidas por inibidores de alfa-amilase presentes no mesmo tecido ou órgão. Entretanto, inibidores endógenos têm sido descritos recentemente (HALAYKO et al., 1986; WESELAKE et al., 1985). Com poucas exceções, os inibidores de alfa-amilase de plantas têm se mostrado ativos contra alfa-amilases de microorganismos e insetos. Este fato levou à hipótese de que estes inibidores desempenhariam papel de proteção das plantas contra ataque de insetos (BUONOCORE et al., 1977; XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1984). Infelizmente, a maioria dos estudos de inibição das alfa-amilases de insetos está restrita à ação dos inibidores in vitro

(POWERS & CULBERTSON, 1982, 1983; MUNDY et al., 1984; SANCHEZ-MONGE et al., 1986).

Os estudos sobre os efeitos in vivo dos inibidores de alfa-amilase sobre as amilases de insetos são raros. APPLEBAUM et al. (1961) mostraram que a adição de inibidores de alfa-amilase de trigo a dietas sintéticas de Tenebrio molitor afetava adversamente o seu desenvolvimento e aumentava de forma acentuada a mortalidade das larvas. GATEHOUSE et al. (1986) mostraram que, dentre as frações inibitórias de trigo (A, B, C e D), as frações B, C e D eram fortes inibidores das alfa-amilases de Tribolium confusum e Callosobruchus maculatus. As frações B e C, em experimentos in vivo, mostraram-se tóxicas para C. maculatus, enquanto que a fração C teve pouco efeito sobre o desenvolvimento de T. confusum, indicando que este inseto é capaz de detoxificar os inibidores de alfa-amilase presentes em trigo, que é o seu hospedeiro natural.

1.5 - Objetivos

A motivação básica do presente trabalho foi identificar e caracterizar parcialmente as enzimas das larvas de Zabrotes subfasciatus responsáveis pela digestão de proteínas e amido, bem como determinar o efeito in vitro de vários inibidores e ativadores de proteinases e amilases sobre estas enzimas.

2 - MATERIAIS

Os insetos utilizados para formar a cultura de Zabrotes subfasciatus foram fornecidos pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo.

As sementes de Vigna unguiculata L. Walp, cultivar pitiúba, utilizadas na manutenção da cultura de Z. subfasciatus bem como as cultivares CE-11 e CE-315 foram obtidas junto ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. As cultivares de Vigna unguiculata IT81D 1045 e IT81D1064 vieram do Centro Nacional de Pesquisa Arroz-Feijão da EMBRAPA (Goiânia-Goiás).

Os principais materiais utilizados e seus fabricantes são listados a seguir:

- Caseína segundo Hammarsten, Merck S.A., Rio de Janeiro, Brasil.

- Hemoglobina bovina, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

- Amido Solúvel, Eastman Kodak Co., Rochester, New York, EUA.

- Albumina sérica bovina, Sigma chemical Co., St. Louis, EUA.

- Sephadex G-75, Pharmacia, Upsala, Suécia.

- DEAE-Sepharose, Pharmacia, Upsala, Suécia.

Todos os demais reagentes foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Criação dos Insetos

Uma cultura de Zabrotes subfasciatus foi mantida sobre sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp, cultivar Pitiúba, em frascos de vidro transparente e fechados com tampas metálicas perfuradas. Os frascos foram mantidos em uma única prateleira de uma câmara de crescimento (General Electric) a temperatura de 28-30°C e umidade relativa de 55-60%. A cada geração os adultos foram transferidos para sementes novas para a manutenção da cultura.

3.2 - Preparação de Homogenatos Intestinais de Zabrotes subfasciatus

Os homogenatos intestinais de Z. subfasciatus foram preparados de acordo com TERRA et al. (1977) com pequenas modificações. As larvas com idades variando entre 15 e 18 dias após a oviposição foram dispostas em lâminas escavadas contendo solução de NaCl 0,3M (solução isotônica com o meio intestinal) e com o auxílio de um microscópio estereoscópico removia-se a porção do tubo intestinal anterior aos túbulos de Malpighi, transferindo-a para tubos de plástico tipo Eppendorf contendo tampão acetato 0,3M, pH 5,0 ou água destilada. Em seguida, os intestinos foram homogeneizados em Potter durante 10 minutos, em banho de gelo, e a suspensão centrífuga a 10000 xg por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante guardado em frascos de vidro e armazenados em freezer doméstico até posterior utilização.

3.3 - Determinação de Proteína

Todas as determinações de proteína foram feitas em triplicata pelo método de BRADFORD(1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.4 - Preparação das Soluções Utilizadas como Substrato

3.4.1 - Azo-caseína 1,5%

Um grama e meio de azo-caseína, preparada pela técnica descrita por MAIA (1982) foi adicionado a 100ml de tampão acetato 0,3M, pH 5,5, contendo cisteína 1mM ou em tampão acetato 0,3M, pH 4,0 e a suspensão fervida por 15 minutos. Após resfriamento, os pHs das soluções foram reajustados e os volumes completados para 100ml com água destilada. Esta solução foi armazenada em freezer doméstico até sua utilização.

3.4.2 - Hemoglobina 1%

Um grama de hemoglobina bovina foi dissolvido em 50ml de HCl 0,06N. Após adição de 40ml de tampão de concentração 0,2M (glicina, pH 2,0; formiato, pHs 2,5 a 3,5; acetato, pHs 3,5 a 5,5; ou fosfato, pHs 6,0 a 7,0), ajustou-se aos pHs desejados e completou-se o volume para 100ml com cada um dos tampões (COELHO, 1980). As soluções foram mantidas em freezer doméstico até sua posterior utilização.

3.5 - Determinação da Atividade Enzimática de Zabrotes subfasciatus

3.5.1 - Atividade Azo-Caseinolítica

A atividade azo-caseinolítica foi determinada basicamente de acordo com COELHO (1980). Aliquotas de 100-200 μ l de amostra foram adicionados tampão acetato 0,3M, pH 5,5 contendo cisteína ou tampão acetato 0,3M, pH 4,0 suficientes para se completar o volume para 1,0ml. A reação foi iniciada pela adição de 0,5ml da solução de azo-caseína 1,5%. A mistura foi incubada por 30 minutos a 55°C. A reação foi parada pela adição de 0,5ml de TCA 20%. Após 15 minutos de repouso, a suspensão foi centrifugada por 10min a 5000 xg e alíquotas de 1,0ml do sobrenadante foram alcalinizadas com o mesmo volume de NaOH 2N. A atividade proteolítica foi medida pela absorbância a 440nm dos peptídeos diazotizados. Provas em branco foram incluídas para se determinar a quantidade de material solúvel em TCA não devida à ação enzimática. Uma unidade de atividade azo-caseinolítica (UA) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 0,100 a 440nm em um volume de ensaio de 1,5ml por 30min a 55°C.

3.5.2 - Atividade Hemoglobinásica

O método descrito por COELHO (1980) foi utilizado para se determinar a atividade hemoglobinásica. Foram adicionados 5,0ml de hemoglobina 1% a 1,0ml da amostra dissolvida em tampão apropriado. Esta mistura foi deixada em incubação por 1,0 hora, a 40°C. A reação foi parada pela adição de 1,0ml de TCA 40%. Após 30min em repouso, a suspensão foi centrifugada por 10min. Aliquotas de 1,0ml de sobrenadante foram al-

calinizadas com 0,2ml de NaOH 2N. Os produtos de hidrólise foram determinados empregando-se o método de Folin modificado por LOWRY (1951). A absorvância foi lida a 750nm. Uma unidade de atividade hemoglobínica foi definida como sendo a quantidade de enzima que produz uma absorvância de 0,100 a 750nm por 1,0ml da solução de enzima a 40°C, durante 60min.

3.5.3 - Atividade Amilásica

A atividade amilásica total foi medida de acordo com o procedimento de BERNFELD (1955) ligeiramente modificada por BAKER (1983). Juntou-se 20µl de solução enzimática diluída em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 contendo NaCl 20mM e CaCl₂ 0,1mM ou, alternativamente, em tampão acetato 0,1M, pH 4,5 a 250µl de amido 1% preparado no mesmo tampão. Após 10min de incubação a 55°C, a reação foi parada pela adição de 250µl de DNS e os tubos foram aquecidos por 10min em banho de água fervente. Feito isto, as amostras foram diluídas com 2,5ml de água destilada e a absorvância lida a 550nm. Maltose hidratada foi usada como padrão e uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima que produz 1,0mg de maltose em 10min, a 55°C.

3.6 - Purificação Parcial das Proteínases e Amilases

Aproximadamente 6000 intestinos de Z. subfasciatus foram homogeneizados em tampão acetato 0,05M, pH 5,0. Após centrifugação por 20min a 10000 xg e 4°C, o sobrenadante (8,0ml) foi recuperado e o precipitado desprezado. O sobrenadante (7,5ml) foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-75 (105x2,5cm) previamente equilibrada com o tampão acima. Esta coluna havia sido previamente calibrada para determinação de peso molecular com as proteínas albumina bovina (66000), ovoalbumina

(45000), anidrase carbônica (29000), tripsinogênio (24000) e inibidor de tripsina de soja (20100). O fluxo foi ajustado para 30ml/h e frações de 5,0ml foram coletadas. Esta cromatografia foi realizada a temperatura ambiente. Os tubos que apresentavam atividade azo-caseinolítica foram reunidos e aplicados a uma coluna (4,0 x 0,3cm) de DEAE-Sepharose previamente equilibrada em tampão acetato 0,05M, pH 5,0. O fluxo foi ajustado para 50ml/h e frações de 5,0ml foram coletadas. Quando a absorbância a 280nm do eluato atingiu zero as proteínas retidas na coluna foram eluídas pela aplicação de um gradiente (0 a 0,3M) de NaCl em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e, neste caso, frações de 2,5ml foram coletadas a um fluxo de 40ml/h. Esta cromatografia foi também realizada a temperatura ambiente.

A menos quando especificamente indicado, os estudos de caracterização das proteinases foram feitos utilizando-se as frações com atividade proteolítica obtidas na etapa de troca iônica. Os estudos de caracterização das atividades amilásicas foram feitos com as frações ativas obtidas na etapa de cromatografia de exclusão molecular.

3.7 - Efeitos de Alguns Ativadores e Inibidores Sobre as Atividades Proteolíticas

Os efeitos de inibidores e ativadores de proteinases sobre o extrato bruto e frações separadas por troca iônica foram estudados através de incubação inicial de 20min, à temperatura do ensaio (55°C), da solução enzimática com o ativador ou inibidor dissolvido em solvente adequado. Os ensaios azocaseinolíticos foram feitos em triplicatas, sendo realizados como descrito no item 3.5.1: a pH 4,0 para fração PII e pH 5,5 para o extrato bruto e fração PI. Controles contendo substrato+enzima, substrato+inibidor, enzima+substrato+solvente do inibidor ou do ativador e substrato somente foram utilizados.

3.8 - Efeito de Inibidores e Ativadores de alfa-amilase sobre as Frações Parcialmente Purificadas

Os efeitos dos inibidores de alfa-amilase isolados de Triticum vulgare e Phaseolus vulgaris (variedade Rico 23) bem como os efeitos de HgCl_2 , CuSO_4 , AIA, NEM, cisteína, NaCl, CaCl_2 e EDTA sobre as frações AI e AII foram determinados após pré-incubação por 20min a temperatura de 55°C de 20 μl de cada fração com 20 μl da solução contendo cada um dos inibidores ou ativadores. Feito isto, o ensaio foi iniciado pela adição de 500 μl de amido 1% preparado com tampão acetato 0,1M, pH 4,5 (para a fração AI) ou tampão acetato 0,1M, pH 5,0, contendo NaCl 20mM e CaCl_2 0,1mM (para a fração AII). Após 10 minutos a 55°C , a reação foi parada pela adição de 500 μl de DNS. Feito isto, os tubos foram aquecidos por 10min em banho de água fervente e resfriados. Em seguida, adicionou-se 2,5ml de água destilada a cada tubo, sendo a absorbância lida a 550nm.

3.9 - Estabilidade Térmica da Atividade Amilásica em Presença e Ausência de CaCl_2 e NaCl.

