

COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE PROTEINASES ASPÁRTICAS E CISTEÍNICAS NOS INTESTINOS-MÉDIOS DAS LARVAS DE *Callosobruchus maculatus* E *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA : BRUCHIDAE).


CARLOS PERES SILVA

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 - 1990


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.

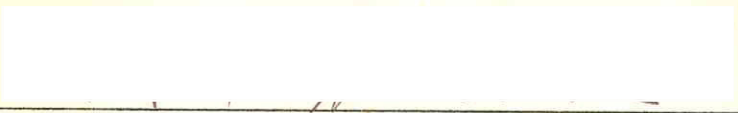

Carlos Peres Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

26/01/90


José Xavier Filho


Iracema Lima Ainouz


José Tadeu Abreu de Oliveira

A meus filhos

Marcel, Tanara e Léo

AGRADECIMENTOS

Quero expressar aqui a minha gratidão ao Professor José Xavier Filho, pelos ensinamentos e pelo seu grande exemplo de profissionalismo, que para sempre farão parte da minha bagagem profissional.

Da mesma forma agradeço aos Professores Iracema Lima Ainouz e José Tadeu Abreu de Oliveira, pela valiosa ajuda que me prestaram na realização deste trabalho.

Sou especialmente grato à Professora Maria da Guia Silva Lima, pelo apoio e incentivo em momentos muito importantes da minha carreira.

Finalmente, agradeço a todos os demais Professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo incentivo, 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

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xii
<u>RESUMO</u>	xiv
<u>ABSTRACT</u>	xvi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	19
3 - <u>MÉTODOS</u>	20
3.1 - <u>Criação dos Insetos</u>	20
3.2 - <u>Preparação dos Homogenatos Intestinais das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus</u>	20
3.2.1 - <u>Dissecação das Larvas dos Insetos</u>	20
3.2.2 - <u>Extração dos Intestinos-médios</u>	21
3.3 - <u>Preparação do Extrato de Farinha de Sementes de V. unguiculata cv. Pitiúba</u>	21
3.3.1 - <u>Preparação da Farinha</u>	21
3.3.2 - <u>Preparação do Extrato</u>	21
3.4 - <u>Preparação das Soluções usadas como Substratos</u> .	22
3.4.1 - <u>Azocaseína 1,5%</u>	22
3.4.2 - <u>Hemoglobina 1%</u>	22
3.5 - <u>Determinação das Atividades Enzimáticas</u>	23
3.5.1 - <u>Atividade Azocaseinásica</u>	23
3.5.2 - <u>Atividade Hemoglobinásica</u>	24
3.6 - <u>Determinação de Proteína</u>	25
3.7 - <u>Avaliação do Efeito do pH sobre a Atividade Hemoglobinásica de IMs de Larvas de C. maculatus</u> .	25
3.8 - <u>Isolamento e Caracterização Parcial de Uma Proteínase Aspártica Presente no IM das Larvas de C. maculatus</u>	25

3.8.1 - Isolamento através de Cromatografia de Exlu- são Molecular seguida por Cromatografia de Tro- ca Iônica	25
3.8.2 - Caracterização Parcial das Frações Contendo Proteinases Aspárticas	27
3.9 - <u>Comparação das Atividades Hemoglobínica e Azo- caseínica entre Homogenatos Intestinais das</u> <u>Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus</u>	28
3.10 - <u>Quantificação das Proteinases Aspárticas e Cis- teínicas dos Intestinos-médios das Larvas de</u> <u>C. maculatus e Z. subfasciatus e de Extrato de</u> <u>Farinha das Sementes de V. unguiculata cv. Pi- tiúba</u>	28
3.11 - <u>Distribuição das Atividades Hemoglobínica e</u> <u>Azocaseínica ao Longo dos Intestinos-médios</u> <u>das Larvas de C. maculatus e Z. subgasciatus</u> ..	29
3.12 - <u>Determinação do pH ao longo dos Intestinos-mé- dios das Larvas de C. maculatus e Z. subfascia- tus</u>	29
4 - <u>RESULTADOS</u>	30
4.1 - <u>Isolamento e Caracterização Parcial de uma Pro- teínase Aspártica do Intestino-médio das Larvas</u> <u>de C. maculatus</u>	30
4.2 - <u>Comparação das Atividades Hemoglobínica e Azo- caseínica entre Homogenatos Intestinais das</u> <u>Larvas de C. maculatus e Z. subfasciaus</u>	38
4.3 - <u>Quantificação das Proteinases Aspárticas e Cis- teínicas Digestivas das Larvas de C. maculatus e</u> <u>Z. subfasciatus e do Extrato Bruto das Sementes</u> <u>da Cultivar Pitiúba</u>	45
4.4 - <u>Distribuição das Atividades Hemoglobínica e</u> <u>Azocaseínica ao longo dos Intestinos-médios das</u> <u>Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus</u>	45
4.5 - <u>Medida do pH ao longo dos Intestinos-médios das</u> <u>Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus</u>	52
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	55
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	64
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	65

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>Página</u>
1	Cromatografia em Sephadex G-75 do homogenato intestinal das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u>	31
2	Cromatografias em Sephadex G-75 de homogenatos intestinais das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> - ação de pepstatina e de E-64	32
3	Cromatografia em CM-Sépharose da fração com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina obtida da Sephadex G-75 (fração SA, FIGURA 2)	34
4	Efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica de homogenato intestinal das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e da fração CA	39
5	Cromatografia em Sephadex G-75 do homogenato intestinal das larvas de <u>C. maculatus</u>	40
6	Cromatografia em CM-Sépharose da fração com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina obtida a partir da Sephadex G-75 (fração SB, FIGURA 5)	41
7	Cromatografia em Sephadex G-75 da fração com atividade hemoglobínica obtida a partir da CM-Sépharose a pH 6,0	42
8	Comparação entre as curvas de atividade hemoglobínica de homogenatos intestinais das larvas de <u>C. maculatus</u> e <u>Z. subfasciatus</u>	44

FIGURA

Página

9	Comparação entre as curvas de atividade azocaseinásica de homogenatos intestinais das larvas de <u>C. maculatus</u>	46
10	Titulação da atividade azocaseinásica de homogenato intestinal das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> com E-64	48
11	Titulação da atividade hemoglobínásica de homogenato intestinal das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e de <u>Zabrotes subfasciatus</u>	49
12	Titulação da atividade hemoglobínásica de extrato bruto da farinha da cultivar Pitiúba com pepstatina	50

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA</u>		<u>Página</u>
1	Etapas da purificação da atividade hemoglobínica do homogenato intestinal de larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> por filtração em Sephadex G-75 seguida por troca iônica em CM-Sepharose a pH 3,5	35
2	Efeitos de alguns inibidores de enzimas proteolíticas sobre a atividade hemoglobínica da fração CA	36
3	Percentagem da hidrólise de hemoglobina comparada à hidrólise de albumina sérica bovina por pepsina e pela fração CA	37
4	Etapas da purificação da atividade hemoglobínica do homogenato intestinal de larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> por filtração em Sephadex G-75 seguida por troca iônica em CM-Sepharose e repasse na coluna de Sephadex G-75	43
5	Comparação entre as atividades hemoglobínica e azocaseínica específicas de homogenatos intestinais das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e <u>Zabrotes subfasciatus</u> e de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. Pitíuba	47

TABELA

Página

6	Comparação das atividades proteínásicas sensíveis a pepstatina ou a E-64 por miligrama de peso seco de intestinos-médios das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e <u>Zabrotes subfasciatus</u> e de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> cv. Pitiúba	51
7	Distribuição das atividades hemoglobínásica e azocaseínásica nos intestinos-médios das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e <u>Zabrotes subfasciatus</u>	53
8	Determinação de pH ao longo dos intestinos-médios das larvas de <u>Callosobruchus maculatus</u> e <u>Zabrotes subfasciatus</u>	54

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

- AIA - Ácido iodoacético
- CA - Fração proteínásica sensível a pepstatina obtida de CM-Sepharose a pH 3,5
- CB - Fração proteínásica sensível a pepstatina obtida de CM-Sepharose a pH 6,0
- CM - Carboximetil
- DAN - Diazoacetilnorleucilmetil éster
- DTT - Ditionitrosol
- EB - Extrato bruto
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- ESpep - Enzima sensível a pepstatina
- ESE-64 - Enzima sensível a E-64
- E-64 - L-trans-epoxisuccinil-leucil-amida (4-guanidino)butano
- HI - Homogenato intestinal
- IM - Intestino-médio
- NEM - N-etilmaleimida
- PAPA - Para-aminofenilalanina
- pCMB - Ácido para-cloromercuriobenzóico
- PMCS - Ácido para-cloromercuriófenil sulfônico
- pMSF - Fenilmetilsulfonil fluoreto
- PS - Peso seco
- SA - Fração proteínásica sensível a pepstatina obtida de Sephadex G-75 a pH 3,5
- SB - Fração proteínásica sensível a pepstatina obtida de Sephadex G-75 a pH 6,0
- SC - Fração proteínásica sensível a pepstatina obtida de Sephadex G-75 a pH 6,0 após cromatografia em CM-Sepharose a pH 6,0 e repasse na coluna de Sephadex G-75
- TCA - Ácido tricloroacético
- TLCK - Tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK - Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
UA - Unidade de atividade
UAAC - Unidade de atividade azocaseinásica
UAHb - Unidade de atividade hemoglobínásica
UDO - Unidade de densidade óptica

RESUMO

Uma proteinase aspártica com características semelhantes às de catepsina D, como alta reatividade contra hemoglobina em comparação à albumina sérica bovina e um pH ótimo de hidrólise de hemoglobina igual a 3,3, foi isolada a partir de homogenatos intestinais das larvas de Callosobruchus maculatus através de cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 seguida por cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose. Ficou demonstrado que logo no passo de filtração em gel as proteinases aspárticas foram parcialmente separadas das proteinases cisteínicas que também estão presentes no intestino-médio das larvas de C. maculatus (KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS et al., 1989). O peso molecular da proteinase aspártica isolada foi estimada através de filtração em gel como sendo de 62.000D, embora tenham sido observadas evidências de complexação da enzima com proteínas ou peptídeos inativos.

Os níveis de proteinases aspárticas e cisteínicas digestivas das larvas de C. maculatus e de Zabrotes subfasciatus diferiram consideravelmente. As larvas de Z. subfasciatus apresentaram 4,4 vezes mais proteinases sensíveis a pepstatina e 2,1 vezes mais proteinases sensíveis a E-64 do que as larvas de C. maculatus. Estes resultados estão de acordo com as atividades hemoglobínica e azocaseínica específicas, pois as larvas de Z. subfasciatus apresentaram 3,8 vezes mais atividade hemoglobínica e 1,7 vezes mais atividade azocaseínica do que as larvas de C. maculatus.

A distribuição das atividades hemoglobínica e azocaseínica não se mostrou uniforme ao longo dos intestinos-médios das larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus, sendo ambas as atividades mais altas na região média dos intestinos-médios das larvas dos dois carunchos. Os valores de pH também variam ao longo dos intestinos-médios larvais, sendo

a região média a mais ácida, a região proximal a mais alcalina e a região distal com valores intermediários de pH em relação às outras duas regiões.

ABSTRACT

An aspartic proteinase with characteristics similar to cathepsin D, with higher activity against hemoglobin in comparison to bovine serum albumin and maximal hydrolysis of hemoglobin at pH 3.3, was isolated from midgut homogenates of larvae of Callosobruchus maculatus through gel filtration on Sephadex G-75 followed by ion exchange chromatography on CM-Sepharose. It was demonstrated that the aspartic proteinase was partially separated from the cysteine proteinases, which were known to be present in the larval midgut of C. maculatus (KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS et al., 1989), in the first step of purification, e.g., the gel filtration step. The molecular weight of the aspartic proteinase was estimated by gel filtration as being 62.000D although some evidence of complex formation between the enzyme and inactive proteins or peptides was observed.

The levels of digestive aspartic and cysteine proteinases in larvae of C. maculatus and Zabrotes subfasciatus differed significantly. Larvae of Z. subfasciatus contained 4.4 times more pepstatin-sensitive proteinases and 2.1 times more E-64 sensitive proteinases than larvae of C. maculatus. These results are in accord with the hemoglobinolytic and azocaseinolytic specific activities, as the larvae of Z. subfasciatus showed 3.8 times more hemoglobin hydrolysing activity and 1.7 times more azocasein hydrolysing activity than larvae of C. maculatus.

The distribution of the hemoglobin and azocasein hydrolysing activities along the larval midguts of C. maculatus and Z. subfasciatus was not uniform, both the activities are highest in the middle region of the larval midguts of the two insects. The pH values also differed along the larval midguts; the middle region of the midguts was the most acidic, the proximal region was the most alkaline and the distal region had intermediary values in relation to the other two regions.

1 - INTRODUÇÃO

Estima-se que na virada do século haverá cerca de 6 bilhões de habitantes no planeta, e para que seja mantido o mesmo nível de nutrição dos dias de hoje será necessário duplicar o suprimento de proteínas vegetais e quadruplicar a oferta de proteínas de origem animal (GATEHOUSE, 1984). Se considerarmos que esse aumento na oferta de proteínas de origem animal será muito difícil de ser alcançado, principalmente nos países do Terceiro Mundo, então é de se esperar que as proteínas de origem vegetal venham desempenhar um papel ainda mais importante que atualmente, participando com bem mais freqüência na composição das dietas de seres humanos.

Nesse contexto destaca-se uma das maiores famílias de fanerógamas, a família Leguminosae, uma das mais importantes sob o ponto de vista econômico por prover um grande número de espécies úteis ao homem, seja como forrageiras, para fins industriais ou para o consumo de suas sementes como alimento (HEYWOOD, 1971).

Em termos de teor em proteínas, os grãos de leguminosas representam uma fonte de inestimável valor, contendo de 20 a 25% dos seus pesos secos na forma desse nutriente (GATEHOUSE, 1984). As proteínas das sementes de leguminosas, entretanto, são consideradas de qualidade nutricional inferior às proteínas de origem animal (SALES & RODRIGUEZ, 1988). Em conjunto elas são deficientes nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (GATEHOUSE, 1984; SALES & RODRIGUEZ, 1988) e apesar de suas globulinas de reserva representarem uma rica fonte de proteínas dietéticas, as sementes apresentam também algumas proteínas consideradas fatores antinutricionais, como, por exemplo, as lectinas, os inibidores de proteinases e as proteínas alergênicas (GATEHOUSE, 1984; XAVIER-FILHO & VENTURA, 1988; PUSZTAI, 1989). A combinação com cereais e o tratamento térmico eliminam, porém, estas desvantagens resul

tando em dietas com alto valor nutricional (SALES & RODRIGUEZ, 1988).

O consumo dos grãos de leguminosas, no entanto, é restringido em virtude das perdas provocadas por coleópteros pertencentes à família Bruchidae (SOUTHGATE, 1979). Além do homem, só os bruquídeos conseguem explorar as sementes de leguminosas extensivamente, contrastando com a maior parte dos grupos animais que se utilizam de proteinases serínicas para digerir as proteínas de suas dietas, como as aves, os mamíferos e os próprios insetos (NIELSEN, 1988).

O homem suplantou os efeitos tóxicos das proteínas de legumes através da cocção comum, de modo que suas proteinases digestivas agem sobre as proteínas já desnaturadas. Com respeito aos bruquídeos, no entanto, a maneira como estes insetos digerem as proteínas em estado nativo e como conseguem suplantá-las os efeitos das proteínas potencialmente tóxicas das suas sementes hospedeiras ainda não está totalmente esclarecida. Na literatura encontram-se alguns resultados discrepantes em relação à capacidade dos bruquídeos em lidar com certas proteínas potencialmente tóxicas de legumes, e há também algumas discrepâncias com respeito à presença e aos tipos de proteinases digestivas utilizadas pelos bruquídeos.

O estudo das proteinases digestivas de bruquídeos além de ter um grande interesse do ponto de vista da fisiologia comparada, como, por exemplo, a comparação destas enzimas com as proteinases utilizadas na mobilização das proteínas das sementes durante a germinação, e a própria digestão das proteínas das sementes de leguminosas por proteinases de mamíferos, é interessante também sob a perspectiva de revelar um alvo vulnerável na fisiologia destes insetos que poderá orientar programas de melhoramento genético visando a produção de grãos resistentes ao ataque de bruquídeos, ou, por outro lado, fornecer informações que levem ao entendimento dos mecanismos de resistência observados em algumas cultivares de espécies agrônômicas, onde acredita-se que há o envolvimento de proteínas tóxicas.

1.1 - O Feijão-de-corda e sua Importância Social e Econômica

O feijão-de-corda, Vigna unguiculata (L.) Walp., também chamado de feijão macassar ou caupi, é uma leguminosa comestível dotada de alta rusticidade e que se adaptou bem às condições brasileiras de clima e de solo. É cultivado principalmente por pequenos agricultores para a produção de grãos, tratando-se de um alimento básico para as populações pobres das regiões Norte e Nordeste do Brasil, bem como em regiões de outros países localizados nos trópicos e subtropicais, especialmente no Sudeste dos Estados Unidos e Oeste e Centro da África (SINGH & RACHIE, 1985). A Nigéria, o Brasil e o Níger são os maiores produtores, respondendo por mais de 70% da produção mundial dessa cultura (JACKAI & DAOUST, 1986), enquanto no Brasil o estado do Ceará é o maior produtor (FREIRE-FILHO, 1988).

O feijão-de-corda tem um elevado valor nutricional, representando a principal e mais barata fonte de proteína (cerca de 24%) para as populações de baixa renda do Norte e Nordeste brasileiros, principalmente nas zonas rurais. Além de proteínas, o feijão-de-corda também é uma boa fonte de carboidratos (cerca de 55%), de cálcio (cerca de 80mg/100g), de fósforo (cerca de 500mg/100g) e de ferro (de 3,04 a 7,83mg/100g) (SALES & RODRIGUEZ, 1988). O consumo diário do feijão-de-corda faz parte dos hábitos alimentares do povo nordestino, principalmente no interior, enquanto nas outras regiões do país, o feijão mulatinho, Phaseolus vulgaris, é o mais consumido (SALES & RODRIGUEZ, 1988). Alguns autores sugerem que o feijão-de-corda possui propriedades nutricionais superiores às do feijão mulatinho (TEIXEIRA et al., 1988; SALES & RODRIGUEZ, 1988).

A espécie Vigna unguiculata originou-se nas regiões de savana do Centro ou, mais provavelmente, do Oeste da África (NG & MARÉCHAL, 1985) e da mesma forma que outras culturas que se expandiram a partir do seu ponto de origem, através da domesticação e cultivo pelo homem, essa espécie tornou-se sujeita ao ataque por uma infinidade de insetos (JACKAI

& DAOUST, 1986). Apesar da importância social e do potencial econômico que representa, a cultura do feijão-de-corda apresenta ainda baixos rendimentos médios. Além da maneira pouco eficiente com a qual vem sendo explorada, principalmente como cultura de subsistência, os ataques de insetos que assolam o feijão-de-corda em todos os estágios do seu ciclo biológico contribuem consideravelmente para o abaixamento da produtividade da cultura, como evidenciado pela observação de que ocorre aumentos drásticos na produção quando são feitas aplicações de inseticidas (WARUI, 1984; JACKAI & DAOUST, 1986). Não bastassem as perdas no campo devidas aos ataques de insetos às plantas e aos frutos, a cultura do feijão-de-corda ainda está destinada a sofrer enormes danos causados pela infestação dos grãos já desenvolvidos e estocados por uma série de bruquídeos.

1.2 - Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus, os Principais Predadores dos Grãos Armazenados de Vigna unguiculata

A infestação das vagens e sementes do feijão-de-corda pode começar no campo e eventualmente continuar durante a estocagem dos grãos, dependendo da espécie de bruquídeo. A infestação em condições de campo é comparativamente muito menor do que a observada quando os grãos estão estocados, isto porque a infestação no campo é feita predominantemente por espécies selvagens de bruquídeos que não se adaptam muito bem às condições impostas pela armazenagem dos grãos, e por isso, raramente conseguem prolongar a infestação através de gerações sucessivas (PREVETT, 1961; BOOKER, 1967; WARUI, 1984).

Ao contrário das espécies "de campo" que não são capazes de causar grandes danos aos grãos estocados, as espécies Z. subfasciatus, e principalmente C. maculatus se destacam como bruquídeos que apresentam através de muitos aspectos de sua biologia uma adaptação impressionante para infestar e consumir os grãos de V. unguiculata, quando estes

se encontram secos e estocados, embora ambas as espécies sejam hábeis para infestar os seus hospedeiros no campo.

De longe C. maculatus é a mais importante peste dos grãos armazenados de V. unguiculata. Essa espécie de bruquídeo ocorre onde quer que a cultura do feijão-de-corda seja explorado e freqüentemente infesta de 50 a 100% dos grãos entre 3 e 5 meses sob condições ordinárias de estocagem (JACKAI & DAOUST, 1984; SANTOS et al., 1988). Somente na Nigéria, onde os estragos causados por C. maculatus em grãos de V. unguiculata foram estudados em mercados por um período de oito anos, ficou estimado que as perdas chegavam a 30.000 toneladas anuais (JACKAI & DAOUST, 1986). As perdas econômicas devidas à redução na qualidade do grão e no potencial de germinação das sementes se tornam ainda mais importantes que a mera perda em termos de massa. Os grãos com evidências de infestação são geralmente mal aceitos pelos consumidores, o que leva a uma redução considerável no seu valor comercial, como confirmado por uma avaliação feita no Ceará, onde ficou demonstrado que para um índice de 5% de injúria devida à infestação por C. maculatus, correspondeu a uma redução de 53% no valor comercial do produto (BASTOS, 1973). A redução do potencial de germinação das sementes de V. unguiculata está diretamente relacionada ao grau de infestação pelo caruncho, chegando a 100% em sementes com mais de 4 furos indicativos da emergência de adultos do inseto (SOUTHGATE, 1979; SANTOS et al., 1988).

Callosobruhcus maculatus apresenta dimorfismo no estágio imaginal, as chamadas forma "ativa", dispersante, e forma "normal", sedentária. Essas duas formas diferem não só nos seus caracteres morfológicos, os quais são usados para identificá-las, mas também nas suas características fisiológicas e comportamentais (SANO-FUJII, 1984). A forma ativa está adaptada à dispersão e a viver em condições de campo, enquanto a forma normal está bem adaptada à sua função de consumir grãos estocados (SANTOS, 1971; SOUTHGATE, 1979; SANO-FUJII, 1984, 1986).

A infestação de V. unguiculata no campo pode ocorrer

por ambas as formas. Embora o grau de infestação seja geralmente pequeno em safras recém-colhidas, a alta fecundidade e o curto tempo de cada geração da forma normal levam a um rápido aumento da população dos insetos e dos estragos que eles causam (JACKAI & DAoust, 1986). A forma ativa é rara, só desenvolvendo-se em condições especiais, enquanto a forma normal ou sedentária é a forma comum, que se alastra com muita facilidade. É a forma normal a responsável direta pelos graves danos nos grãos armazenados, e será em relação a esta forma que vou sempre me referir de agora em diante pelo nome específico de Callosobruchus maculatus simplesmente.

A espécie Callosobruchus maculatus foi descrita pela primeira vez em 1775 por Fabricius, sob o nome específico de Bruchus quadrimaculatus, e na ocasião o autor atribuiu sua origem ao continente americano, hoje porém, C. maculatus é considerado como originário do Velho Mundo, provavelmente da África (DOMENICHINI, 1951).

Os adultos de C. maculatus medem aproximadamente 3mm de comprimento; a cor básica dos élitros varia de testáceo a preto com três manchas escuras bem definidas; a cor do pigídeo da fêmea varia de marrom a preto, com uma fina linha de pubescência seguindo a linha central (SANTOS, 1971). O ciclo biológico da espécie segue os mesmos passos básicos dos outros bruquídeos. A fêmea deposita os ovos individualmente sobre a superfície das sementes, ou mais raramente nas vagens (DICK & CREDLAND, 1984; MESSINA, 1984). A larva quando eclode penetra através do tegumento e alcança o cotilédone, no interior do qual ela irá se desenvolver ao longo de mais três instares larvais, sempre escavando um túnel até alcançar o instar característico de pré-pupa e depois o de pupa. Antes de passar a pré-pupa a larva do 4º instar erode a superfície interna do tegumento preparando a janela pupal de forma circular através da qual o adulto emergirá com facilidade (DOMENICHINI, 1951; HOWE & CURRIE, 1964). A copulação pode ocorrer dentro de poucos minutos após a emergência e a fêmea fecundada pode ovipositar dentro de uma hora (CREDLAND, 1987). Os adultos não possuem aparelho bucal funcional e normalmen-

te não vivem muito, tendo como principal função a cópula e a postura dos ovos (REDDEN et al., 1983). A duração dos ínstarres pré-imaginais varia de acordo com as condições físicas do ambiente, do substrato e das raças geográficas da espécie (HOWE & CURRIE, 1954; DICK & CREDLAND, 1984). Em caso de sementes suscetíveis de V. unguiculata a emergência pode ocorrer por volta de 30 dias após a oviposição. A temperatura ótima para o desenvolvimento de C. maculatus está próxima a 30°C, e segundo DICK & CREDLAND (1984) outros fatores, tal como umidade, são de menor importância, desde que não estejam nos seus extremos.