A estabilidade térmica da fração AII na presença de NaCl e CaCl_2 foi estudada após diálise por 24h desta fração contra água destilada. Para os ensaios, alíquotas desta fração foram diluídas por um fator de 3 com tampão acetato 0,1M, pH 5,0; tampão acetato 0,1M, pH 5,0, contendo NaCl 20mM; ou tampão acetato 0,1M, pH 5,0, contendo CaCl_2 1mM e deixadas incubando por 30 minutos à temperatura de 4°C e em seguida cada uma das amostras foi incubada a 60°C e, após 1,0 minuto inicial, a intervalos de 5 minutos até 1/2 hora de incubação, alíquotas destas amostras foram ensaiadas para a atividade amilásica por 10 minutos a 37°C .

3.10 - Desenvolvimento de Z. subfasciatus em Algumas Variedades de Vigna unguiculata

O desenvolvimento de Z. subfasciatus nas cultivares de Vigna unguiculata Pitiúba, IT81D 1045, IT81D 1064, CE 315 e CE 11 (Quebra-Cadeira) foi também estudado. Vinte sementes de cada uma das variedades acima foram colocadas nos mesmos tipos de frascos de vidro utilizados para a manutenção da colônia e deixados equilibrar nas condições da câmara de crescimento por 24 horas. Em seguida, 6 fêmeas de uma mesma idade (dois dias) foram colocadas em cada um dos frascos para ovipositarem durante um dia. O excesso de ovos sobre cada uma das sementes (acima de cinco) foi retirado. Após o 26º dia, a emergência de adultos foi acompanhada dia a dia, e a partir do 30º dia de dois em dois dias.

4 - RESULTADOS

4.1 - Purificação Parcial das Proteinases e Alfa-Amilases de Zabrotes subfasciatus

Os trabalhos de purificação parcial das proteinases e amilases de larvas de Zabrotes subfasciatus foram precedidos pela determinação dos níveis de atividade azocaseinolítica ao longo do desenvolvimento do inseto (do 13º ao 26º dia após a oviposição) de modo a se determinar o estágio ou idade onde a atividade proteolítica era máxima, indicativo de uma maior atividade das enzimas digestivas (WIGGLESWORTH, 1972). Como está mostrado na FIGURA 1, larvas com idades variando entre 16 e 18 dias apresentaram maior atividade azocaseinolítica. Dessa forma, a purificação parcial das proteinases e amilases foi feita a partir de intestinos de larvas com estas idades. Para tanto, extrato intestinal de aproximadamente 6000 larvas foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-75. Toda a atividade proteolítica recuperada foi eluída em um volume correspondente a um peso molecular por volta de 31000 (FIGURA 2). Por sua vez, dois picos com atividade amilásica com pesos moleculares aproximadamente iguais a 55000 (fração AI) e 28000 (fração AII) foram obtidos. Estas duas frações foram utilizadas para estudos de caracterização das amilases. Os tubos apresentando atividade proteolítica foram reunidos e aplicados a uma coluna de DEAE-Sephadex. Como resultado, foram obtidas duas frações com atividade proteolítica, uma das quais eluída com o tampão de partida (fração PI) e a outra eluída a uma concentração de NaCl de 0,09M (fração PII) (FIGURA 3). Na TABELA 1 vê-se que a fração proteolítica PI quase não sofreu purificação ao passo que a fração PII foi purificada em torno de 19 vezes. Por sua vez, a TABELA 2 mostra que a fração amilásica AI apresen

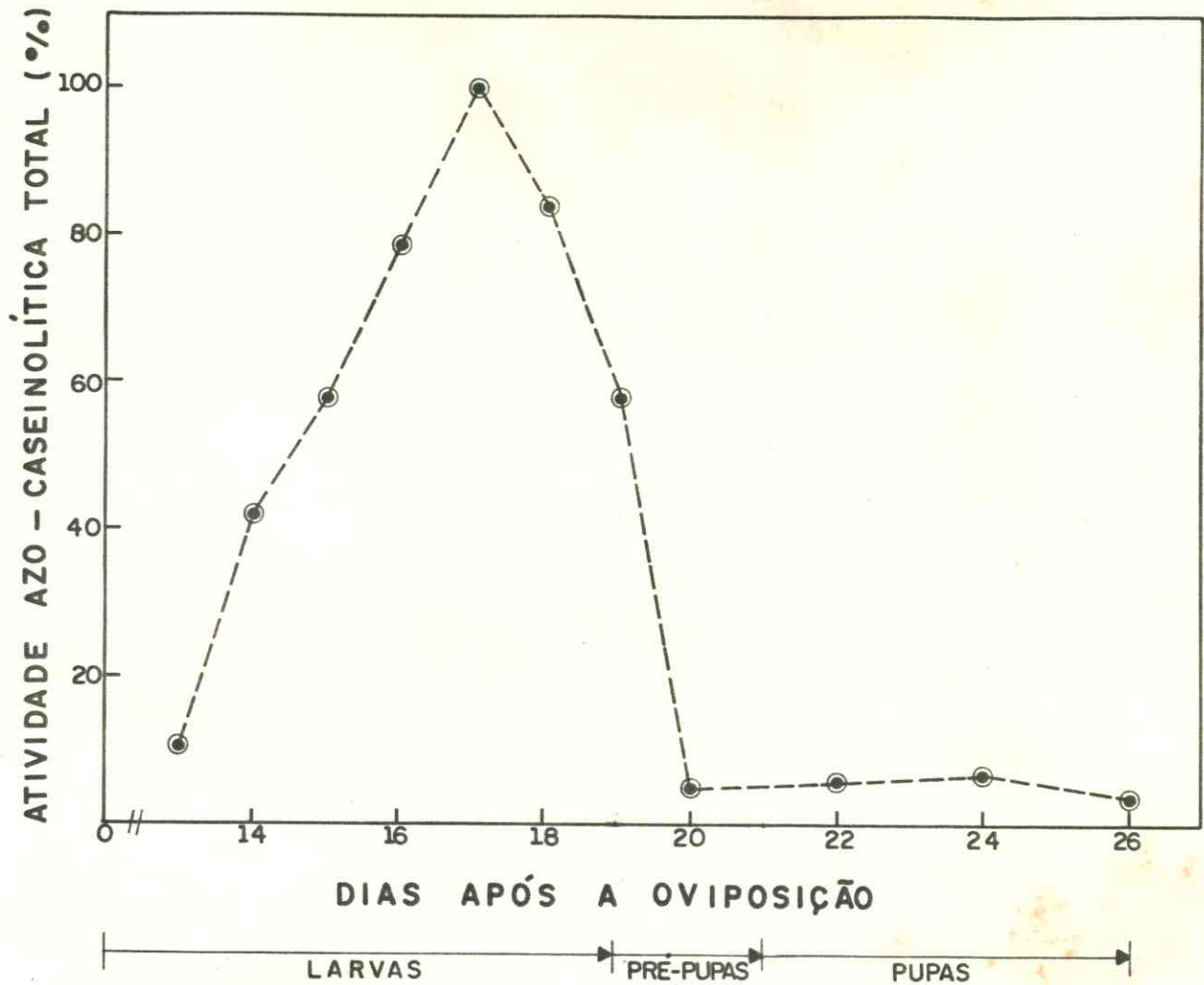


FIGURA 1 - Atividade azo-caseinolítica total (percentagem em relação ao maior valor) durante o desenvolvimento de Zabrotes subfasciatus. Os valores grafados representam médias de um mínimo de 3 determinações, cada uma feita em triplicata.

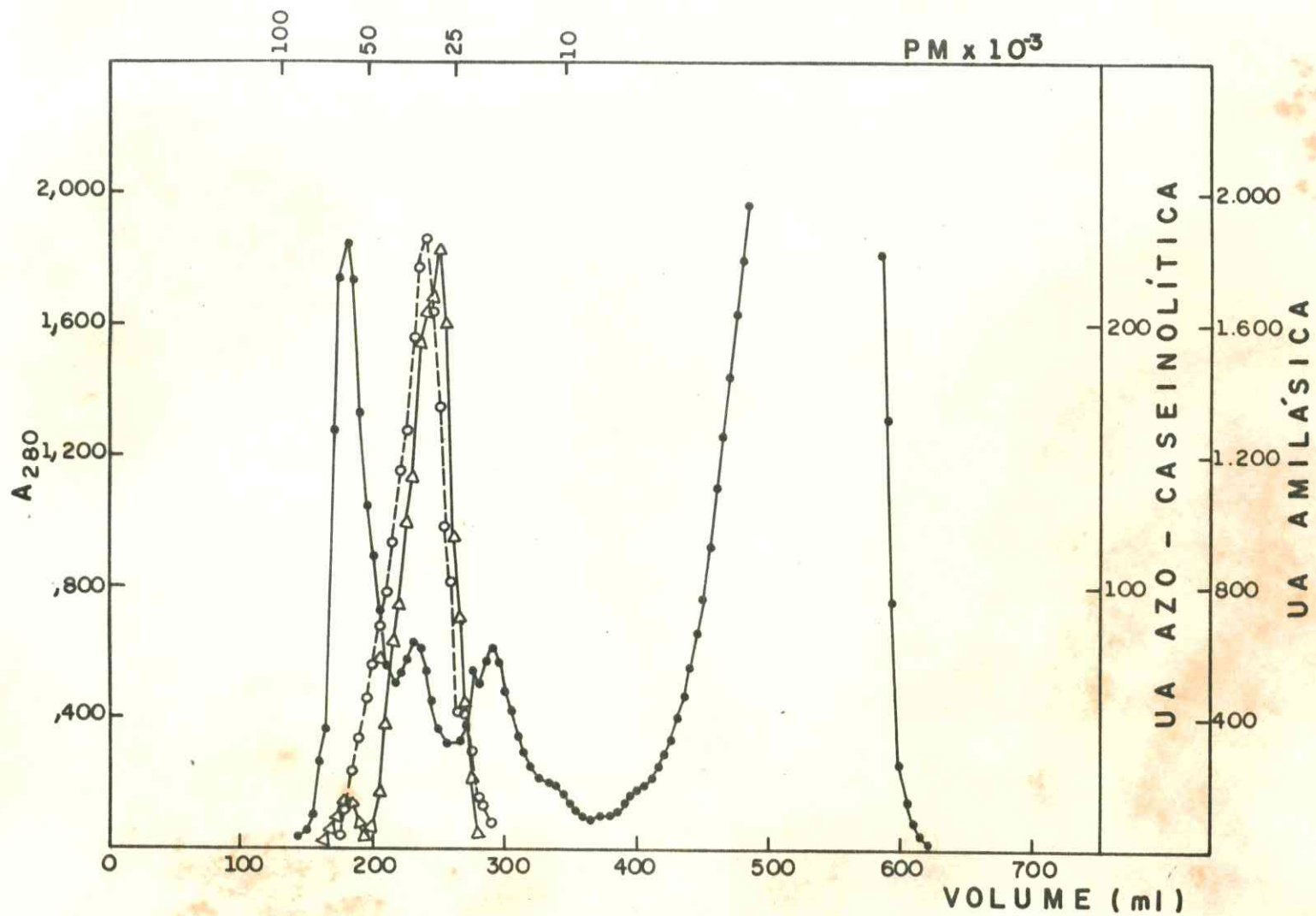


FIGURA 2 - Cromatografia em Sephadex G-75 do homogenato intestinal de *Zabrotes subfasciatus*. (●—●) A_{280} ; (○--○) UA azo-caseinolítica; (△—△) UA amilolítica.