Como uma espécie predadora de grãos C. maculatus foi e continua sendo transportado através do comércio para diversas regiões do mundo, resultando numa distribuição muito extensa e descontínua. Nestas condições era de se esperar que a espécie desenvolvesse populações adaptadas às condições locais com ótimos e limites de tolerância ajustados às diferentes condições encontradas, dando origem às chamadas raças geográficas ou ecótipos (ODUM, 1985). Apesar do grande número de trabalhos feitos sobre facetas da biologia de C. maculatus, a desconsideração da variabilidade que a espécie apresenta levou a resultados ambíguos ou divergentes sobre um único aspecto ou parâmetro de sua biologia (DICK & CREDLAND, 1984). As diferenças em aspectos importantes da biologia entre raças às vezes são tão significativas, que se torna inconveniente referir C. maculatus como uma espécie uniforme, o mais apropriado sendo sempre mencionar a origem da colônia com a qual se está pesquisando (CREDLAND, 1986).

A importância de se considerar as diferenças entre raças geográficas de C. maculatus foi posta em evidência com os resultados de REDDEN et al. (1983), DICK & CREDLAND (1984, 1986 a,b), CREDLAND (1986, 1987), CREDLAND et al. (1986) e CREDLAND & DICK (1987). Estes autores trabalharam com populações coletadas em áreas geográficas bastante distanciadas, e que foram referidas como "Campinas", coletada em sementes de V. unguiculata no Brasil, "Yemen", coletada a partir de sementes de Lens esculenta na República Árabe do Yemen e "IITA",

obtida de colônias mantidas sobre sementes de V. unguiculata no Instituto Internacional de Agricultura Tropical, na Nigéria (REDDEN et al., 1983; DICK & CREDLAND, 1984).

As três raças diferiram em características bionômicas básicas como o período de desenvolvimento e a produção de ovos. Enquanto as fêmeas das raças do Yemen e do Brasil apresentaram uma postura média de 40 ovos, quando confinadas sobre uma única semente de V. unguiculata, a raça nigeriana foi capaz de pôr uma média de 75 ovos nas mesmas condições (DICK & CREDLAND, 1984). Em termos de produção de adultos a raça "Yemen" se mostrou muito inferior às outras duas raças, apresentando também o mais longo período de desenvolvimento, o que foi relacionado ao fato dos adultos desta raça apresentarem mais do dobro do peso fresco das outras duas raças, e suas larvas consumirem cerca de duas a três vezes mais conteúdo da semente (DICK & CREDLAND, 1984; CREDLAND & DICK, 1987).

Trabalhando com as raças "IITA" e "Campinas", REDDEN et al. (1983) mostraram que estas duas raças diferiam quanto a sua capacidade de se desenvolver em sementes de uma cultivar resistente obtida na nigéria, a cultivar TVu 2027. Enquanto a raça nigeriana apresentou um índice de sobrevivência nas sementes de TVu 2027, a raça brasileira foi bem mais afetada, apresentando somente 11% de sobrevivência. Posteriormente DICK & CREDLAND (1986a), utilizando além dessas duas raças, a raça proveniente do Yemen, mostraram que as três raças diferiam entre si quanto aos parâmetros medidos relacionados à antibiose associada às sementes de TVu 2027. A raça "Campinas" teve um índice de sobrevivência de 9.3%, um índice bem abaixo daqueles apresentados pelas outras raças, que não diferiram significativamente entre si (63% para a raça "Yemen" e 70,8% para a raça "IITA").

Além da espécie V. unguiculata, que é considerada a hospedeira primária de C. maculatus, há vários registros na literatura de outras espécies de legumes que são infestadas e nas quais as larvas desse bruquídeo conseguem se desenvolver. Na maioria das vezes trata-se de legumes que foram domesticados e são hoje cultivados e estocados pelo homem.

JANZEN (1977) compilou um número em torno de 35 espécies de leguminosas onde as larvas de C. maculatus conseguem se desenvolver, embora o próprio JANZEN (1977) tenha considerado esse número como superestimado em virtude de registros equivocados que ocorreram no passado. WASSERMAN (1986) cita que pelo menos 13 espécies de leguminosas, distribuídas em 9 gêneros pertencentes às tribos Vicieae e Phaseoleae, são atacadas por C. maculatus.

Vários estudos foram feitos comparando-se o desenvolvimento de C. maculatus em seu hospedeiro primário e em espécies que são utilizadas como hospedeiros secundários, e até espécies selvagens foram testadas em laboratório para investigação da capacidade de C. maculatus em suportar a mudança de hospedeiro. HOWE & CURRIE (1964), por exemplo, compararam o desenvolvimento de C. maculatus em dez leguminosas cultivadas e concluíram que em somente duas espécies, vigna radiata (= Phaseolus aureus) e V. mungo (= Phaseolus mungo), o bruquídeo se desenvolveu dentro de parâmetros comparáveis aos de diversas variedades de V. unguiculata usadas. BOOKER (1967) cita que de 5 espécies, além de V. unguiculata, nas quais C. maculatus era criado no laboratório de Samaru, apenas uma, V. radiata, se mostrou como dieta satisfatória. Nas demais espécies ocorria extensão do período de desenvolvimento e uma alta mortalidade larval. CHANDRAKANTHA & MATHAVAN (1986) estudaram o desempenho em termos de velocidade de desenvolvimento e aumento em biomassa de C. maculatus infestando sementes de V. unguiculata, V. radiata e Dolichos lablab. Esses autores mostraram que o tempo de desenvolvimento do inseto em sementes de V. unguiculata e V. radiata não diferiu significativamente, porém o peso final de C. maculatus em sementes de V. unguiculata foi 62% maior do que o alcançado em sementes de V. radiata, enquanto nas sementes de D. lablab o tempo de desenvolvimento foi dobrado e o aumento em biomassa foi bem menor do que nas duas espécies de Vigna.

Um estudo dos efeitos da mudança de hospedeiro em diferentes raças de C. maculatus foi feito por CREDLAND (1987). Ele usou uma raça oriunda da Turquia que foi coletada e man-

tida sempre em sementes de Lens esculenta, e comparou o desenvolvimento dela com a raça "Campinas" ao longo de nove gerações, tanto em sementes de L. esculenta como em sementes de V. unguiculata. Foi observado que apesar da raça turca ter se mostrado bem adaptada a viver em lentilhas, ela não perdeu a capacidade de se desenvolver em sementes de V. unguiculata, pois em somente duas gerações a raça turca apresentou parâmetros de desenvolvimento semelhantes aos da raça "Campinas". O mais interessante foi a observação de que a capacidade de utilizar lentilhas diminuiu progressivamente ao longo das gerações, de 84% de emergência na primeira geração para 53 e 55% na oitava e nona gerações respectivamente, enquanto o período de desenvolvimento quase duplicou entre a primeira e a nona geração. O desempenho das larvas da raça "Campinas" em sementes de lentilha foi tão mau que não foi possível fazer os estudos além da primeira geração. Já o desenvolvimento das raças da Turquia e de Campinas foi semelhante em sementes de V. unguiculata.

O fato de C. maculatus se desenvolver em um número relativamente grande de espécies de leguminosas levou alguns autores a referirem C. maculatus como uma espécie generalista (BIRCH et al., 1986; SIMMONDS et al., 1989). No entanto, to essa asserção desconsidera pontos muito importantes, como o fato de quase a totalidade das espécies de legumes testadas se tratar de plantas cultivadas e que mesmo assim o desenvolvimento do caruncho não é nada bom. Como expressou JANZEN (1977) "é tentador sugerir que a razão pela qual C. maculatus consegue se desenvolver num grande número de espécies (e gêneros) de legumes usados para o consumo humano é que os homens selecionaram sementes com baixos teores de compostos secundários, e não porque C. maculatus tenha uma habilidade excepcional para lidar com as defesas químicas das sementes". Um exemplo disso foi dado pelo próprio JANZEN (1977) com o caso das sementes de Phaseolus lunatus, que em estado selvagem apresenta de 2 a 3% do seu peso seco na forma do glicosídeo cianogênico, linamarina, e nas quais as larvas de C. maculatus morrem logo ao entrar em contato com os cotilédos-

nes; em sementes desse legume estocadas no comércio há somente traços, ou mesmo ausência de linamarina, e nessas sementes C. maculatus consegue se desenvolver, mesmo que não muito satisfatoriamente.

É claro que não está excluída a possibilidade de C. maculatus infestar espécies selvagens de leguminosas, pois como mostrou JANZEN (1977), de 63 espécies de legumes selvagens que ele estudou e que ocorrem na área de distribuição de C. maculatus, em somente uma delas, Rhynchosia calycosa, o caruncho conseguiu se desenvolver de ovo a emergência de adultos. Porém não basta ser capaz de se desenvolver nas sementes de determinada espécie para passar a utilizar esta espécie como hospedeiro regular. No caso de R. calycosa, JANZEN (1977) argumentou que seriam necessárias mudanças no comportamento exploratório do inseto, e que este se tornasse capaz de tolerar o microhabitat ocupado pelo novo hospedeiro. No entanto, a utilização de outras sementes na lista de hospedeiros, mesmo que não envolva necessariamente mudanças bruscas na biologia do inseto, não se dá de uma forma imediata, como observado no caso de Z. subfasciatus em relação a V. unguiculata.

1.3 - Zabrotes subfasciatus, um predador secundário das sementes de V. unguiculata

Z. subfasciatus é uma espécie menor do que C. maculatus, medindo de 1,8 a 2,5mm de comprimento e apresentando um acentuado dimorfismo sexual, onde a fêmea, que é maior do que o macho, apresenta duas manchas brancas nos élitros e o macho apresenta uma cor marrom pubescente uniforme (HOWE & CURRIE, 1964). O seu ciclo biológico é semelhante ao de C. maculatus, inclusive com evidências de variações interraciais (MEIK & DOBIE, 1986). Em estado selvagem Z. subfasciatus infesta sementes de P. lunatus (JANZEN, 1980; JOHNSON, 1981), que é considerado um reservatório utilizado pelo bruquídeo

para se manter nos intervalos de intersafras nos quais não há plantações disponíveis do seu hospedeiro preferido, P. vulgaris (PIMBERT, 1985).

A espécie Z. subfasciatus é originária do Novo Mundo (América Central e do Sul), onde é considerada especialista em relação aos legumes P. vulgaris e P. lunatus, tanto em condições de campo como nos grãos estocados, constituindo-se numa séria peste dessas culturas (GOLOB & KILMINSTER, 1982; PIMBERT, 1985; MEIK & DOBIE, 1986). Como predador de grãos estocados, Z. subfasciatus tem sido introduzido através do comércio em muitos países onde ocasionalmente tem atacado outros legumes, e entre eles V. unguiculata está incluída (MEIK & DOBIE, 1986). No entanto, como ocorre com C. maculatus, Z. subfasciatus não utiliza outras espécies tão intensamente como os seus hospedeiros naturais. Exceção feita à infestação de sementes tanto de Phaseolus spp. quanto de V. unguiculata em Uganda, onde Z. subfasciatus se tornou a peste mais comum dessas culturas (MEIK & DOBIE, 1986), não há registros de Z. subfasciatus causando sérios danos a sementes de V. unguiculata em outros locais.

O fato de Z. subfasciatus não infestar mais intensamente as sementes de V. unguiculata é intrigante, pois além desta espécie de bruquídeo ocorrer simpatricamente com o feijão-de-corda, ela é plenamente capaz de se desenvolver nas sementes desse legume, como foi comprovado por MEIK & DOBIE (1986), os quais trabalhando com populações de Z. subfasciatus coletadas a partir de sementes de P. vulgaris e V. unguiculata mostraram que não havia diferença no desenvolvimento de ambas as populações nas duas espécies de legumes.

1.4 - O Problema da Resistência de V. unguiculata à C. maculatus

Fazendo um retrospecto, à luz dos dados que dispomos atualmente, é intrigante o fato de que as investigações sobre o conjunto V. unguiculata - C. maculatus tenham levado a

enganos, tanto com relação ao bruquídeo quanto com relação à semente. Isto levou ao estabelecimento de verdadeiros dogmas na literatura especializada com relação à capacidade dos inibidores de tripsina em inibir o desenvolvimento de bruquídeos.

Esses enganos começaram com a primeira investigação sobre proteases digestivas de bruquídeos realizada por APPLEBAUM (1964) na qual foram usadas duas espécies: Callosobruchus chinensis e Acanthoscelides obtectus. Neste estudo ele concluiu que ambas as espécies de bruquídeos apresentavam baixíssima atividade proteolítica, quando comparada à atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina e com o homogenato intestinal do besouro Tenebrio molitor (Tenebrionidae), o que o levou a sugerir a hipótese de que os bruquídeos deviam ter perdido suas proteases digestivas, apresentando somente uma atividade residual, que aliada às proteases e aos peptídeos e aminoácidos endógenos das sementes seriam os responsáveis pelo fornecimento de aminoácidos para o desenvolvimento larval. Segundo APPLEBAUM (1964) a perda das proteases digestivas dos bruquídeos seria uma adaptação imposta pelas altas concentrações de inibidores de tripsina nas sementes de leguminosas.