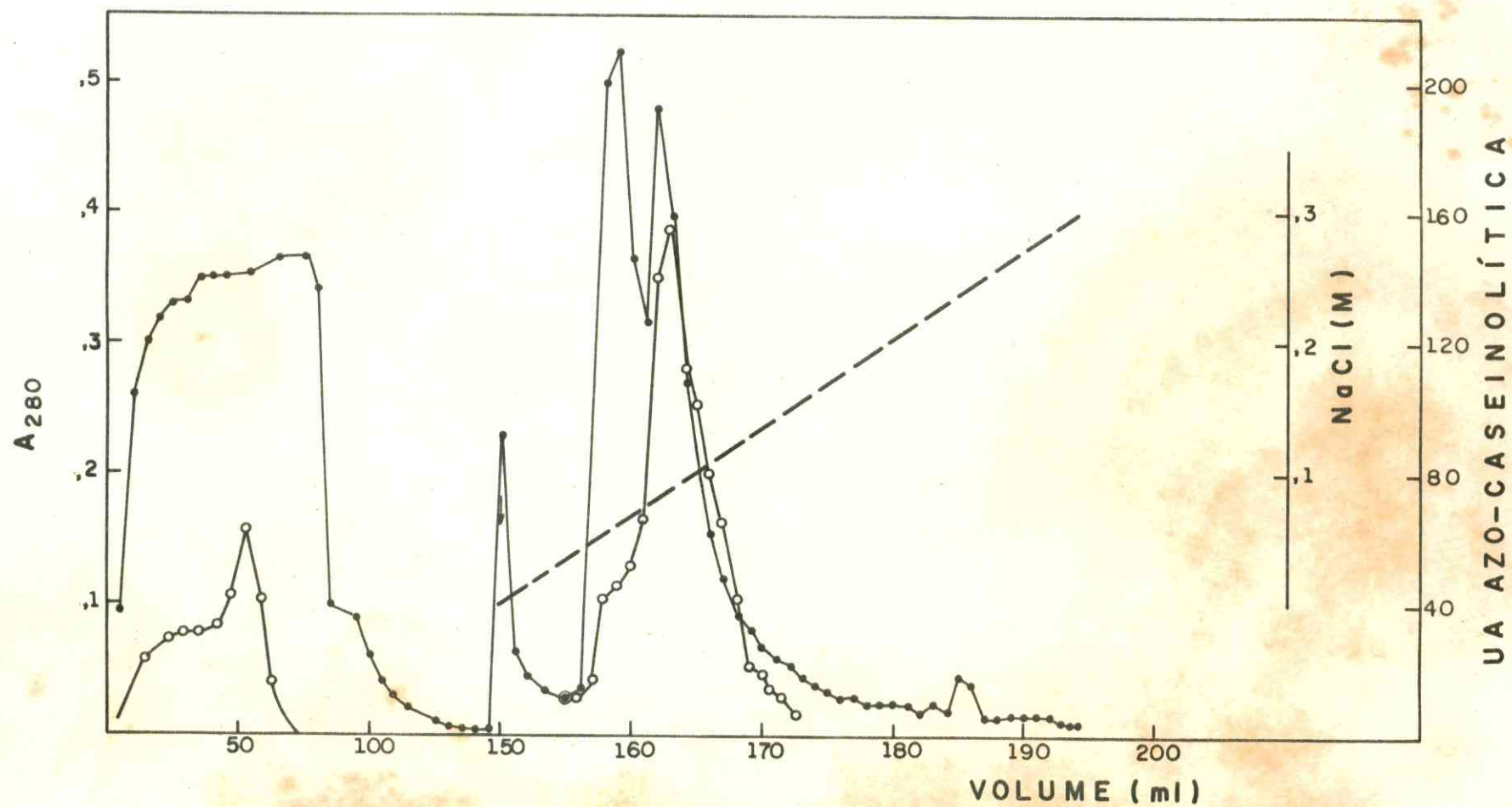


FIGURA 3 - Cromatografia em DEAE-Sepharose da fração proteolítica obtida em Sephadex G-75. (●—●) A₂₈₀; (○—○) UA azo-caseinolítica.

TABELA 1 - Purificação das atividades proteolíticas do homogenato intestinal de Zabrotes subfasciatus por cromatografia em coluna de Sephadex G-75 seguida de fracionamento em coluna de DEAE-Sepharose.

Fração	Atividade Proteolítica (UA/ml)	Proteína (mgP/ml)	Atividade Específica (UA/mgP)	Fator de Purificação
Extrato bruto	580,0	14,30	40,6	1,0
Sephadex G-75	18,8	0,28	67,1	1,7
Fração PI	6,2	0,14	44,3	1,1
Fração P II	77,4	0,10	774,0	19,1

TABELA 2 - Purificação das atividades amilolíticas do homogenato intestinal de Zabrotes subfasciatus por cromatografia em coluna de Sephadex G-75.

Fração	Atividade Amilolítica (UA/ml)	Proteína (mgP/ml)	Atividade Específica (UA/mgP)	Fator de Purificação
Extrato Bruto	2850,0	14,30	199,3	1,0
Fração AI	18,1	0,28	64,6	0,3
Fração AII	817,5	0,11	7234,5	36,3

tou um fator de purificação de 0,3 enquanto que a fração AII foi purificada cerca de 36 vezes.

4.2 - Determinação das Condições Ótimas de Ensaio da Atividade Proteolítica

O efeito da temperatura de ensaio sobre a atividade azo-caseinolítica presente no homogenato intestinal não fracionado de Z. subfasciatus foi determinado às temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C. Como está mostrado na FIGURA 4, as proteinases presentes no intestino de Z. subfasciatus apresentaram um máximo de atividade azo-caseinolítica a 55°C.

Uma vez que a azo-caseína não é solúvel a um pH inferior a 4,0, o perfil de atividade versus pH para as proteínas foi determinado usando-se hemoglobina (pHs 2,0 a 6,0) e azo-caseína (pHs 4,0 a 9,0) como substratos, utilizando-se os seguintes tampões: tampão glicina 0,2M, pH 2,0; tampão formiato 0,2M pHs 2,5 a 3,5; tampão acetato 0,2M, pHs 4,0 a 5,5; tampão fosfato 0,2M, pHs 6,0 a 7,5 e tampão tris/HCl 0,2M, pHs 8,0 a 9,0. Com a azo-caseína, tanto o extrato bruto como a fração PI apresentaram atividades máximas a pH 5,5 (FIGURA 5). Por sua vez, observou-se que a atividade de PII foi máxima a pH 3,5 utilizando-se hemoglobina (FIGURA 6) porém, por conveniência, utilizou-se a azo-caseína a pH 4,0. Para os ensaios proteolíticos, usando a hemoglobina como substrato, foi escolhida a temperatura de 40°C que foi a ideal para a atividade hemoglobínica intestinal de C. maculatus (COELHO, 1980), visto que, com a azo-caseína, este inseto comportou-se de forma similar ao da atividade de Z. subfasciatus.

O efeito da concentração de azo-caseína sobre a atividade proteolítica do homogenato intestinal de Z. subfasciatus foi medido variando-se a concentração deste substrato de 0,066% a 0,333% no meio de reação, nas condições ideais do ensaio. A FIGURA 7 mostra que a atividade proteolítica intestinal saturou-se em concentrações do substrato acima de 0,133%.

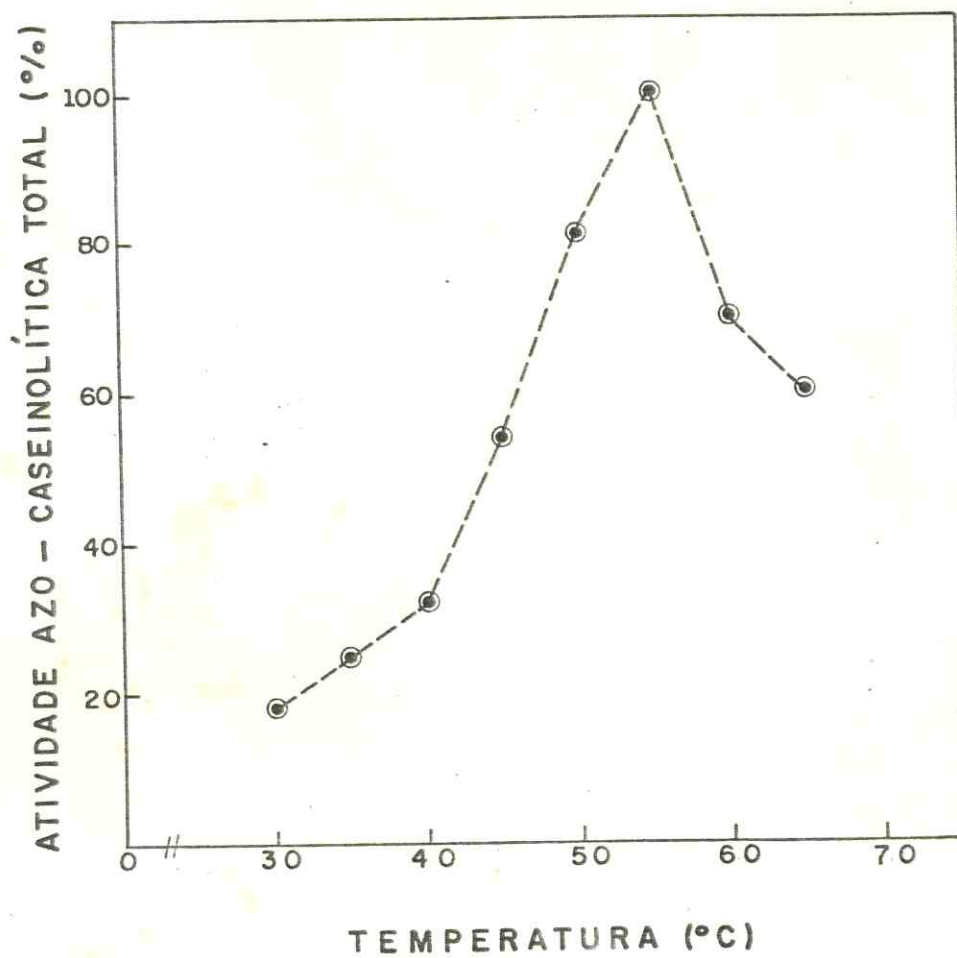


FIGURA 4 - Efeito da temperatura sobre a atividade azo-caseinolítica total (percentagem do maior valor) do homogenato intestinal de *Zabrotes subfasciatus*. Os valores grafados são médias de quatro determinações, feita cada uma em triplicata.

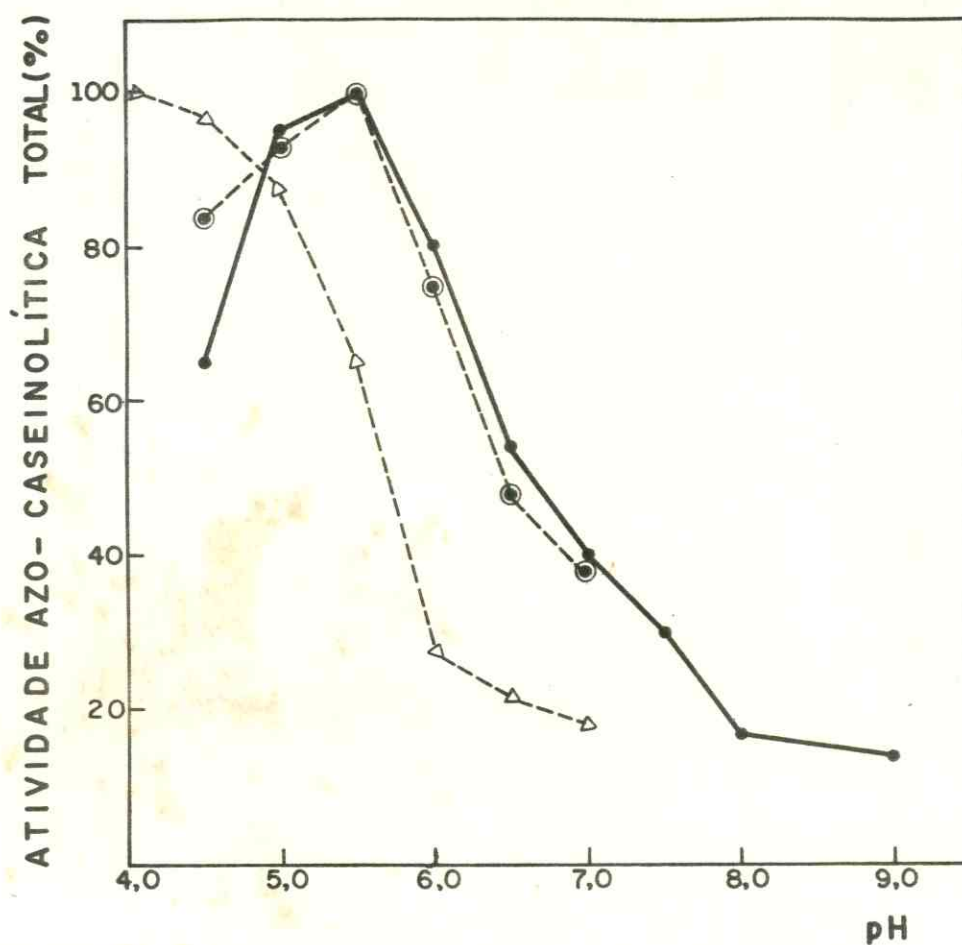


FIGURA 5 - Efeito de pH sobre a atividade azo-caseinolítica total (percentagem do maior valor) do homogenato intestinal e frações PI e PII obtidas por cromatografia de troca iônica. (●—●) homogenato intestinal; (●—●) fração PI; (▲—▲) fração PII. Os valores grafados são médias de quatro determinações cada uma feita em triplicata.

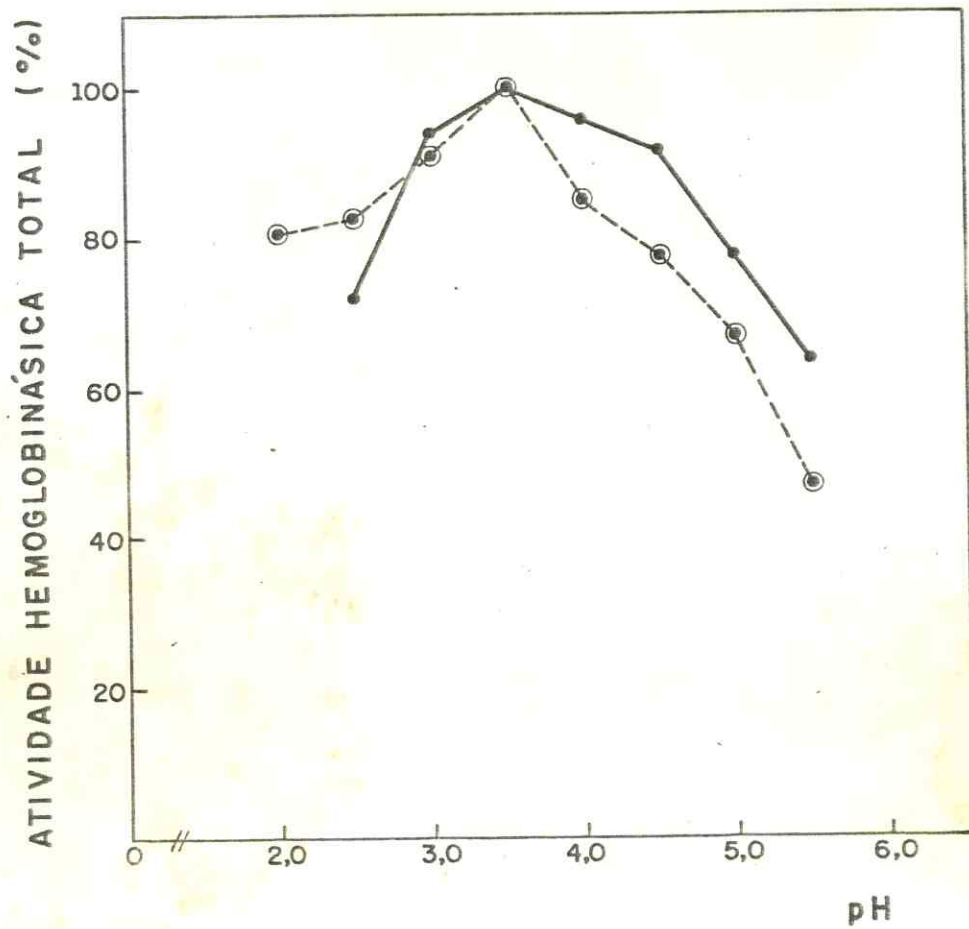


FIGURA 6 - Efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica total (percentagem do maior valor) do homogenato intestinal e fração PII obtida por cromatografia de troca iônica. (●—●) homogenato intestinal; (⊙—⊙) fração PII. Os valores grafados são médias de quatro determinações feita cada uma em triplicata.

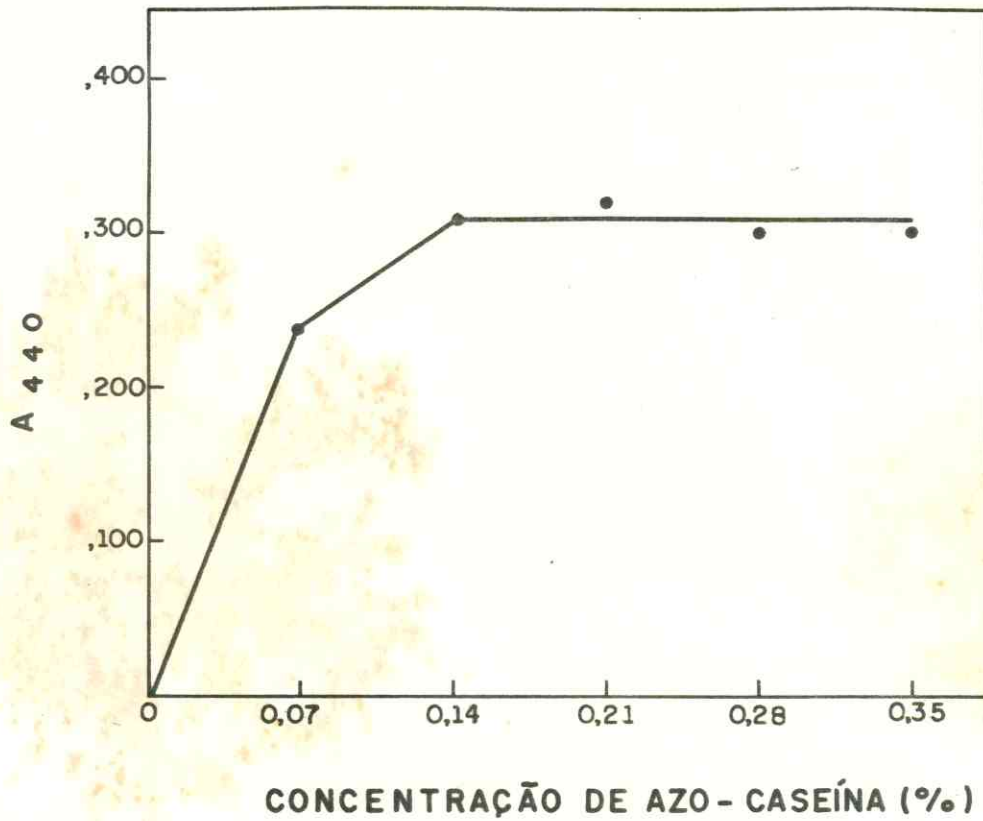


FIGURA 7 - Efeito da concentração de azo-caseína sobre a atividade do homogenato intestinal de *Zabrotes subfasciatus*. Os valores acima são médias de duas determinações.

4.3 - Efeito de Alguns Ativadores e Inibidores Sobre as Proteinases de *Z. subfasciatus*

A ação de alguns ativadores e inibidores sobre as proteinases de *Z. subfasciatus* foi estudada com o objetivo de se determinar a classe mecanística destas enzimas. Os resultados obtidos com o extrato bruto intestinal e as frações PI e PII estão sumarizados na TABELA 3. A adição de cisteína e ditiotreitol (DTT) no meio de ensaio resultou num acréscimo da atividade proteolítica da fração PI, enquanto que a atividade proteolítica da fração PII permaneceu inalterada. A adição destes ativadores de proteinases cisteínicas ao meio de ensaio com o homogenato intestinal não fracionado também levou a um aumento de sua atividade proteolítica embora menor do que aquele observado para a fração PI. Por sua vez, a adição de TPCK e TLCK (inibidores de proteinases serínicas) ao meio de ensaio contendo a fração PI, resultou num decréscimo da atividade proteolítica desta fração de 34% e 31%, respectivamente. Estes reagentes praticamente não afetaram a atividade da fração PII. Quando estes dois inibidores foram adicionados ao meio de ensaio contendo o homogenato intestinal não fracionado foi também observado um decréscimo na atividade proteolítica em torno de 35%. PMSF, um outro tipo de inibidor de proteinases serínicas, causou um decréscimo de 7% nas atividades do extrato bruto e da fração PII e de 11% na fração PI. A adição dos inibidores de proteinases cisteínicas E-64, NEM, DTP e AIA resultou num alto grau de inibição da fração PI, enquanto que a atividade proteolítica da fração PII só foi inibida por DTP (9%). por sua vez, a adição destes inibidores ao meio de reação contendo o homogenato intestinal não fracionado, ocasionou um decréscimo de sua atividade variando de 29 a 55%. O efeito de pepstatina, um inibidor de origem microbiana específico para proteinases aspartáticas (CORVOL *et al.*, 1973), foi também estudado. Neste caso, este inibidor anulou completamente a atividade proteolítica da fração PII, inibindo 46% da atividade do extrato

TABELA 3 - Efeitos de alguns inibidores e ativadores de proteínases sobre as frações proteolíticas de Zabrotes subfasciatus.

Reagentes	Concentração (mM)	Solvente	Atividade Total (% do controle*)		
			Extrato Bruto	Fração PI	Fração PII
E-64	0,028	Tampão de ensaio	45	20	100
NEM	1,0	"	65	25	100
DTP	1,0	Me ₂ SO	71	57	91
Cistatina	0,075	tampão de ensaio	54	43	100
AIA	1,2	"	71	16	100
TPCK	0,066	Me ₂ SO	64	66	98
TLCK	0,066	Me ₂ SO	67	69	97
Cisteína	1,0	tampão de ensaio	138	164	100
DIT	1,0	"	165	194	100
Pepstatina	0,014	Me ₂ SO	56	85	0
PMSF	1,0	Me ₂ SO	93	89	93
Inibidor de tripsina de soja	0,010	tampão de ensaio	100	100	98
Inibidor de tripsina de <u>Vigna unguiculata</u>	0,010	"	100	100	100
Inibidor I de quimiotripsina de batata	0,010	"	100	93	93
Inibidor de carboxipeptidase de batata	0,010	"	100	95	100

* Controle - atividade proteolítica determinada na ausência de inibidores e ativadores.

Os valores acima são médias de quatro repetições feitas cada uma em triplicata.

bruto intestinal e de 15% da atividade da fração PI. Os efeitos de algumas proteínas inibidoras de enzimas proteolíticas estão também mostrados na TABELA 3. O inibidor I de quimiotripsina de batata inibiu 7% das atividades das frações PI e PII e o inibidor de carboxipeptidase de batata inibiu 5% da atividade de PI. As outras atividades permaneceram inalteradas. No entanto, cistatina, um inibidor protéico de proteínas cisteínicas isolado da clara do ovo (ANASTASI *et al.*, 1983), reduziu as atividades do extrato bruto intestinal (46%) e da fração PI (57%), não tendo efeito inibitório sobre a fração PII.

As diferenças qualitativas entre as proteinases de Z. subfasciatus e C. maculatus estão apresentadas na FIGURA 8, a qual mostra que a atividade azo-caseinolítica intestinal de larvas de C. maculatus é quase completamente inibida por E-64, enquanto que este mesmo inibidor inibe apenas cerca de 60% da atividade proteolítica de Z. subfasciatus.

4.4 - Determinação das Condições Ótimas de Ensaio da Atividade Amilásica

O efeito da temperatura sobre as atividades amilásicas das frações AI e AII, realizado entre as temperaturas de 30 a 65°C utilizando-se tampão acetato 0,1M, pH 4,0 ou tampão acetato 0,1M, pH 5,0 contendo NaCl 20mM e CaCl₂ 0,1mM, é mostrado na FIGURA 9. A fração AI apresentou um aumento considerável de sua atividade até a temperatura de 55°C, tendo apresentado apenas uma ligeira queda até a 65°C. A fração AII mostrou também um máximo de atividade a 55°C.