A hipótese de APPLEBAUM (1964) foi bem aceita e resultados posteriores mostrando que os inibidores de tripsina não tinham efeito sobre as larvas de C. maculatus eram interpretados à luz desta hipótese, como, por exemplo, os resultados obtidos por JANZEN et al. (1976, 1977). Ainda na década de 80 JANZEN cita o trabalho de APPLEBAUM (1964) para justificar a capacidade dos bruquídeos em infestar sementes ricas em inibidores de tripsina (JANZEN, 1980) e para ilustrar a necessidade dos bruquídeos em se utilizar dos aminoácidos das sementes por falta de proteases (JANZEN, 1981).

As idéias reinantes na literatura com relação à capacidade de inibidores de tripsina em conferir resistência contra bruquídeos começou a mudar na virada da década de 70 para a década de 80. Pouco antes, entre 1974 e 1977, o banco mundial de germoplasma de V. unguiculata foi avaliado para a

resistência a C. maculatus no IITA, em Ibadan, Nigéria. Somente uma cultivar, TVu 2027, apresentou níveis satisfatórios de resistência (REDDEN et al., 1983). Depois outras cultivares foram obtidas a partir de TVu 2027 (SANTOS et al., 1988).

Trabalhando com a cultivar TVu 2027, um grupo inglês da Universidade de Durham atribuiu a resistência a C. maculatus ao elevado nível de inibidor de tripsina encontrado na cultivar nigeriana, cerca de 2 a 3 vezes mais do que nas cultivares suscetíveis que eles utilizaram (GATEHOUSE et al., 1979). Neste trabalho de 1979 encontra-se o trecho "A inibição da atividade proteolítica tipo tripsina extraída das larvas de C. maculatus, pelo extrato de feijão-de-corda e pelo inibidor purificado de feijão-de-corda foi observada em experimentos preliminares. Isso implica que a atividade antimetabólica do inibidor de tripsina é devida à inibição direta da proteólise larval, e desta maneira da utilização de proteínas". Ainda no mesmo trabalho encontra-se o trecho: "Os resultados também sugerem que o limiar no qual o inibidor se torna tóxico para as larvas encontra-se entre 0,5 a 0,8%".

Num segundo trabalho, GATEHOUSE & BOULTER (1983) admitem que a participação do inibidor de tripsina é parcial e em determinado trecho encontra-se o seguinte: "Estes resultados mostraram que mesmo ao nível de 1,5% o inibidor de tripsina de V. unguiculata é um antimetabólito efetivo de C. maculatus, apesar de que 10% de incorporação não inibiu o desenvolvimento de todas as larvas até o estágio de adultos". Verifica-se que estes valores são muito maiores do que os limiares citados anteriormente (GATEHOUSE et al., 1979).

A idéia da resistência da cultivar TVu 2027 ser devida totalmente ou em parte ao inibidor de tripsina foi de pronto aceita e amplamente divulgada na literatura especializada (ver XAVIER-FILHO et al., 1989). JANZEN, por exemplo, que antes não considerava os inibidores de tripsina como agentes efetivos contra os bruquídeos, passou a exemplificar esses compostos como agentes de defesa contra insetos citando entre outros GATEHOUSE et al., 1979 (JANZEN et al., 1986).

Só recentemente, após 20 anos do trabalho original de GATEHOUSE e colaboradores, a idéia firmemente arraigada na literatura de que o inibidor de tripsina é o responsável pela resistência de algumas cultivares de V. unguiculata a C. maculatus está sendo superada. De fato, novas descobertas tanto do lado do bruquídeo quanto do lado da semente excluem a possibilidade do inibidor de tripsina de V. unguiculata conferir resistência a C. maculatus, e provavelmente a qualquer outro bruquídeo.

Do lado da semente ficou demonstrado que não há correlação entre resistência e suscetibilidade de diversas cultivares de V. unguiculata a C. maculatus e os níveis encontrados de inibidores das proteinases serínicas quimiotripsina, subtilisina e tripsina (BAKER et al., 1989; XAVIER-FILHO et al., 1989) e de inibidores da proteinase cisteínica papaína (BAKER et al., 1989; XAVIER-FILHO et al., 1989).

Da parte do inseto avanços consideráveis foram alcançados superando os resultados de APPLEBAUM (1964), os quais podem ser entendidos em face dele ter trabalhado sempre em condições alcalinas de pH, condicionado pela idéia dominante na época de que as proteinases digestivas de insetos deviam ser similares às de mamíferos, tripsina e quimiotripsina. Em contraste, XAVIER-FILHO & COELHO (1980) trabalhando com extrato de larvas de C. maculatus demonstraram a existência de atividades contra hemoglobina e azoçaseína com pHs ótimos de 3,5 e 5,0 respectivamente. Posteriormente GATEHOUSE et al., (1985) confirmaram a presença de proteinases em intestinos-médios das larvas de C. maculatus. Em clara contradição com sua sugestão anterior da existência de atividade tipo tripsina em larvas de C. maculatus (GATEHOUSE et al., 1979), a atividade proteolítica do homogenato intestinal foi caracterizada como sendo devida principalmente a uma protease SH dependente, com pH ótimo de hidrólise entre 5,4 e 5,6 para vicilina e 5,6 para mioglobina, insensível aos inibidores de proteinases serínicas PMSF e TPCK, inibida pelos inibidores de proteinases cisteínicas leupeptina, pCMB, e pMCS e ativada por DTT. Foram verificados também os efeitos de

inibidores protéicos sobre as atividades contra mioglobina e vicilina. O inibidor de tripsina isolado de sementes de V. unguiculata inibiu parcialmente, enquanto o inibidor de papaína também isolado das sementes de V. unguiculata inibiu consideravelmente a atividade proteolítica do homogenato intestinal das larvas de C. maculatus. Neste trabalho GATEHOUSE et al. (1985) não usaram nenhum inibidor de proteinases aspárticas durante a investigação da natureza da(s) protease(s) larval, e mesmo após esses resultados continuaram considerando o inibidor de tripsina envolvido na resistência de V. unguiculata à C. maculatus.

KITCH & MURDOCK (1986) ampliaram a caracterização da proteinase cisteínica das larvas de C. maculatus trabalhando com o homogenato intestinal e com uma fração parcialmente purificada. A atividade contra ³Hmetemoglobina destas frações foi inibida por ácido iodoacético, NEM, leupeptina, antipaina e E-64, o qual foi efetivo em concentrações submicromolares, e ativada por DTT, cisteína, glutatião e mercaptaetanol. Também foi observada inibição da atividade hemoglobínica tanto do homogenato intestinal, quanto da fração parcialmente purificada por pepstatina, um inibidor considerado específico para proteinases aspárticas (UMEZAWA, 1978; STOREY & WAGNER, 1986). KITCH & MURDOCK não encontraram evidências de proteinases tipo tripsina em intestino-médio das larvas de C. maculatus, e também não expressaram interesse em verificar a presença de proteinases aspárticas, mesmo verificando a inibição por pepstatina e por DAN (diazacetilnorleucil metil éster).

CAMPOS et al. (1989) isolaram três frações proteolíticas do homogenato intestinal de C. maculatus, todas três eluídas num mesmo pico em Sephadex G-100, correspondendo a um peso molecular de 25.000D e depois separadas por troca iônica em DEAE-Celulose. As três frações apresentaram características de proteinases cisteínicas, como pH ótimo para hidrólise de azocaseína entre 5,0 e 6,0, ativação por cisteína e DTT, e inibição pelos compostos bloqueadores de grupos SH ácido iodoacético, iodoacetamida, pCMB e E-64. As frações isoladas não foram inibidas pelo inibidor de tripsina de se-

mentes de V. unguiculata, porém foram fortemente inibidas por cistatina e pelo inibidor de papaína isolado de sementes de V. unguiculata. Este inibidor, embora tenha se mostrado bastante efetivo, se encontra presente numa concentração muito baixa nas sementes, cerca de 0,0001% por peso seco.

A falta de correlação entre resistência e suscetibilidade e níveis dos diversos compostos até agora testados, ao mesmo tempo que nega a sugestão de GATEHOUSE et al. (1979) leva-nos à estaca zero quanto à questão de qual o fator (ou fatores) que está envolvido na resistência observada em certas cultivares de V. unguiculata à C. maculatus. A observação de que alguns adultos conseguem emergir de sementes resistentes e de que é possível encontrar larvas diminutas, mas ainda vivas vários dias após a infestação (observação pessoal) sugere que a resistência seja consequência de um efeito crônico. Experimentos preliminares mostraram que fracionando a farinha da cultivar resistente IT 81D 1045, e incorporando em dietas semiartificiais, a antibiose era observada somente com a incorporação da fração Globulina (XAVIER-FILHO et al., 1989).

Trabalhando com Z. subfasciatus LEMOS (1988) isolou e caracterizou parcialmente uma proteinase aspártica ao lado de proteinases cisteínicas em intestinos-médios desse bruquídeo. O fato de que Z. subfasciatus se desenvolve bem em cultivares de V. unguiculata resistentes a C. maculatus (XAVIER-FILHO et al., 1989) e o possível envolvimento de um fator protéico no mecanismo da resistência levantam a seguinte questão: a diferença em termos quantitativos e/ou qualitativos das proteinases digestivas desses dois bruquídeos estaria relacionada à capacidade de sobrepujar as defesas de certas cultivares de V. unguiculata? Para responder esta questão é importante determinar as possíveis diferenças entre as proteinases digestivas das duas espécies.

1.5 - Objetivos

O objetivo deste trabalho de tese é verificar se as larvas de C. maculatus possuem ou não proteinase aspártica digestiva a exemplo de Z. subfasciatus, caso positivo, verificar se as diferentes proteinases digestivas nas duas espécies se encontram em concentrações significativamente diferentes; propõe-se também a determinar a distribuição dessas proteinases e das condições de pH ao longo dos intestinos-médios das duas espécies de bruquídeos.

2 - MATERIAIS

Os insetos da espécie Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae) utilizados neste trabalho foram obtidos de uma colônia mantida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Esta colônia foi iniciada no ano de 1979 com insetos fornecidos pelo Professor José Higinio Ribeiro dos Santos do Centro de Ciências Agrárias da UFC. Os insetos da espécie Zabrotes subfasciatus (Coleoptera : Bruchidae) também foram coletados de uma colônia mantida no mesmo Departamento. Esta colônia foi iniciada em 1985 a partir de insetos fornecidos pelo Professor F.M. Wiendl do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo.

Sementes maduras de Vigna unguiculata da cultivar CE-31 (Pitiúba) usadas na manutenção das duas colônias foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da UFC.

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

Albumina sérica bovina, AIA, azocaseína, DAN, E-64, Hemoglobina bovina, Pepstatina A, TLCK e TPCK foram produtos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

1.10-fenantntiolina foi produto da Merck, Darmstadt, Alemanha.

CM-Sepharose e Sephadex G-75 foram produtos da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

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

3 - MÉTODOS

3.1 - Criação dos Insetos

Insetos de ambas as espécies foram criados sobre sementes de V. unguiculata, cultivar Pitiúba, mantidos em frascos de vidro transparente de boca larga e fechados com tampas de metal perfuradas o suficiente para garantir boa aeração. Cada uma das duas colônias foi mantida em uma única prateleira de uma câmara de crescimento, à temperatura de $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\pm 5\%$. A infestação das sementes foi feita usando-se fêmeas fecundadas de 2 a 3 dias após a emergência e com um período para postura de 24 horas. A cada geração se fez a infestação de novas sementes.

3.2 - Preparação dos Homogenatos Intestinais das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus

3.2.1 - Dissecção das Larvas dos Insetos

Larvas de ambas as espécies (com idade entre 16 e 17 dias após a infestação) foram dissecadas a frio, mergulhadas numa solução de NaCl 0,5M e sob as lentes de uma lupa estereoscópica. Após a exposição do trato intestinal das larvas se seguiu o isolamento do intestino-médio (IM) com secção na região de passagem do esôfago para o ventrículo e na região de inserção dos tubos de Malpighi. Todos os tecidos estranhos às paredes intestinais, tais como traquéias e corpo gorduroso, foram retirados. Depois de isolados os IMs foram imediatamente utilizados nos ensaios ou acondicionados in-

tactos em pequenos frascos de Eppendorf e estocados em congelador (-16°C).

3.2.2 - Extração dos Intestinos-médios

Os intestinos-médios das larvas das duas espécies de bruquídeos foram extraídos com tampão fosfato 50mM, pH 6,0, utilizando-se um homogeneizador tipo Potter mantido constantemente em contato com gelo. Em seguida foram centrifugados a 15.000 x g durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido, chamado de homogenato intestinal (HI), foi filtrado através de lã de vidro e foi sempre imediatamente utilizado para determinações enzimáticas e de proteína ou para cromatografias.

3.3 - Preparação do Extrato de Farinha de Sementes de V. unguiculata cv. Pitiúba

3.3.1 - Preparação da Farinha

Sementes maduras da cultivar Pitiúba foram usadas para a preparação da farinha após remoção do tegumento. As sementes foram moídas em moinho doméstico usado para moagem de café até a obtenção de uma granulação abaixo de 40 mesh.

3.3.2 - Preparação do Extrato

O extrato da farinha foi preparado com tampão fosfato 50mM, pH 6,0 na proporção de 1:10 (farinha : meio de extração) sob agitação constante e à temperatura ambiente (28°C)

durante 60 minutos. Após este tempo de contato a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, chamado de extrato bruto (EB), foi filtrado através de lã de vidro e usado para determinação de proteína e atividade enzimática.

3.4 - Preparação das Soluções Usadas como Substratos

3.4.1 - Azocaseína 1,5%

Um grama e meio de azocaseína foi suspenso em 100ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,6, contendo cisteína 1mM e EDTA 3mM. A suspensão foi aquecida e deixada em ebulição por 15 minutos. Após resfriamento o pH da solução foi reajustado e o volume completado para 100ml com água destilada. Esta solução foi mantida em congelador (-16°C) até sua utilização.

3.4.2 - Hemoglobina 1%

Um grama de hemoglobina bovina foi dissolvido em 50ml de HCl 0,06N. Após edição de 40ml de tampão de concentração 0,2M (glicina-HCl pH 2,0 a 4,5 e acetato pH 3,5) os valores de pH desejados foram ajustados e volumes completados para 100ml com cada um dos tampões. Estas soluções foram armazenadas em geladeira (4°C) por no máximo uma semana até sua utilização.

3.5 - Determinação das Atividades Enzimáticas

3.5.1 - Atividade Azocaseinásica

Os ensaios de atividade azocaseinásica foram feitos incubando-se por 30 minutos a 40°C 0,5ml de substrato 1,5%, 0,9ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,6 contendo cisteína 1mM e EDTA 3mM e 0,1ml de amostra contendo enzima (HI ou frações cromatográficas). A reação foi parada com 0,5ml de TCA 5% e após 30 minutos de repouso a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 7.000 x g à temperatura ambiente. Alíquotas de 1,0ml do sobrenadante foram alcalinizadas com 1,0ml de NaOH 2N. A atividade azocaseinásica foi medida pela absorbância em 440nm dos peptídeos diazotizados produzidos. Provas em branco foram feitas onde a amostra e o substrato foram incubados separadamente e o substrato adicionado à amostra após a adição de TCA 5%. Para os cálculos de atividade azocaseinásica (UAAC) foi definida a seguinte unidade: uma unidade de atividade corresponde à quantidade de enzima que produz uma absorbância de 0,100 UDO a 440nm em um volume de reação de 1,5ml, por 30 minutos, a 40°C.

Nos ensaios de inibição da atividade azocaseinásica dos eluatos cromatográficos com E-64 foi usada uma concentração do inibidor de 0,1µM no volume de incubação do ensaio. O inibidor e as amostras foram pré-incubados à temperatura ambiente (28°C) por 10 minutos. Controles foram feitos com incubação da amostra com o inibidor e adição do substrato após a adição de TCA 5%, e com incubação do substrato com o inibidor e adição da amostra após a adição de TCA 5%. Uma vez que E-64 foi dissolvido no tampão de ensaio, a prova em branco normal do ensaio sem inibidor serviu como controle em relação ao solvente do E-64.

3.5.2 - Atividade Hemoglobínásica

A atividade hemoglobínásica foi determinada de acordo com o método descrito por COELHO (1980) com algumas modificações. Aliquotas de 0,25ml de amostra contendo homogenato intestinal (HI), extrato bruto (EB) de farinha ou frações cromatográficas foram adicionados 0,25ml de tampão acetato 0,2M, pH 3,5. A reação foi iniciada com a adição de 2,5ml de solução do substrato. A mistura formada foi incubada por 60 minutos a 40°C e após este tempo a reação foi parada com 0,5ml de TCA 20%. A suspensão obtida foi deixada em repouso por 30 minutos e então centrifugada por 20 minutos a 7.000 x g, à temperatura ambiente. Provas em branco foram feitas com a adição do substrato após a adição de TCA 20%. Aliquotas de 1,0ml do sobrenadante foram alcalinizadas com 0,1ml de NaOH 2N. Os peptídeos solúveis em TCA, formados por ação enzimática, foram determinados pelo emprego do método de FOLIN Modificado por LOWRY (1951). A absorbância foi lida a 750nm. Uma unidade de atividade hemoglobínásica (UAHb) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma leitura de 0,100 UDO a 750nm em um volume de reação de 3,0ml a 40°C durante 50 minutos.

Nos ensaios de inibição da atividade hemoglobínásica dos eluatos cromatográficos com pepstatina, foram usadas as concentrações de 3µg/ml e 1µg/ml em relação ao volume de incubação do ensaio. Uma solução estoque de pepstatina (12µg/ml) foi preparada dissolvendo-se 200µg do inibidor em 0,5ml de metanol e levando-se o volume para 16,6ml com tampão acetato 0,2M, pH 3,5. O inibidor e as amostras foram pré-incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Controles foram feitos incubando-se o inibidor com a amostra e adição do substrato e adição da enzima após a adição de TCA 20% e enzima com o solvente do inibidor e adição do substrato após a adição de TCA 20%.

3.6 - Determinação de Proteína

As determinações de proteína foram feitas pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976) usando-se albumina sérica como padrão ou pela leitura da absorvância a 280nm no caso dos eluatos cromatográficos.

3.7 - Avaliação do Efeito do pH sobre a Atividade Hemoglobi- násica de IMs de Larvas de C. maculatus

A verificação do efeito do pH sobre a atividade hemo-
globinásica de HI e frações cromatográficas de IM de larvas
de C. maculatus foi feita usando hemoglobina na concentração
de 1% em valores de pH variando de 2,0 a 4,5. O pH das solu-
ções de hemoglobina foi mantido nos valores desejados por di-
luição de uma solução de hemoglobina 2% em HCl 0,06N com tam-
pão glicina 0,4M e os valores de pH reajustados em potenciô-
metro. As condições de ensaio foram as mesmas definidas no
item 3.5.2.

3.8 - Isolamento e Caracterização Parcial de uma Proteínase Aspártica Presente no IM das Larvas de C. maculatus

3.8.1 - Isolamento através de Cromatografia de Exclusão Mo- lecular Seguida por Cromatografia de Troca Iônica

O isolamento de frações com atividade proteolítica
típica de proteinase aspártica foi obtido por fracionamento
de HI de larvas de C. maculatus em duas condições diferentes
de pH (3,5 e 6,0) com o uso seqüencial de filtração em gel
e de cromatografia de troca iônica.

Primeiramente um homogenato (4,5ml) contendo 1.000IMs extraídos em tampão acetato 50mM, pH 3,5 foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-75 (2,0 x 50,0cm) equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo foi ajustado para 20ml/h e foram coletadas frações de 1,5ml. Os tubos com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina foram reunidos e aplicados a uma coluna de CM-Sepharose (1,1 x 4,0cm) equilibrada com tampão acetato 50mM, pH 3,5. Neste caso o fluxo foi mantido a 30ml/h, sendo coletadas frações de 1,5ml. Após a leitura da absorbância a 280nm das proteínas não retidas ter atingido o valor zero foi aplicado um gradiente de NaCl variando linearmente de 0 a 0,6M (60ml) em tampão acetato 50mM, pH 3,5.

Utilizou-se também filtração em gel dextrana como primeira etapa no isolamento a pH 6,0. A coluna de Sephadex G-75 (2,0 x 50,0cm) foi equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0 e depois calibrada para determinação de pesos moleculares com as seguintes proteínas: albumina sérica bovina (66.000D), ovoalbumina (45.000D), inibidor de tripsina de soja (20.100D) e ribonuclease A de pâncreas bovino (13.400D). Neste caso foram aplicados 2,2ml de um homogenato contendo 700IMs extraídos no mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo foi ajustado para 20ml/h e foram coletadas frações de 1,5ml. Da mesma forma que nas experiências a pH 3,5 os tubos com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina foram reunidos e aplicados a uma coluna de CM-Sepharose (1,1x4,0cm) equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0. O fluxo foi mantido a 45ml/h e as frações coletadas foram de 1,5ml. Após a eluição das proteínas não retidas foi aplicado um gradiente linear de NaCl variando de 0 a 0,5M (60ml) em tampão fosfato 10mM, pH 6,0.

Todas as cromatografias citadas neste trabalho foram realizadas em câmara fria (4°C).

3.8.2 - Caracterização Parcial das Frações Contendo Proteínas Aspárticas

A fração com atividade hemoglobínica obtida da cromatografia de troca iônica a pH 3,5 foi utilizada para determinação do efeito de diversos inibidores de enzimas proteolíticas e do efeito do pH sobre sua atividade hemoglobínica e para a hidrólise de hemoglobina comparada à hidrólise de albumina. A fração com atividade hemoglobínica obtida na cromatografia de troca iônica a pH 6,0 foi repassada na coluna de Sephadex G-75 para determinação do seu peso molecular.

Os efeitos de diversos inibidores de enzimas proteolíticas sobre a atividade hemoglobínica da fração isolada a pH 3,5 foram estudados através de ensaios usando pré-incubação por 10 minutos à temperatura ambiente de alíquotas de 0,25ml da fração com 0,25ml das soluções dos inibidores dissolvidos em solventes adequados. Os ensaios obedeceram às condições definidas no item 3.5.2. Controles foram feitos contendo: substrato + inibidor; fração + inibidor, e fração + substrato + solvente do inibidor.

O efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica da fração isolada a pH 3,5 foi verificado como descrito no item 3.7.

Para a comparação entre as hidrólises de hemoglobina e albumina sérica bovina pela fração isolada a pH 3,5 e por pepsina foram usadas as mesmas condições de ensaio definidas no item 3.5.2. Hemoglobina foi preparada como descrito no item 3.4.2 usando-se tampão acetado 0,2M, pH 3,5. Albumina foi usada na concentração de 1% (p/v) dissolvida em tampão acetato 0,2M, pH 3,5 e pepsina foi dissolvida em HCl 10mM na concentração de 0,2mg/ml. Os resultados foram expressos como percentagem do valor obtido com a hidrólise de hemoglobina por cada uma das fontes de enzima.

3.9 - Comparação das Atividades Hemoglobínica e Azocaseínica entre Homogenatos Intestinais das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus

A comparação das atividades hemoglobínica e azocaseínica dos HIs de larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus foi feita através de curvas de atividade proteolítica usando homogenatos com o mesmo número de IMs por mililitro (2IMs/ml no caso da atividade hemoglobínica e 15IMs/ml no caso da atividade azocaseínica) obedecendo às condições definidas nos itens 3.5.1 e 3.5.2. A comparação também foi feita usando as atividades hemoglobínica específica e azocaseínica específica.

3.10 - Quantificação das Proteinases Aspárticas e Cisteínicas dos Intestinos-médios das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus e de Extrato de Farinha das Sementes de V. unguiculata cv. Pitiúba.

A quantificação das proteinases aspárticas e cisteínicas digestivas de ambas as espécies de bruquídeos e de extrato da farinha das sementes da cultivar Pitiúba foi feita através da titulação das atividades hemoglobínica e azocaseínica, respectivamente, com os inibidores pepstatina e E-64. As titulações foram feitas mantendo-se um volume constante de HI ou EB e um volume igual de solução dos inibidores a concentrações crescentes. Uma solução estoque de pepstatina foi preparada como descrito no item 3.5.2 e diluída com tampão acetato 0,2M, pH 3,5 para obtenção de concentrações variando de 1 a 15ng/ensaio. A solução estoque de E-64 (1 μ M) foi preparada dissolvendo o inibidor em água destilada. Esta solução foi diluída com tampão acetato 0,1M, pH 5,6 contendo cisteína 1mM e EDTA 3mM de modo a obter concentrações variando de 2,5 a 53,5ng/ensaio. As misturas das amostras com as soluções dos inibidores foram incubadas por 10 minutos à

temperatura ambiente antes do início dos ensaios, os quais foram realizados nas mesmas condições definidas nos ítems 3.5.1 e 3.5.2. Os resultados foram expressos em picomoles de enzima sensível a pepstatina ou a E-64 por miligrama de peso seco, considerando a extrapolação das curvas de titulação para o zero de atividade.