A curva de pH versus atividade (FIGURA 10) mostrou pHs ótimos de 4,5 para a fração AI e de 5,0 para AII. Foram usados os pHs de 3,5 a 8,0, utilizando-se os seguintes tampões: tampão acetato 0,1M, pHs 3,5 a 5,5; tampão fosfato 0,1M, pHs 6,0 a 7,0 e tampão tris/HCl 0,1M, pHs 7,5 e 8,0. Nos ensaios com a fração AII utilizou-se tampões contendo

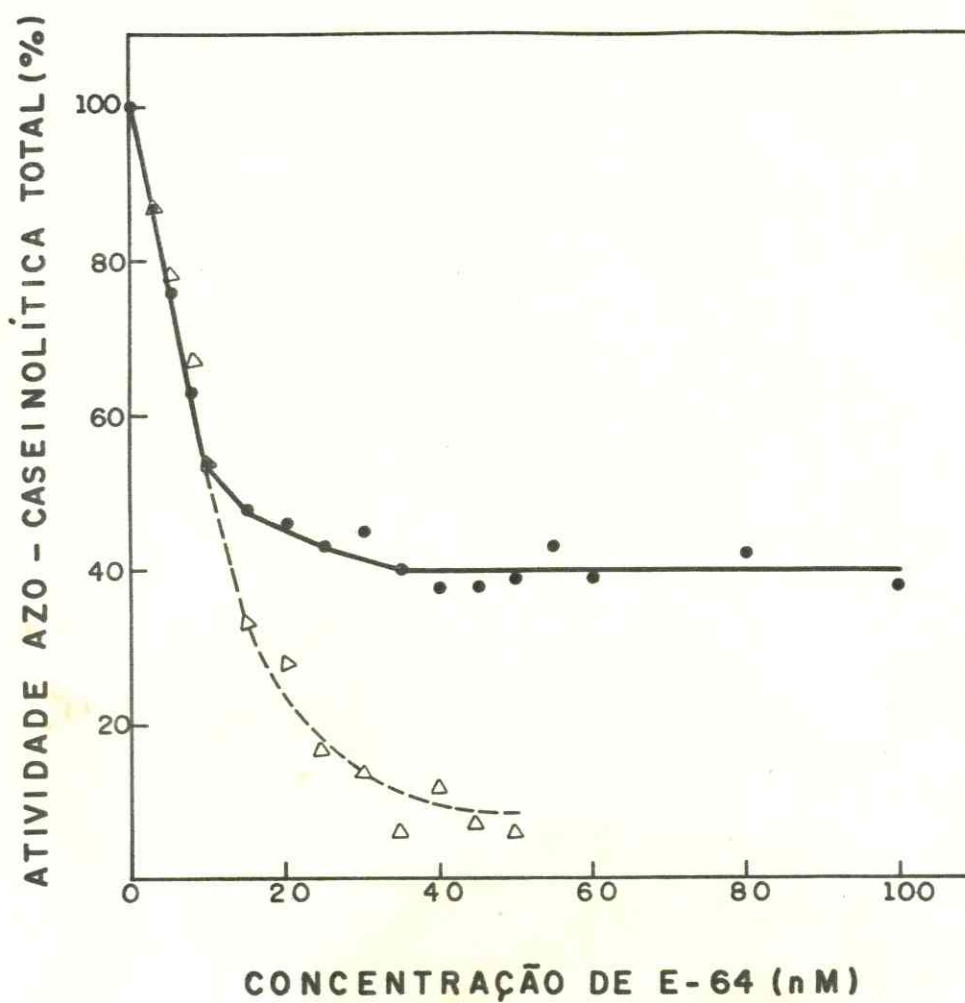


FIGURA 8 - Efeito da concentração de E-64 sobre a atividade azo-caseinolítica total (percentagem do maior valor) do homogenato intestinal de Zabrotes subfasciatus (●) e Callosobruchus maculatus (△--△).

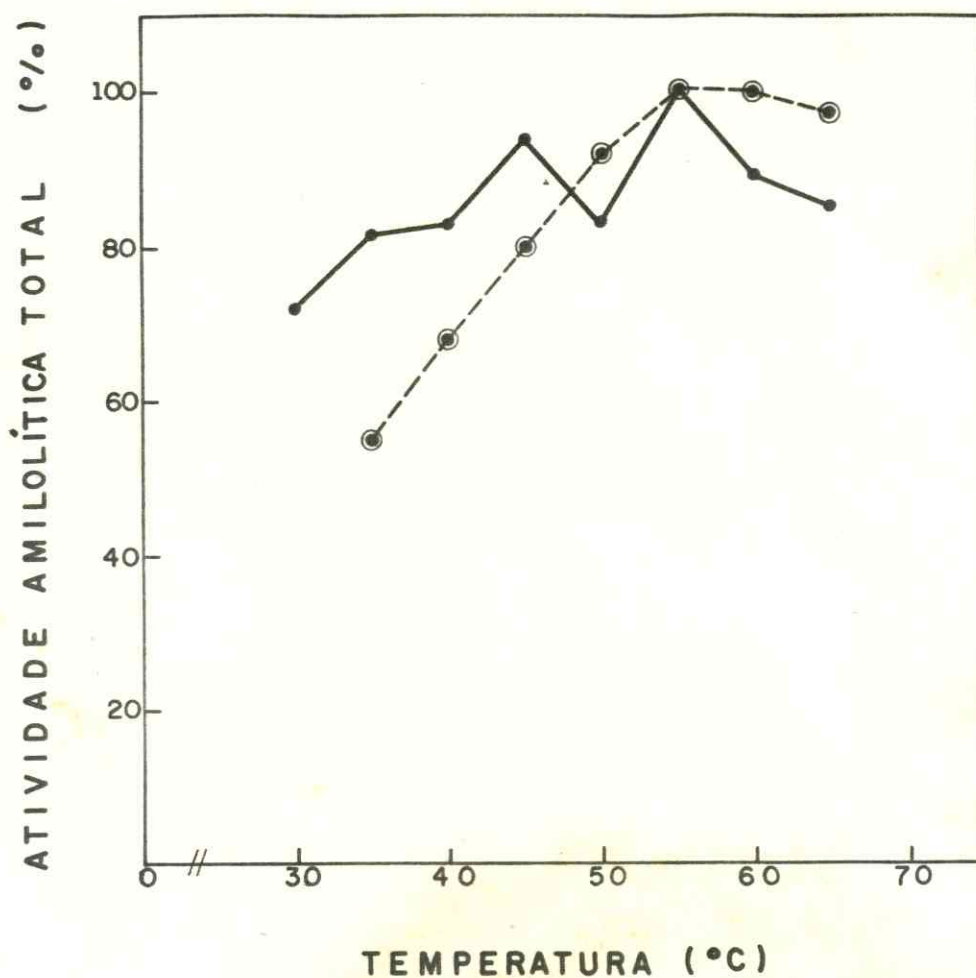


FIGURA 9 - Efeito da temperatura sobre a atividade amilolítica total (percentagem do maior valor) das frações AI e AII obtidas por cromatografia do homogenato intestinal em Sephadex G-75. (●—●) fração AI; (—●) fração AII. Os valores grafados são médias de quatro determinações feitas uma em triplicata.

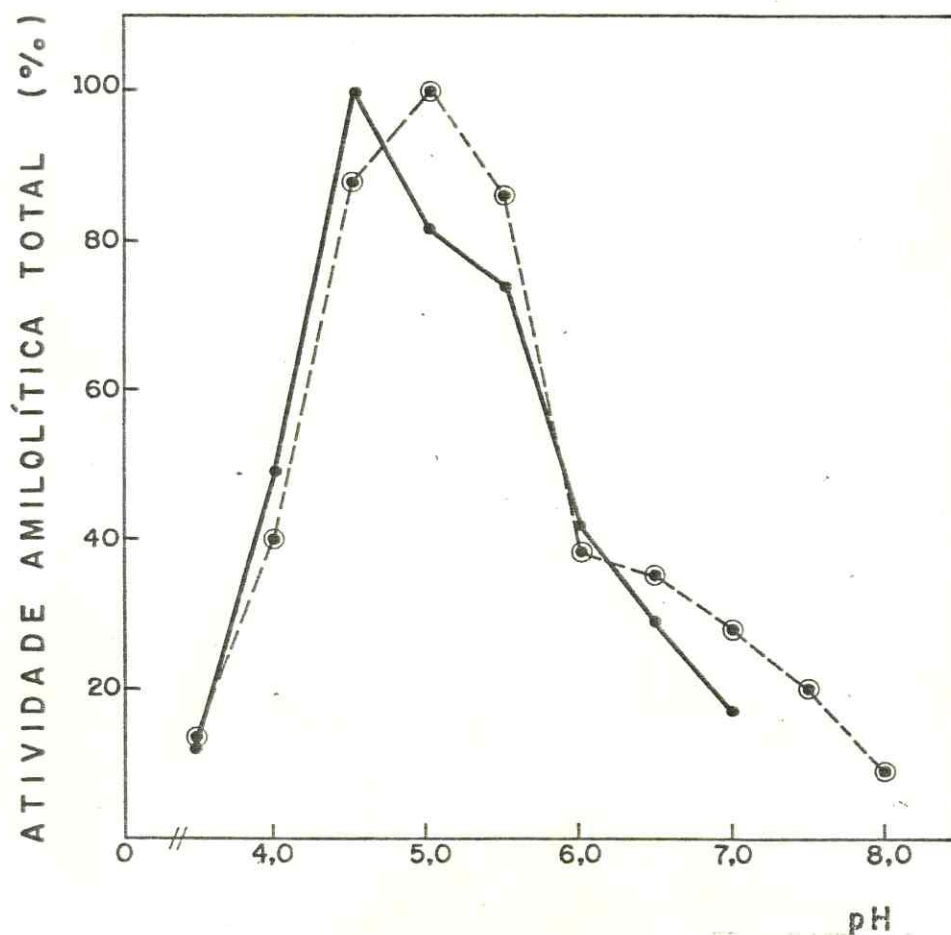


FIGURA 10 - Efeito do pH sobre a atividade amilolítica total (percentagem do maior valor) das frações AI e AII obtidas por cromatografia do homogenato intestinal em Sephadex G-75. (—●—) fração AI; (---○---) fração AII. Os valores grafados são médias de quatro determinações feita cada uma em triplicata.

NaCl 20mM e CaCl_2 0,1mM.

A concentração de substrato (amido 1%) foi usada tomando como base estudos realizados com C. maculatus (LOPES, 1985).

4.5 - Estudos de Ativação e Inibição das Amilases

Estudos de ativação e de inibição sobre as frações amilolíticas AI e AII foram feitos com o intuito de se estabelecer a natureza alfa-amilásica ou beta-amilásica destas frações. Uma propriedade comum à maioria das alfa-amilases é a presença de Ca^{2+} como parte integrante do seu sítio ativo e a sua conseqüente inibição por agentes quelantes (PODOLER e APPLEBAUM, 1971a). Como mostrado na TABELA 4, CaCl_2 teve um efeito ativador sobre a fração AII, não afetando a fração AI. EDTA, por sua vez, inibiu a atividade da fração AII e teve um efeito estimulatório sobre a fração AI. Estes dados sugerem a presença de alfa-amilases na fração AII e de beta-amilases na fração AI. Segundo APPLEBAUM et al. (1961) e TERRA et al. (1977), as alfa-amilases não dependem de grupamentos sulfidrílicos para a sua atividade, enquanto as beta-amilases dependem. Quando o efeito da adição ao meio de ensaio dos agentes bloqueadores de grupamentos sulfidrílicos AIA e NEM foi estudado, observou-se uma ligeira inibição da atividade amilásica da fração AI, enquanto que a atividade amilásica da fração AII permaneceu inalterada. Por sua vez, a adição de cisteína estimulou a atividade somente de AI (TABELA 4). Estes resultados reforçam a indicação da presença de alfa e beta-amilases nas frações AII e AI, respectivamente. A presença de NaCl ativou a fração AII e causou um ligeiro aumento na atividade amilásica de AI (7%). Este resultado não ajuda a diferenciar as natureza exo e endo-amilolíticas das duas frações desde que há referências de ativação e indiferença por Cl^- em alfa-amilases (PODOLER & APPLEBAUM, 1971b) embora beta-amilases não requeiram íon inorgânico para sua

TABELA 4 - Efeito de alguns ativadores e inibidores de amilases sobre as frações AI e AII de Zabrotes subfasciatus.