3.11 - Distribuição das Atividades Hemoglobínica e Azocaseínica ao longo dos Intestinos-médios das Larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

A distribuição das atividades hemoglobínica e azocaseínica ao longo dos IMs das larvas das duas espécies de bruquídeos foi determinada através da medição destas atividades em três secções dos intestinos-médios. As secções foram delimitadas em regiões proximal, média e distal de acordo com dobras que ocorrem nos ventrículos das larvas, e para obtê-las os IMs foram congelados e seccionados imediatamente evitando-se a extrusão de material contido no lúmen ventricular.

3.12 - Determinação do pH ao longo dos Intestinos-médios das Larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

As determinações de pH foram feitas obedecendo à mesma delimitação das secções dos IMs usada para a determinação da distribuição das atividades proteínicas (item 3.11). As secções foram maceradas em 20µl da solução salina usada para a dissecação das larvas e em seguida adicionou-se mais 20µl de soluções de indicadores de pH. Os indicadores de pH usados foram os seguintes: indicador universal líquido (Merck), vermelho congo, verde de bromocresol, 1,4-dinitrofenol e vermelho de metila. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos usando soluções padrões de pHs conhecidos.

4 - RESULTADOS

4.1 - Isolamento e Caracterização Parcial de uma Proteinase Aspártica do Intestino-médio das Larvas de C. maculatus

Uma proteinase aspártica foi isolada a partir de homogenatos intestinais das larvas de C. maculatus através de dois passos cromatográficos.

Primeiro um homogenato intestinal de 1.000 larvas foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-75 equilibrada com tampão acetato 50mM, pH 3,5; a cromatografia foi desenvolvida e nos eluatos foram medidas as atividades hemoglobínásica e azocaseinásica. Os perfis destas duas atividades não coincidiram, sendo a atividade hemoglobínásica maior numa região de altos pesos moleculares, enquanto que a atividade azocaseinásica foi maior numa faixa de pesos moleculares menores. Estas diferenças de posição de eluição associadas às diferentes condições dos dois ensaios indicavam a existência de pelo menos dois tipos de proteinases que não agiam da mesma forma sobre os dois substratos (FIGURA 1).

Para verificar a possibilidade de separação das proteinases aspárticas das proteinases cisteínicas presentes (KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS et al., 1989), logo na etapa de filtração em gel, foram feitas cromatografias na coluna de Sephadex G-75 nas mesmas condições da experiência anterior, mas utilizando-se inibidores específicos para as duas atividades. A atividade hemoglobínásica foi medida na presença e na ausência de pepstatina, e em outra a atividade azocaseinásica foi medida na presença e na ausência de E-64. Pepstatina inibiu completamente a atividade hemoglobínásica na faixa das frações de número 35 a 45 não inibindo ou inibindo somente parcialmente o restante da atividade hemoglobínásica, que se estendeu a uma faixa de peso molecular menor (FIGURA 2a).

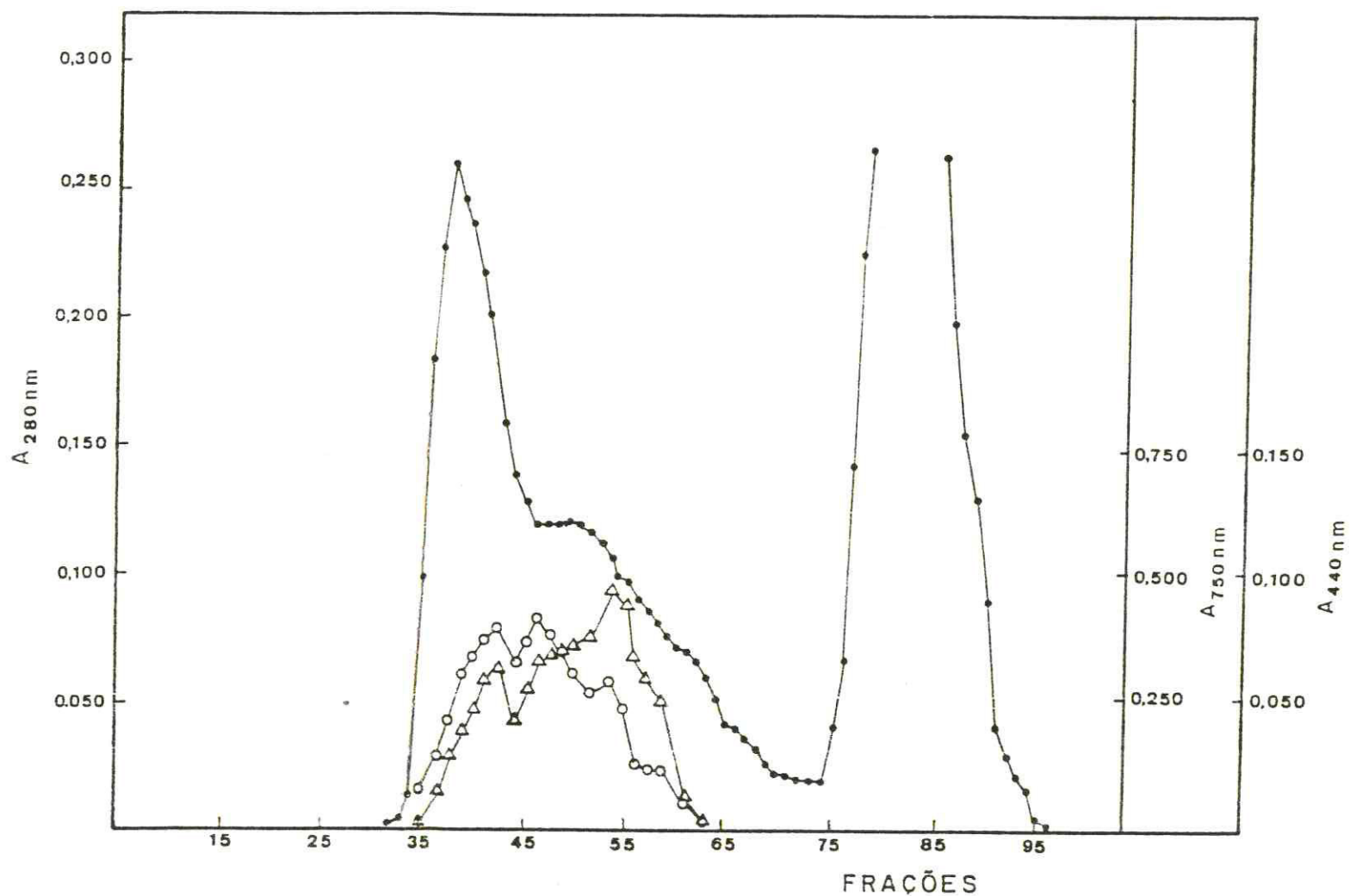


FIGURA 1 - Cromatografia em Sephadex G-75 do homogenato intestinal das larvas de *Callosobruchus maculatus*. Coluna 2,0 x 50,0cm; tampão acetato 50mM, pH 3,5; volume das frações 1,5ml. (●—●) concentração de proteína ($A_{280\text{nm}}$); (o—o) atividade hemoglobínásica ($A_{750\text{nm}}$); (Δ — Δ) atividade azocaseínásica ($A_{440\text{nm}}$).

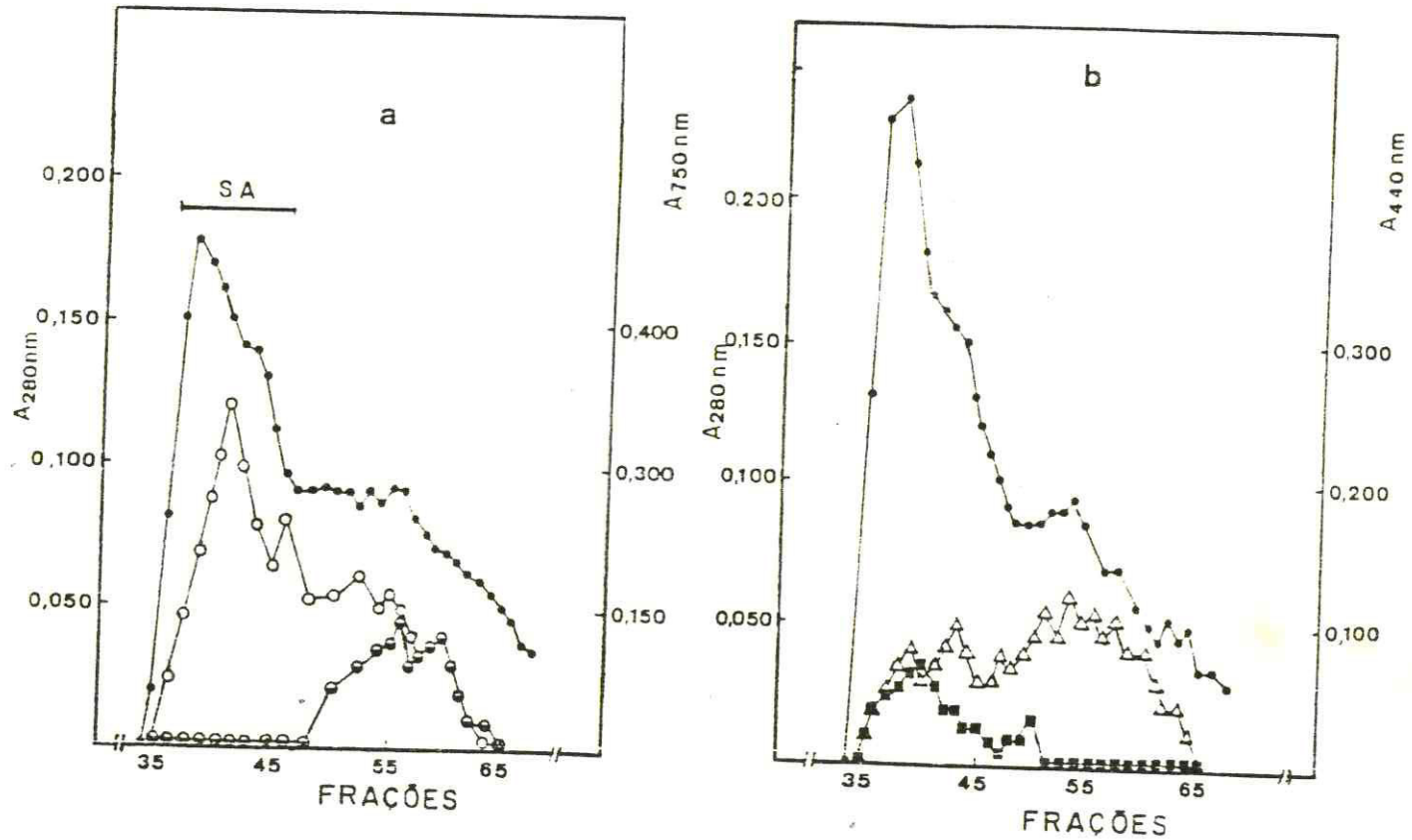


FIGURA 2 - Cromatografias em Sephadex G-75 de homogenatos intestinais das larvas de *Callosobruchus maculatus*. Ação de pepstatina e de E-64. Coluna 2,0 x 50,0cm; tampão acetato 50mM, pH 3,5; volume das frações 1,5ml.
 a - (●—●) concentração de proteína (A_{280nm}); (○—○) atividade hemoglobínásica na ausência de pepstatina (A_{750nm}); (◐—◐) atividade hemoglobínásica na presença de pepstatina (A_{750nm}).
 b - (●—●) concentração de proteína (A_{280nm}); (Δ—Δ) atividade azocaseínásica na ausência de E-64 (A_{440nm}); (■—■) atividade azocaseínásica na presença de E-64 (A_{440nm}).

O inverso foi observado na experiência com E-64, pois este não inibiu a atividade azocaseinásica na zona de altos pesos moleculares só inibindo-a totalmente a partir da fração de número 51 (FIGURA 2b).

O conteúdo dos tubos com atividade hemoglobínica sensível à pepstatina (fração SA, FIGURA 2a) foi reunido e aplicado a uma coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão acetato 50mM, pH 3,5. A FIGURA 3 mostra que um único pico com atividade hemoglobínica foi retido e eluído numa concentração de NaCl correspondente a 0,3M.

A TABELA 1 apresenta os resultados da purificação da atividade hemoglobínica a pH 3,5, onde se verifica que houve uma purificação de 7 vezes.

A fração obtida a partir da cromatografia de troca iônica a pH 3,5 (fração CA, FIGURA 3) foi submetida a uma análise com diversos inibidores de enzimas proteolíticas (TABELA 2). Pepstatina, um inibidor de origem microbiana específico para proteinases aspárticas (UMEZAWA, 1976; STOREY & WAGNER, 1986), inibiu fortemente a atividade hemoglobínica da fração CA. Já E-64, um inibidor também de origem microbiana específico para proteinases cisteínicas (HANADA *et al.*, 1978; STOREY & WAGNER, 1986) não teve praticamente nenhum efeito sobre esta atividade. DAN (diazacetilnorleucilmetil éster) inibiu a atividade hemoglobínica da fração CA e este efeito foi aumentado na presença de cobre que, mesmo sozinho foi capaz de inibir em mais de 50% a atividade proteolítica da fração CA. Os agentes quelantes 1,10-fenantrolina e EDTA não tiveram nenhum efeito inibitório, assim como não tiveram efeito os inibidores de proteinases serínicas TLCK e TPCK. Ácido iodoacético também inibiu a atividade hemoglobínica da fração CA.

A comparação da hidrólise de hemoglobina e albumina pela fração CA mostrou que esta fração hidrolisou albumina numa velocidade igual a 30% do valor obtido com a hidrólise de hemoglobina, enquanto pepsina hidrolisou ambos os substratos muito bem, sendo a hidrólise de albumina maior que a hidrólise de hemoglobina (TABELA 3).

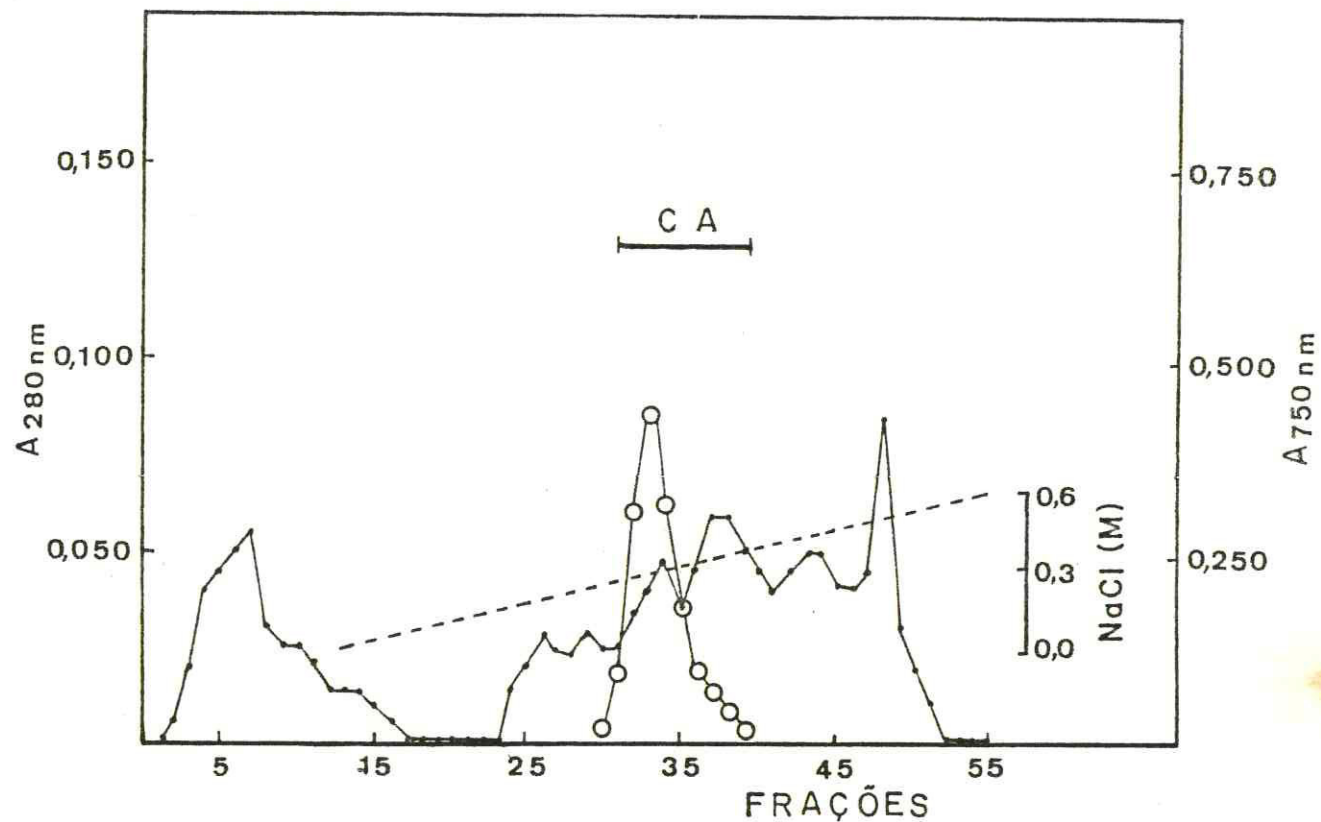


FIGURA 3 - Cromatografia em CM- Sepharose da fração com atividade homoglobinásica sensível a pepstatina obtida da Sephadex G-75 (fração SA, FIGURA 2a). Coluna 1,1 x 4,0cm equilibrada com tampão acetato 50mM, pH 3,5; volume das frações 1,5ml. (●—●) concentração de proteína (A_{280nm}) (o—o) atividade hemoglobinásica (A_{750nm}).

TABELA 1 - Etapas de purificação da atividade hemoglobínica de homogenato intestinal de larvas de Callosobruchus maculatus por filtração em Sephadex G-75 seguida por troca iônica em CM-Sepharose a pH 3,5.

Fração	Volume (ml)	Atividade Proteolítica (UA/ml)	UA Total	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (UA/mg)	Purificação (x)	Rendimento (%)
HI	4,5	248,33	1117,48	2,059	120,60	1	100,0
SA	13,5	32,50	438,75	0,145	224,13	1,8	39,2
CA	12,0	13,60	163,20	0,016	850,0	7,0	14,6

TABELA 2 - Efeito de alguns inibidores de enzimas proteolíticas sobre a atividade hemoglobínica da fração CA.

Inibidor	Concentração ^a	Atividade (%)
Controle	-	100,0
Pepstatina	3µg/ml	10,3
E-64	0,1µM	98,5
DAN	1mM	58,8
DAN + Cu ²⁺	1mM + 1mM	47,0
Cu ²⁺	1mM	45,8
1,10-fenantrolina	3mM	114,1
EDTA	3mM	100,1
AIA	3mM	58,2
TLCK	1mM	100,0
TPCK	1mM	100,0

a - Concentração no volume de incubação do ensaio.

TABELA 3 - Percentagem de hidrólise de albumina sérica bovina em relação à hidrólise de hemoglobina pela fração CA e por pepsina.

Fonte de Enzima	Substratos	
	Hemoglobina	Albumina
Fração CA	100,0	30,0
Pepsina	100,0	133,5

A fração CA também foi usada para verificação do efeito do pH sobre sua atividade hemoglobínica. A FIGURA 4 mostra que o pH ótimo de hidrólise de hemoglobina pela fração CA foi igual a 3,3, em contraste com o pH ótimo apresentado pelo homogenato intestinal das larvas de C. maculatus que foi igual a 4,0.

Um homogenato intestinal contendo 700IMs foi aplicado à coluna de Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0. A atividade hemoglobínica foi medida na presença e na ausência de pepstatina (FIGURA 5). Novamente foi observada uma atividade hemoglobínica fortemente inibida por pepstatina numa região de peso molecular elevado e uma fração de menor peso molecular em que este inibidor não teve efeito sobre a atividade hemoglobínica. A fração sensível a pepstatina (fração SB, FIGURA 5) foi reunida e aplicada à coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0. Da mesma forma que a pH 3,5 foi obtido um único pico de atividade hemoglobínica eluído com uma concentração de NaCl de 0,18M (FIGURA 6). Essa fração (fração CB, FIGURA 6) foi reunida e repassada na coluna de Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0 resultando numa única fração (SC, FIGURA 7) com atividade hemoglobínica e inibida por pepstatina e com um peso molecular de 62.000D (FIGURA 7).

A TABELA 4 mostra as etapas de purificação da fração aspártica a pH 6,0, onde se vê que a atividade foi purificada 3,5 vezes.

4.2 - Comparação das Atividades Hemoglobínica e Azocaseínica entre Homogenatos Intestinais das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus

Os homogenatos intestinais das larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus diferiram consideravelmente quanto às suas curvas de atividade hemoglobínica (FIGURA 8). Já a diferença entre as curvas de atividade azocaseínica não foi tão

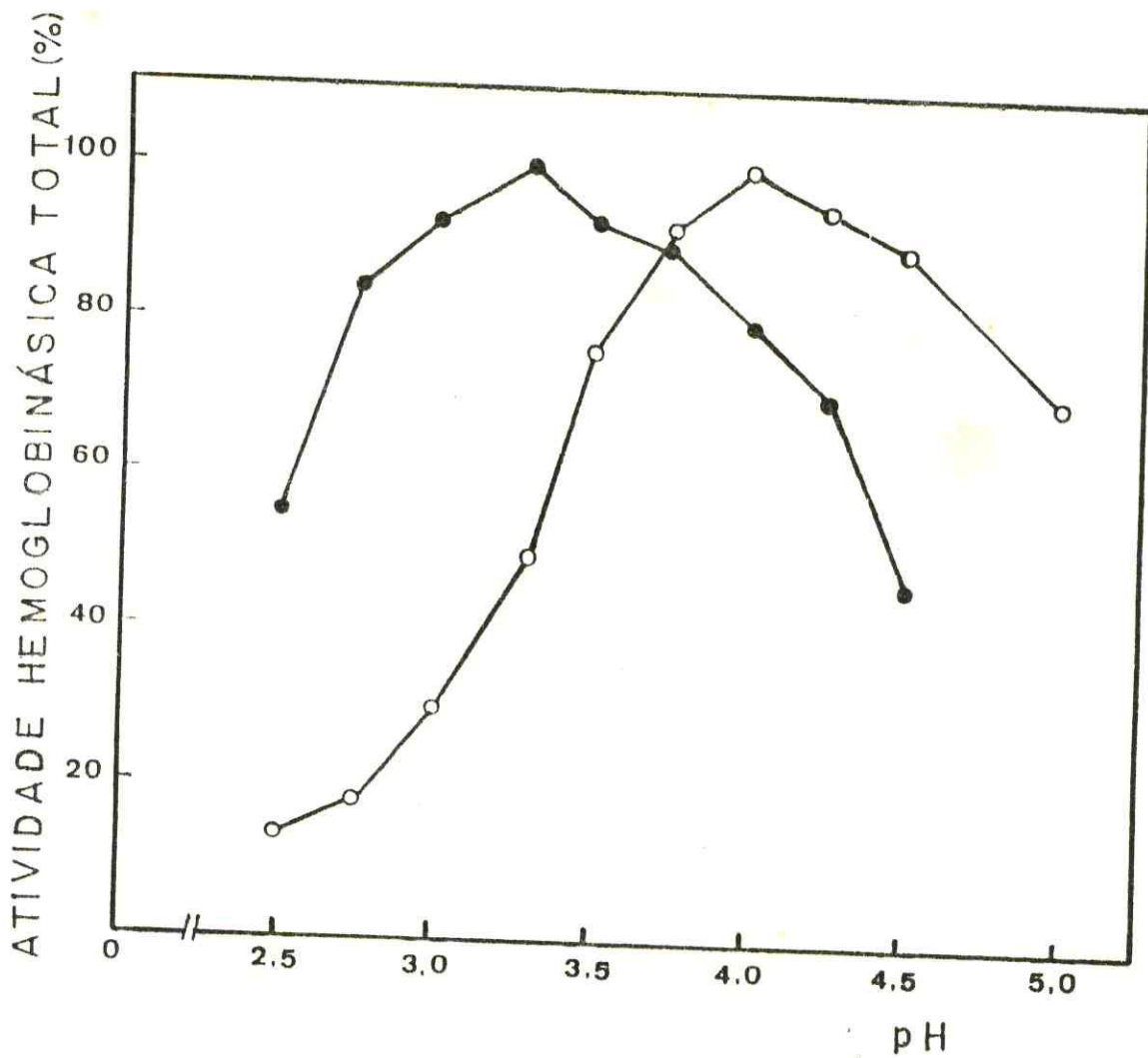


FIGURA 4 - Efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica de homogenato intestinal das larvas de Callosobruchus maculatus (o—o) e da fração CA (●—●).