Reagente	Concentração (mM)	Atividade Total (% do controle*)	
		Fração AI	Fração AII
AIA	2,0	92	100
NEM	2,0	80	100
Cisteína	2,0	150	100
EDTA	2,0	127	66
NaCl	0,3	107	119
CaCl ₂	3,0	100	120
HgCl ₂	2,0	0	0
CuSO ₄	2,0	0	0

* Controle - atividade proteolítica determinada na ausência de inibidores e ativadores.

Os valores acima são médias de quatro determinações feitas cada uma em triplicata.

atividade (ROBYT & WHELAN, 1973). Finalmente, os compostos HgCl_2 e CuSO_4 inibiram completamente as atividades das frações AI e AII.

4.6 - Efeito de Inibidores Naturais de alfa-Amilases sobre as Frações AI e AII

Os efeitos dos inibidores de alfa-amilase isolados de Triticum vulgare e Phaseolus vulgaris (variedade Rico 23) estão mostrados na TABELA 5. Estes dois inibidores inibem fortemente a atividade amilásica da fração AII (76 e 87%, respectivamente) enquanto que atividade da fração AI foi apenas ligeiramente afetada (10%).

4.7 - Efeitos do NaCl e CaCl_2 na Estabilidade Térmica da Fração AII

Estes estudos foram realizados após diálise contra água destilada (24 horas) da fração AII. O efeito do NaCl e do CaCl_2 na estabilização térmica de amostras desta fração foi determinado pela incubação das mesmas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 60°C . Após incubação, alíquotas foram retiradas e suas atividades determinadas. Como mostrado na FIGURA 11, a incubação da fração AII por 20 minutos na presença de NaCl ou CaCl_2 essencialmente não afeta sua atividade. Por outro lado, a incubação da fração AII na ausência de NaCl e CaCl_2 levou a um grau de inativação de 85% em 20 minutos.

TABELA 5 - Efeito dos inibidores naturais de alfa-amilase sobre as frações amilolíticas de Zabrotes subfasciatus

Inibidor	Concentração (μ M)	Atividade Total (% do controle*)	
		Fração AI	Fração AII
<u>Phaseolus vulgaris</u>			
(Rico 23)	0,7	90	24
<u>Triticum vulgaris</u>	1,4	90	13

* Controle - atividade proteolítica determinada na ausência de ativadores e inibidores.

Os valores acima são médias de quatro determinações feitas cada uma em triplicata.

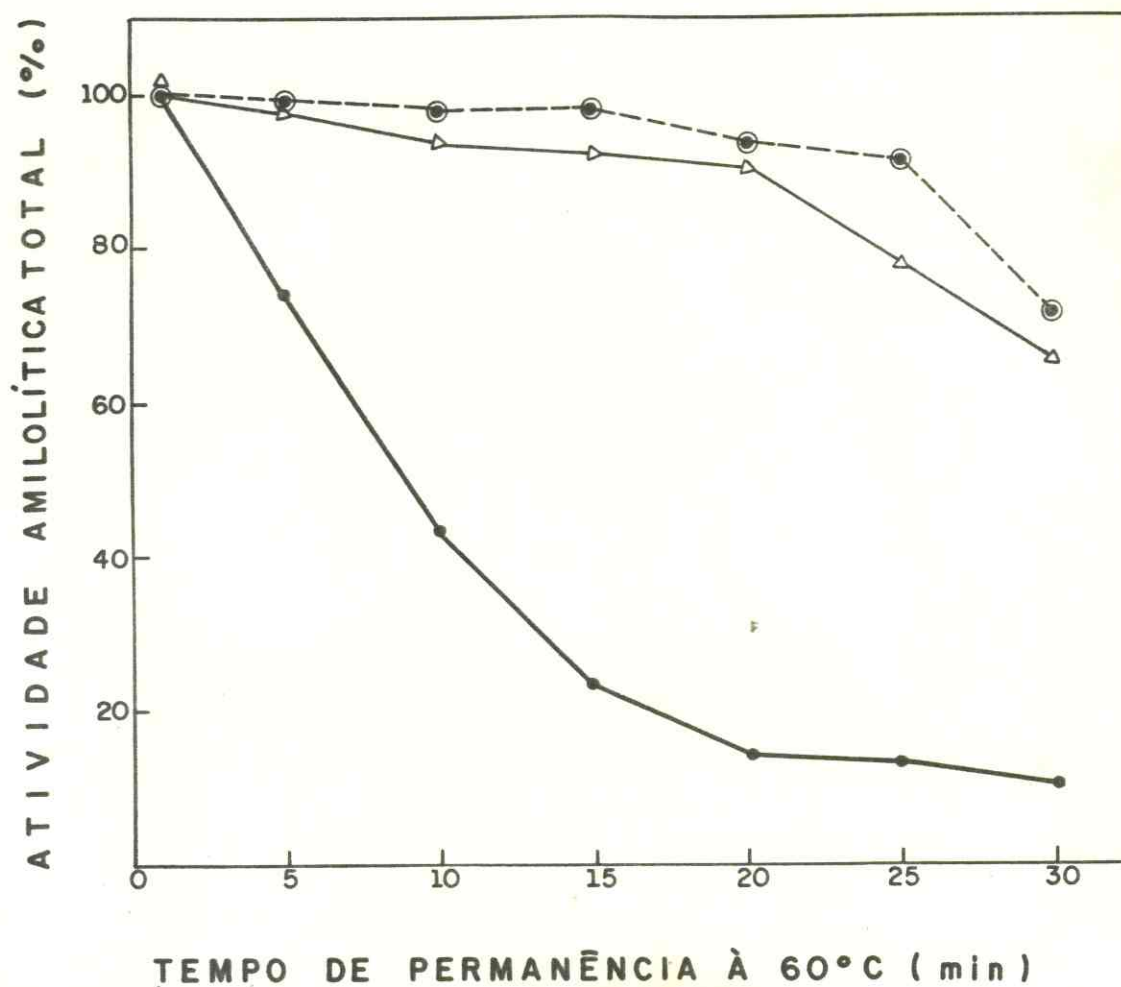


FIGURA 11 - Efeito do NaCl e CaCl₂ sobre a estabilidade térmica da atividade amilolítica total (percentagem em relação ao maior valor) da fração AII. (●—●) fração AII em tampão acetato 0,1M, pH 5,0; (○---○) fração AII em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 contendo NaCl 20mM; (△—△) fração AII em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 contendo CaCl₂ 1,0mM. Os valores grafados são médias de duas determinações.

4.8 - Desenvolvimento de Zabrotes subfasciatus em Algumas Variedades de Vigna unguiculata

Vê-se pela TABELA 6 que Z. subfasciatus desenvolve-se muito bem em todas as variedades de Vigna unguiculata utilizadas no experimento, tendo, inclusive, uma boa performance nas variedades IT81D1045 e IT81D1064 que são resistentes ao desenvolvimento do bruquídeo Callosobruchus maculatus (XAVIER-FILHO & CAMPOS, no prelo). Observa-se que os valores obtidos para as médias de dias de emergência e percentagem de emergência nas duas variedades resistentes ao C. maculatus são maiores e menores, respectivamente, aos obtidos para as outras variedades estudadas, embora estas diferenças não sejam significativas ao nível de 5% (teste de Tukey).

TABELA 6 - Performance do bruquídeo Zabrotes subfasciatus em algumas variedades de Vigna unguiculata.

Variedades	MDE*	% Emergência
CE-31 (Pitiúba)	27,0 ± 0,2	93,8 ± 2,8
Ce-11 (Quebra-Cadeira)	27,6 ± 0,3	95,0 ± 2,0
CE-315	27,5 ± 0,5	95,0 ± 3,0
IT81D1045	27,7 ± 0,1	89,5 ± 1,5
IT81D1064	27,9 ± 0,5	87,0 ± 4,0

* Média de dias de emergência.

Obs.: Os dados são referentes a médias de quatro determinações e foram analisados pelo teste de Tukey de comparação entre médias. Os valores numa mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5%.

5 - DISCUSSÃO

Os resultados sobre os níveis de atividade azo-casei-nolítica ao longo do desenvolvimento de Zabrotes subfasciatus mostraram um máximo de atividade na fase larval e níveis de atividade muito baixas nas fases de pré-pupa e pupa (FIGURA 1). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por LOPES (1985) para as atividades proteolíticas e amilásicas de Callosobruchus maculatus.

Até o momento, estudos referentes às proteinases digestivas de insetos da Família Bruchidae foram realizados somente com duas espécies: Callosobruchus maculatus, inseto que é especialista na predação de sementes de V. unguiculata e Acanthoscelides obtectus que tem como principais hospedeiros as sementes de Phaseolus. Ambas as espécies tiveram suas proteinases parcialmente purificadas e caracterizadas, tendo sido demonstrado que estes bruquídeos utilizavam-se de proteinases cisteínicas para digerirem as proteínas presentes em suas dietas (CAMPOS et al., submetido para publicação; WIEMAN, 1986). Os dados aqui apresentados indicam que o sistema proteolítico de Z. subfasciatus, pelo menos em relação à classe mecanística de proteinases que suas larvas utilizam para digerirem proteínas, é diferente do sistema proteolítico de C. maculatus e A. obtectus (FIGURA 8). A presença em Z. subfasciatus de proteinases pertencentes à classe mecanística das proteinases cisteínicas e proteinases aspárticas ficou evidenciada pelos estudos do efeito de alguns inibidores e ativadores de proteinases sobre as frações proteolíticas PI e PII (TABELA 3). Estes estudos mostraram que a atividade proteolítica da fração PI foi fortemente inibida por E-64, tripeptídeo de origem microbiana e específico para os sítios ativos de proteinases cisteínicas (STOREY & WAGNER, 1986) e por cistatina, proteína inibidora de proteinases cisteínicas (ANASTASI et al., 1983). Ou

tros inibidores de proteinases cisteínicas, embora menos específicos, tais como NEM, DTP e AIA (STOREY & WAGNER, 1986) também exerceram forte efeito inibitório sobre a fração PI. A ativação da fração PI por cisteína e DTT (dois conhecidos ativadores de proteinases cisteínicas) se constitui numa outra evidência para presença de proteinases cisteínicas na fração PI. Uma análise da TABELA 3 sugere que a presença de proteinases serínicas na fração PI não pode ser de todo descartada, uma vez que a atividade proteolítica desta fração é inibida por TLCK e TPCK, inibidores de proteinases serínicas (STOREY & WAGNER, 1986). Apesar de que o pH ótimo para a atividade proteolítica desta fração seja de 5,5 (FIGURA 5) típico de proteinases cisteínicas (APPLEBAUM, 1985; STOREY & WAGNER, 1986), enquanto que proteinases serínicas têm pH ótimo alcalino (STOREY & WAGNER, 1986). A fração PII, por sua vez, não foi inibida praticamente por nenhum dos inibidores de proteinases cisteínicas e serínicas testados, nem tampouco foi ativada por cisteína e DTT (TABELA 3). O único inibidor capaz de anular completamente a atividade da fração PII foi pepstatina, um inibidor de origem microbiana específico para proteinases aspárticas (STOREY & WAGNER, 1986). Este fato, juntamente com os dados da FIGURA 6, mostrando ser o pH ótimo para a atividade da fração PII de 3,5, sugere a presença de proteinases aspárticas nesta fração.

A temperatura ótima de 55°C (FIGURA 4) encontrada para o homogenato intestinal de Z. subfasciatus, hidrolizando azo-caseína, foi semelhante àquelas apresentadas pelas proteinases do bruquídeo C. maculatus (CAMPOS et al., submetido para publicação) e de Pterostichus melanarius (GOODING & HUANG, 1969).

O peso molecular da fração proteolítica presente no homogenato intestinal de Z. subfasciatus foi estimado por cromatografia de exclusão molecular como sendo de aproximadamente 31000 (FIGURA 2) assemelhando-se aos pesos moleculares das proteinases de C. maculatus e A. obtectus (CAMPOS et al., submetido para publicação; WIEMAN, 1986).

Os dados apresentados na TABELA 6, mostram que Z.

subfasciatus é capaz de se desenvolver igualmente bem em cultivares de V. unguiculata resistentes e suscetíveis ao ataque do bruquídeo C. maculatus. Neste ponto, é tentador sugerir que o desenvolvimento de Z. subfasciatus em sementes resistentes a C. maculatus pode ser devido á presença de proteinases aspárticas, uma vez que C. maculatus parece possuir apenas proteinases cisteínicas (CAMPOS submetido para publicação)(Ver também a FIGURA 8). Como conseqüência desta sugestão poderia se inferir também que o fator responsável pela resistência das cultivares IT81D 1045, IT81D 1064 e TVu 2027 a C. maculatus seria de natureza proteica. Este fator tanto poderia ser um inibidor de proteinases cisteínicas como uma proteína que de alguma maneira afetaria a digestão de proteínas em C. maculatus, ou ambos.

De acordo com a FIGURA 9, a temperatura ótima de ensaio determinada para a atividade amilásica foi de 55°C. Amilase com temperatura ótima de ensaio também elevada (50°) foi observado por TERRA et al. (1977) em Rhyncosciara americana. A curva de pH versus atividade amilásica (FIGURA 10) mostra pHs ótimos de 4,5 para a fração AI e de 5,0 para a fração AII. Estes valores concordam com o pH ótimo obtido para as alfa-amilases de outros coleópteros: pH 5,3-5,8 para C. maculatus (CAMPOS et al., submetido para publicação); pH 5,2-5,4 para C. chinensis (PODOLER & APPLEBAUM, 1971b); pH 5,8 para Tenebrio molitor (APPLEBAUM et al., 1961); pH 5,0 para Sitophilus granarius e pH 4,75 para S. zeamais (BAKER, 1983).

Os estudos sobre os efeitos dos ativadores e inibidores de atividades amilásicas contidas nas frações AI e AII, sugerem que a atividade presente na primeira fração é aparentemente do tipo beta-amilásica e a atividade presente na segunda fração é aparentemente do tipo alfa-amilásica, muito embora a natureza beta-amilásica da fração AI não tenha sido conclusivamente demonstrada. É interessante ressaltar o baixo peso molecular encontrado para a alfa-amilase de Z. subfasciatus (28000) com relação aos das outras alfa-amilases de insetos que, em geral, estão situados na faixa entre 45000 a 58000 (APPLEBAUM, 1985). A alfa-amilase de Z.

subfasciatus parece ser assim a alfa-amilase de menor peso molecular já detectada em insetos. Muitas das propriedades da atividade amilásica presente na fração AII, tais como ativação por Ca^{+2} (TABELA 4), inibição por EDTA (TABELA 4), estabilidade contra inativação térmica em presença de NaCl e CaCl_2 (FIGURA 11) foram semelhantes às aquelas encontradas para alfa-amilases de outras espécies de insetos (TERRA et al., 1977; BAKER, 1983; CAMPOS et al., submetido para publicação). Não se encontrou na literatura trabalhos que informassem os pesos moleculares de beta-amilases de insetos para que pudessem ser confrontados com o aqui obtido para a beta-amilase de Z. subfasciatus (55000). O único trabalho na literatura demonstrando a presença de beta-amilase em inseto foi aquele realizado por WEBER et al. (1985) em Phoracantha semipunctata.

Tal como no caso dos inibidores de proteinases, uma das funções sugeridas para os inibidores de alfa-amilases em plantas é o de proteção contra o ataque de insetos (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1984). Como Z. subfasciatus é um predador de sementes do gênero Phaseolus, seria de se esperar que os inibidores de alfa-amilase presentes em espécies deste gênero não afetassem a atividade das alfa-amilases destes insetos. No entanto, os dados apresentados na TABELA 5 mostram que esta hipótese parece não ser correta, uma vez que um inibidor de alfa-amilase isolado de Phaseolus vulgaris (variedade Rico 23) inibe completamente a atividade da fração AII. Evidentemente, existe a possibilidade de que esta inibição não ocorra in vivo. Contudo, mesmo que a inibição ocorra in vivo é de se esperar que a atividade amilásica da fração AI (aparentemente do tipo beta-amilásica) seja suficiente para fornecer as unidades glicosídicas requeridas para o crescimento e desenvolvimento das larvas. Dessa forma, a presença desta atividade beta-amilásica em larvas de Z. subfasciatus parece ser uma estratégia evolucionária adotada pelo inseto para contrabalançar a presença de inibidores de alfa-amilase nas sementes que são predadas por ele.

6 - CONCLUSÕES

1. Larvas de Zabrotes subfasciatus se utilizam, para digerirem as proteínas de sementes de Vigna unguiculata, de pelo menos dois tipos de enzimas de classes mecanísticas diferentes, proteinases cisteínicas e proteinases aspárticas.

2. Larvas de Z. subfasciatus se utilizam de pelo menos um tipo de alfa-amilase e de pelo menos um tipo de beta-amilase para digerirem o amido presente nas sementes de V. unguiculata.

3. Larvas de Z. subfasciatus se desenvolvem normalmente em variedades de V. unguiculata resistentes e suscetíveis ao bruquídeo Callosobruchus maculatus. Sugere-se que o desenvolvimento de Z. subfasciatus em sementes resistentes a C. maculatus pode ser devida à presença de proteinases aspárticas em suas larvas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M., AKAI, S., KATO, H. & FUJIMAKI, M. Thiol protease inhibitors occurring in endosperm of corn. Agric. Biol. Chem. 44(3), 685-686 (1980).
- ANASTASI, A., BROWN, M.A., KEMBAVI, A.A., NICKILIN, M.J.H., SAYERS, C.A., SUNTER, C.S. & BARRET, A.J. Cystatin, a protein inhibitor of cystein proteinases. Biochem. J. 211, 129-138 (1983).
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology", vol. 4, pp. 279-311, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds. Pergamon Press, New York (1985).
- APPLEBAUM, S.W., SANKOVIIC, M. & BIRK, Y. Studies on the midgut amylase activity of Tenebrio molitor L. larvae. J. Insect Physiol. 7, 100-108 (1961).
- BAKER, J.E. Properties of midgut proteases in larvae of Attagenus megatoma. Insect Biochem. 6, 143-148 (1976).
- BAKER, J.E. Resolution and partial characterization of the digestive proteinases from larvae of the black carpet beetle. In "Current Topics in Insect Endocrinology and Nutrition", pp. 283-315, G. Bhoskaran, S. Friedman and J.G. Rodriguez, eds., Plenum Press, New York and London (1981).
- BAKER, J.E. Properties of amylases from midguts of larvae of Sitophilus zeamais and Sitophilus granarius. Insect Biochem. 13(4), 421-428 (1983).
- BAKER, J.E., WOO, S.M. & MULLEN, M.A. Distribution of proteinases and carbohydrates in the midgut of larvae of the sweetpotato weevil Cylas formicarius elegantulus and response of proteinases to inhibitors from sweetpotato. Entomol. Exp. Appl. 36, 97-105 (1984).

- BAKER, J.E. & WOO, S.M. Purification, partial characterization and postembryonic levels of amylases from Sitophilus oryzae and Sitophilus granarius. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2, 415-428 (1985).
- BAKER, J.E. Purification of isoamylases from the rice weevil, Sitophilus oryzae (L.) (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE), by high-performance liquid chromatography and their interaction with partially purified amylase inhibitors from wheat. Insect Biochem. 17(1), 37-44 (1987).
- BAUMGARTNER, B. & CHRISPEELS, M.J. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. Plant Physiol. 58, 1-6 (1976).
- BELOZERSKII, M.A., DUNAEVSKII, Ya E. & VOSKOBOINIKOVA, N.E. Presence in buckwheat seeds of an inhibitor of their own proteolytic enzyme. Doklady Akademii Nauk, 264, 991-993 (1982).
- BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. In "Methods in Enzymology", vol. I, pp. 149-151, S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds., Academic Press, New York (1955).
- BOROVSKY, D. Characterization of proteolytic enzymes of the midgut and excreta of the biting fly Stomoxys calcitrans. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2, 145-159 (1985).
- BRADER, L. Recent trends of insect control in the tropics. Entomol. Expl. Appl. 31, 111-120 (1982).
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).
- BRATTSTEN, L.B., HOLYOKE, C.W., LEEPER, J.R. & RAFF, K.F. Insect resistance: challenge to pest management and their basic research. Science, 231, 1255-1260 (1986).
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval Heliothis zea and Spodoptera exigua. J. Insect Physiol. 32(10), 827-833 (1986).

- BUONOCORE, V., PETRUCCI, T. & SILANO, V. Wheat protein inhibitor of alpha-amylase. Phytochem. 16, 811-820 (1977).
- BUONOCORE, V., POERIO, E., SILANO, V. & TOMASIO, M. Physical and catalytic properties of alpha-amylase from Tenebrio molitor L. larvae. Biochem. J. 153, 621-625 (1976).
- CAMPOS, F.A.P. & RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet, Eleusina coracana (Gaertn.) FEBS Letters 152, 300-304 (1983).
- CAMPOS, F.A.P. & RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the alpha-amylase inhibitor I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, Eleusina coracana Gaertn.) FEBS Letters 167, 221-225 (1984).
- CAMPOS, F.A.P., XAVIER-FILHO, J., SILVA, C.P. & ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and alpha-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle Callosobruchus maculatus (F.) submetido para publicação.
- CARVALHO, R.P.L. & ROSSETO, C.J. Biologia de Zabrotes subfasciatus (B.) (COLEOPTERA:BRUCHIDAE). Rev. Brasil Entomol. 13, 105-130 (1968).
- CHESEMAN, M.T. & GOODING, R.H. Proteolytic enzymes from tsetse flies Glossina morsitans and Glossina palpalis (DIPTERA:GLOSSINIDAE). Insect Biochem. 15(6), 677-680 (1985).
- COELHO, A.N. Relação entre o sistema proteolítico de Callosobruchus maculatus (F.) e inibidores de enzimas proteolíticas de Vigna sinensis (L.) Savi. Tese de mestrado defendida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC (1980).
- CORVOL, P., DEVAUX, C. & MENARD, J. Pepstatin, an inhibitor for renine purification by affinity chromatography. FEBS Letters 34(2), 189-192 (1973).
- DAVIES, J.C. A note on the occurrence of Zabrotes subfasciatus (COLEOPTERA:BRUCHIDAE) on legumes in Uganda. East Afr. Agric. and For. J. Abril, 294-299 (1972).

- FOARD, D.E., MURDOCK, L.L. & DUNN, P.E. Engineering of crop plants with resistance to herbivores and pathogens: an approach using primary gene products. In "Plant Molecular Biology", pp. 223-233, R.B. Goldberg, ed., Alan R. Liss, Inc., New York (1983).
- GALLO, D., NAKANO, O., WIENDL, F.M., SILVEIRA-NETO, S., CARVALHO, R.P.L. Manual de Entomologia Agrícola. 794-795, Editora Agronômica "CERES" Ltda., São Paulo (1970).
- GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., DOBIE, P., KILMINSTER, A.M. & BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in Vigna unguiculata. J. Sci. Food Agric. 30, 948-958 (1979).
- GATEHOUSE, A.M.R. & BOULTER, D. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (Vigna unguiculata) and other legumes on development of the bruchid beetle Callosobruchus maculatus. J. Sci. Food Agric. 34, 345-350 (1983).
- GATEHOUSE, A.M.R., BUTLER, K.J., FENTON, K.A. & GATEHOUSE, J.A. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of Callosobruchus maculatus. Ent. Exp. Appl. 39, 279-286 (1985).
- GATEHOUSE, A.M.R., FENTON, K.A., JEPSON, I. & PAVEY, D.J. The effects of alpha-amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of alpha-amylase in vitro and effects on development in vivo. J. Sci. Food Agric. 37, 727-734 (1986).
- GOODING, R.H. & HUANG, C.T. Trypsin and chymotrypsin from the beetle Pterostichus melanarius. J. Insect Physiol. 15, 325-339 (1969).
- GOODING, R.H. Digestive processes of haematophagous insects. V. Inhibitors of trypsin from Glossina morsitans morsitans (DIPTERA:GLOSSINIDAE). Can. Ent 106, 39-44 (1974).
- GRAF, R. & BRIEGEL, H. Isolation of trypsin enzymes from the mosquito Aedes aegypti (L.). Insect Biochem. 15(5), 611-618 (1985).
- GREEN, T.R. & RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. Science 175, 776-777 (1972).

- HALAYKO, A.J., HILL, R.D. & SVENSON, B. Characterization of the interaction of barley alpha-amylase II with an endogenous alpha-amylase inhibitor from barley kernels. Biochem. Biophys. Acta 873, 92-101 (1986).
- HORSCH, R.B., ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. Transgenic plants. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 50, 433-438 (1985).
- HOUSEMAN, J.G., & DOWNE, A.E.R. endoproteinase activity in the posterior midgut of Rhodnius prolixus Stal (HEMIPTERA:REDUVIIDAE). Insect Biochem. 10, 363-366 (1980).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Isolation and partial characterization of digestive proteinases from Triatoma phyllosoma pallidipennis Stal (HEMIPTERA:REDUVIIDAE). Comp. Biochem. Physiol. 70B, 713-717 (1981).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Identification and partial o characterization of digestive proteinases from two species bedbug (HEMIPTERA:CIMICIDAE). Can. J. Zool. 60, 1837-1840 (1982a).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Characterization of an acidic proteinase from posterior midgut of Rhodnius prolixus Stal (HEMIPTERA:REDUVIIDAE). Insect. Biochem. 12(6), 651-655 (1982b).
- HOUSEMAN, J.G., CAMPBELL, F.C. & MORRISON, P.E. A preliminary characterization of digestive proteinases in the posterior midgut of the stable fly Stomoxys calcitrans (L.) (DIPTERA:MUSCIDAE). Insect Biochem. 17(1), 213-218 (1987).
- HOWE, R.W. & CURRIE, J.C. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of bruchidae breeding in stores pulses. Bull. Entomol. Res. 55, 437-477 (1964).
- JANZEN, D.H. New horizons in the biology of plant defenses. In "Herbivores; their Interaction with Secondary Plant Metabolites", G.A. Rosenthal and Janzen, D.H., Eds., Academic Press, New York (1979).

- KAUR, S.P., SIDHU, D.S., DILLON, S.S. & KUMAR, N. Transaminase during development and aging of the buchid, Zabrotes subfasciatus (Boh.) (COLEOPTERA:BRUCHIDAE). Insect. Sci. Appl. 6(5). 585-590 (1985).
- KITCH, L.W. & MURDOCK, L.L. Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of Callosobruchus maculatus (F.). Arch. Insect Biochem. Physiol. 3(6), 561-576 (1986).
- KOGAN, M. Natural chemicals in plant resistance to insects. Iowa State J. Res. 60(4), 501-527 (1986).
- KUNZ, P.A. Resolution and properties of the proteinases in adult Aedes aegypti (L.). Insect Biochem. 8, 1969-175 (1978).
- LIPKE, H. and FRAENKEL, G.S. Effect of soybean inhibitors on growth of Tribolium confusum. Agric. Food Chem. 2(8), April 14 (1954).
- LOPES, A.N.S. Estudo do sistema proteolítico de Callosobruchus maculatus (gorgulho do feijão) durante seu desenvolvimento. Tese de mestrado defendida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC (1985).
- LOWRY, O.H., ROSEBOROUGH, M.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- MAIA, G.M.C. Inibidores de tripsina em Adenantha pavonina L. Tese de mestrado defendida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Ceará (1982).
- MARSHAL, J.J. Apha-amylase inhibitors from plants. ACS Symposium Series 15, 244-266 (1975).
- MARTIN, M.M., KUKOR, J.J., MARTIN, J.S., LAWSON, D.L. & MERRIT, R.W. Digestive enzymes of larvae of three species of caddisflies (TRICHOPTERA). Insect Biochem. 11(5), 501-505 (1981).
- MARTIN, M.M., KUKOR, J.J., MARTINS, J.S. & MERRIT, R.W. The digestive enzymes of larvae of the black fly, Prosimulium fuscum (DIPTERA:SIMULIIDAE). Comp. Biochem. Physiol. 82B(1), 37-39 (1985).

- McFARLANE, J.A. & WEARING, A.J.S. A means of differentiating between Acanthoscelides obtectus (S.) and Zabrotes subfasciatus (B.) (COLEOPTERA:BRUCHIDAE) in white haricot beans at the pupal stage. J. Stored Prod. Res. 3, 261-262 (1967).
- MEIK, J. & DOBIE, P. The ability of Zabrotes subfasciatus to attack cowpeas. Entomol. Exp. Appl. 42, 151-158 (1986).
- MILLER, J.W., KRAMER, K.J. & LAW, J.H. Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, Manduca sexta (J.) (LEPIDOPTERA:SPHINGIDAE). Comp. Biochem. Physiol. 48B, 117-129 (1974).
- MOONEY, H.R., GULMON, S.R. and JOHNSON, N.D. Physiological constraints on plant chemical defenses. In "Plant Resistance to Insects", pp. 21-36, P.A. Hedin, ed. ACS Symposium Series 208 (1983).
- MUNDY, J., SVENDSEN, I. & HEJGAARD, J. Barley alpha-amylase subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. Calsberg Res. Commun. 48, 81-90 (1983).
- MUNDY, J., HEJGAARD, J. & SVENDSEN, I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous alpha-amylase and subtilisin. FEBS Letters 167(2), 210-214 (1984).
- PIMBERT, M.P. Reproduction and oviposition preferences of Zabrotes subfasciatus stocks reared from two host plant species. Entomol. Exp. Appl. 38, 273-276 (1985).
- PODOLER, H. & APPLEBAUM, S.W. The alpha-amylase of the beetle Callosobruchus chinensis. Purification and action pattern. Biochem. J. 121, 317-320 (1971a).
- PODOLER, H. & APPLEBAUM, S.W. The amylase of the beetle Callosobruchus chinensis. Properties. Biochem. J. 121, 321-326 (1971b).
- POWERS, J.R. & CULBERTSON, J.D. In vitro effect of bean amylase inhibitor on insect amylases. J. Food Protection 45(7), 655-657 (1982).
- POWERS, J.R. & CULBERTSON, J.D. Interaction of a purified bean (Phaseolus vulgaris) glycoprotein with an insect amylase. Cereal Chem. 60(6), 427-429 (1983).

- PRITCHETT, D.W., YOUNG, S.Y & GEREN, C.R. Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of Trichoplusia ni. Insect Biochem. 11(5), 523-526 (1981).
- PUSZTAI, A. Trypsin inhibitors of plant origin; their chemistry and potential role in animal nutrition. nutr. Abstr. Rev. 37(1), 1-9 (1967).
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plant and microorganisms. Phytochem. 16, 159-169 (1977).
- RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. Food Chem. 6, 235-253 (1980).
- RICHARDSON, M., VALDES-RODRIGUEZ, S. and BLANCO-LABRA, A. A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. Nature 6121(327), 432-433 (1987).
- ROBYT, J.F. & WHELAN, W.J. The β -amylases in "Starch and its Derivates", chap. 15, pp. 477-497, J.A. Radley, Ed. Chapman and Hall Ltd., London. (1973).
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 373-396 (1973).
- RYAN, C.A., BISHOP, P.D., GRAHAM, J.S., BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. Plant and fungal cell wall fragments activate expression of proteinase inhibitor genes for plant defense. J. Chem. Ecol 12(5), 1025-1036 (1986).
- SALMIA, A.A. & MIKOLA, J.J. Inhibitors of endogenous proteinases in the seeds of scot pine, Pinus silvestris. Physiol. Plant 48, 126-130 (1980).
- SANCHEZ-MONGE, R., GOMES, L., GARCIA-OLMEDO, F. & SALCEDO, G. A tetrameric inhibitor of insect alpha-amylase from barley. FEBS Letters 207(1), 105-109 (1986).
- SASAKI, T. & SUZUKI, Y. Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, Bombyx mori. Biochem. Bioph. Acta 703, 1-10 (1982).
- SASAKI, T., MORISHITA, M. & ISE, M. Cleavage site specificities of silkworm alkaline proteases. Agric. Biol. Chem. 49(9), 2707-2710 (1985).

- SHARMA, B.R., MARTIN, M.M. and SHAFER, J.A. Alkaline proteases from the gut fluids of detritus-feeding larval of the crane fly, Tipula abdominalis (Say) (DIPTERA: TRIPULIDAE). Insect Biochem. 14(1), 37-44 (1984).
- SHILDES, R. Towards insect-resistance plants. Nature 328(6125), 12-13 (1987).
- SHUCKLE, R.H. & MURDOCK, L.L. Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybean: effects on larval growth of Manduca sexta (LEPIDOPTERA:SPHINGINAE). Env. Entom. 12(3), 787-791 (1983).
- STOREY, R.D. & WAGNER, F.W. Plant proteases: a need for uniformity. Phytochem. 25(12), 2701-2709 (1986).
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. & De BIACHI, A.G. Action pattern, kinetical properties and eletrophoretical studies on an alpha-amylase present in midgut homogenates from Rhyncosciara americana (DIPTERA) larval. Comp. Biochem. Physiol. 56B, 201-209 (1977).
- THORNBURG, R.W., AN. G., CLEVELAND, T.E., JOHNSON, R. & RYAN, C.A. Wound-inducible expression of a potato inhibitor II-chloranphenicol acetyltransferase gene fusion in transgenic tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84, 744-748 February (1987).
- VAECK, M. REYNAERTS, A., HOFTE, H., JANSSENS, S., BEUKELEER, M. De, DEAN, C., ZABEAN, M., MONTAGU, M.V. and LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 327(6125), 33-37 (1987).
- VAJE, S., MOSSAKIVSKI, D. & GABEL, D. Temporal, intra and interspecific variaiton of proteolytic enzymes in Carabid-beetles. Insect Biochem. 14(3), 313-320 (1984).
- VATS, L.K. Alimentary canal in bruchid larvae (BRUCHIDAE: COLEOPTERA). Res. Bull. of the Paniab University 27, parts I-II, 103-106, June (1973).
- WARCHALEWSKI, J.R. Present-day studies on cereals protein nature alpha-amylase inhibitors. Die Nahrung 27, 103-117 (1983).

- WARD, C.W. Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Aust. J. Sci. 28, 1-23 (1975).
- WEBB, K.J. Transformation of forage legumes using Agrobacterium tumefaciens. Theor. Appl. Genet. 72, 53-58 (1986).
- WEBER, M., DARZENS, D., COULOMBEL, C., FOGLIETTI, J.J. & CHARACAS, C. Purification and some properties of two amylases from Phoracantha semipunctata larval. Comp. Bioch. Physiol., 80B, 57-60 (1985).
- WESELAKE, R.J., MacGREGOR, A.W. & HILL, R.D. Endogenous alpha-amylase inhibitor in various cereal. Cereal Chem. 62(2), 120-123 (1985).
- WIEMAN, K.F. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from the common bean beetle, Acanthoscelides obtectus. A thesis submitted to the Faculty of Purdue University in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science. (1986).
- WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology, Seventh edition, 476-552, Chapman and Hall, New York (1972).
- WOLFSON, J.L. & MURDOCK, L.L. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomol. Exp. Appl. 44, 235-240 (1987).
- XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Inibidores de enzimas proteolíticas em plantas. Arq. Biol. Tecnol. 27(3), 407-418 (1984).
- XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Proteinase inhibitors, in "Toxicants of Plant Origin", Vol. 3, Chap. I, P.R. Cheeke, Ed. CRC Press, Inc., Florida, no prelo.
- XAVIER-FILHO, J. & COELHO, A.N. Acid proteinases of Callosobruchus maculatus and proteinase inhibitors of Vigna unguiculata. Abstract from the Ann. mtg. of The American Soc. Plant Physiol. and Phytochem. Society of North America Plant Physiol. 65, 138 (1980).

YARDLEY, D.G., MOUSSATOS, V.V. & MARTINS, M.P. The amylase system of Drosophila. II Effects of development and diet on amylase activity in Drosophila pseudoobscura. Insect Biochem. 13(5), 543-548 (1983).

YARDLEY, D.G. & MARTINS, M.P. The amylase system of Drosophila. I. Comparisons of the amylases in Drosophila pseudoobscura. Comp. Biochem. Physiol. 73B, 243-249 (1982).