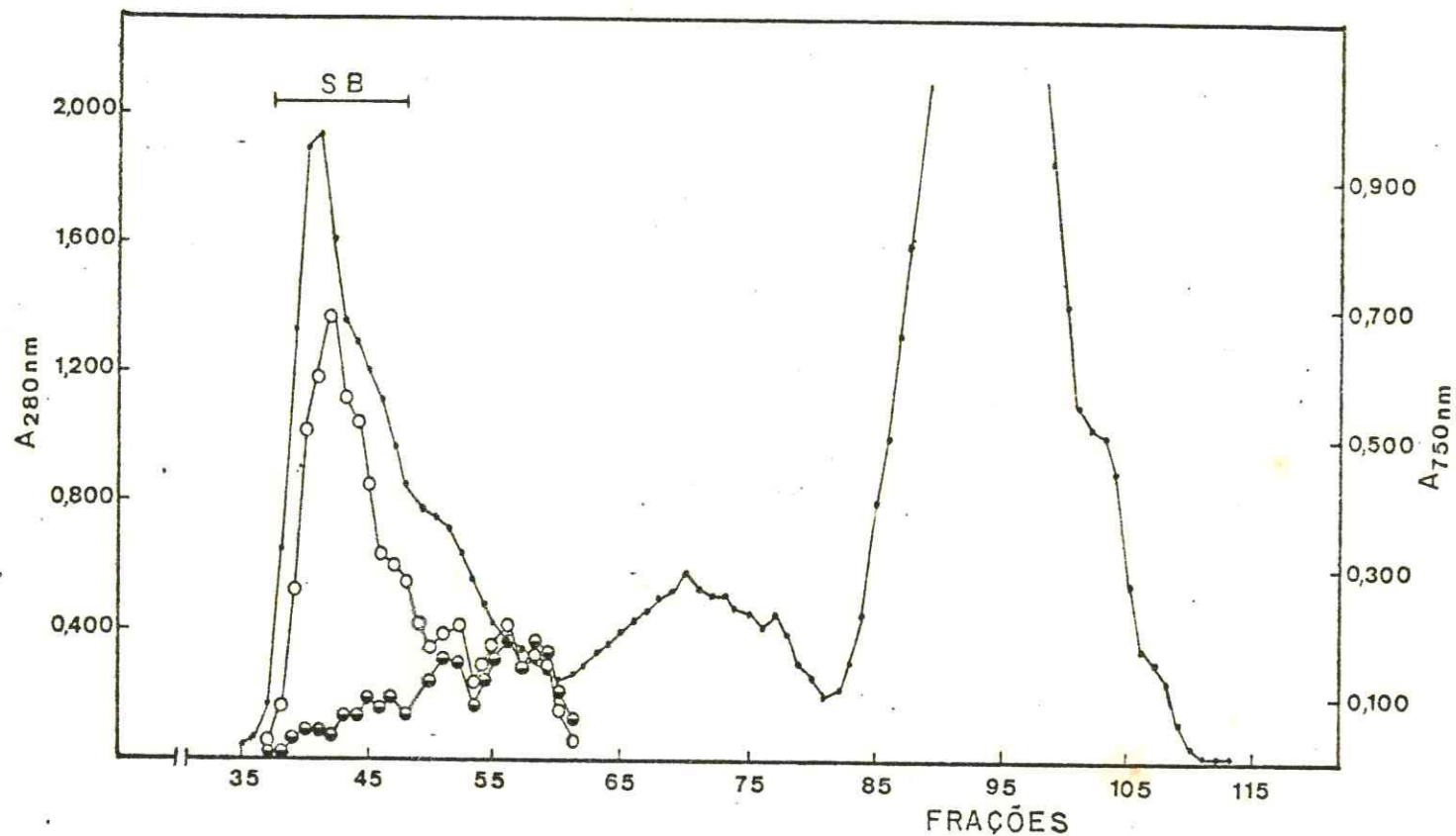


FIGURA 5 - Cromatografia em Sephadex G-75 do homogenato intestinal das larvas de *C. maculatus*. Coluna 2,0 x 50,0cm; tampão fosfato 10mM, pH 6,0; volume das frações 1,5ml. (●—●) concentração de proteína (A_{280nm}); (○—○) atividade hemoglobinásica na ausência de pepstatina (A_{750nm}) (●—●) atividade hemoglobinásica na presença de pepstatina (A_{750nm}).

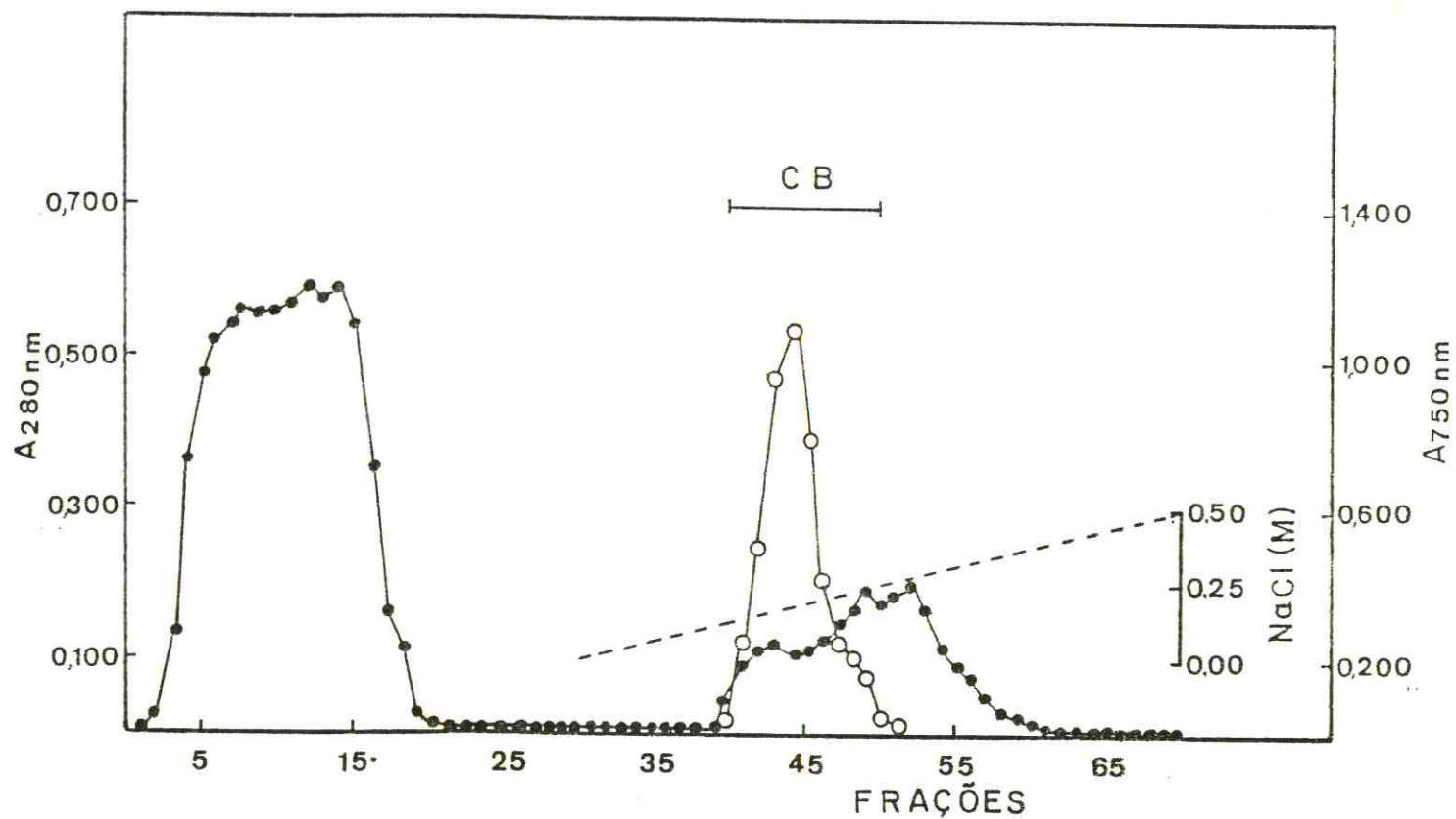


FIGURA 6 - Cromatografia em CM-Sepharose da fração com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina obtida a partir da Sephadex G-75 (fração SB, FIGURA 5). Coluna 2,0 x 50,0cm equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 6,0; volume das frações 1,5ml. (●—●) concentração de proteína (A_{280nm}); (o—o) atividade hemoglobínica (A_{750nm}).

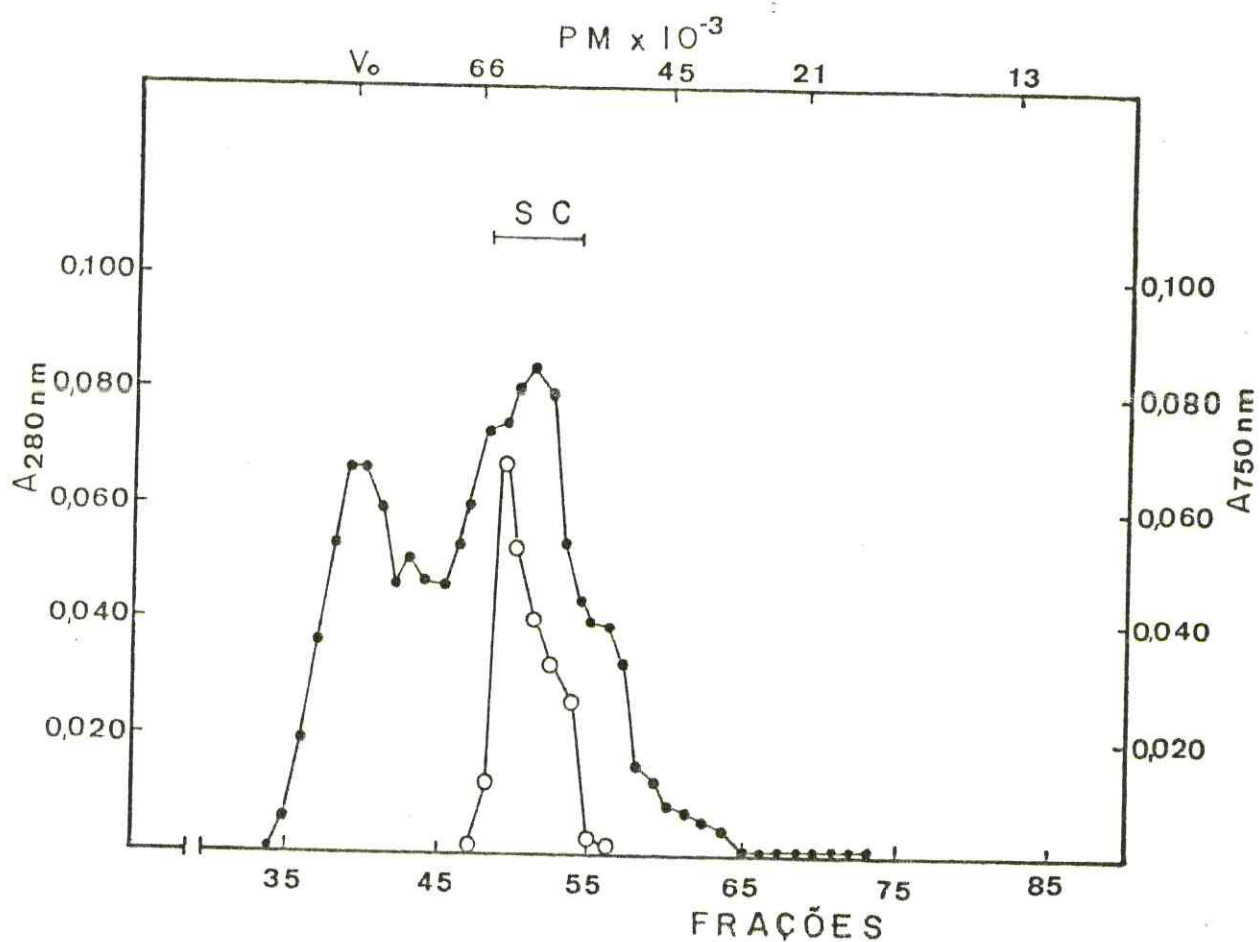


FIGURA 7 - Cromatografia em Saphadex G-75 da fração com atividade hemoglobínica obtida a partir da CM-Sepharose a pH 6,0 (fração SB, FIGURA 6). Cromatografia desenvolvida nas mesmas condições descritas na FIGURA 5; (●—●) concentração de proteína ($A_{280\text{nm}}$); (o—o) atividade hemoglobínica ($A_{750\text{nm}}$).

TABELA 4 - Etapas da purificação da atividade hemoglobínica do homogenato intestinal de larvas de Callosobruchus maculatus por filtração em Sephadex G-75 seguida por troca iônica em CM-Sepharose e repasse na coluna de Sephadex G-75.

Fração	Volume (ml)	Atividade Proteolítica (UA/ml)	UA Total	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (UA/mg)	Purificação (x)	Rendimento (%)
HI	2,2	1833,60	4033,92	9,220	198,87	1	100,0
SB	15,0	79,30	972,00	0,192	413,02	2,0	24,09
CB	13,5	33,0	445,50	0,048	687,50	3,4	11,04
SC	9,0	2,10	18,90	0,003	700,00	3,5	0,46

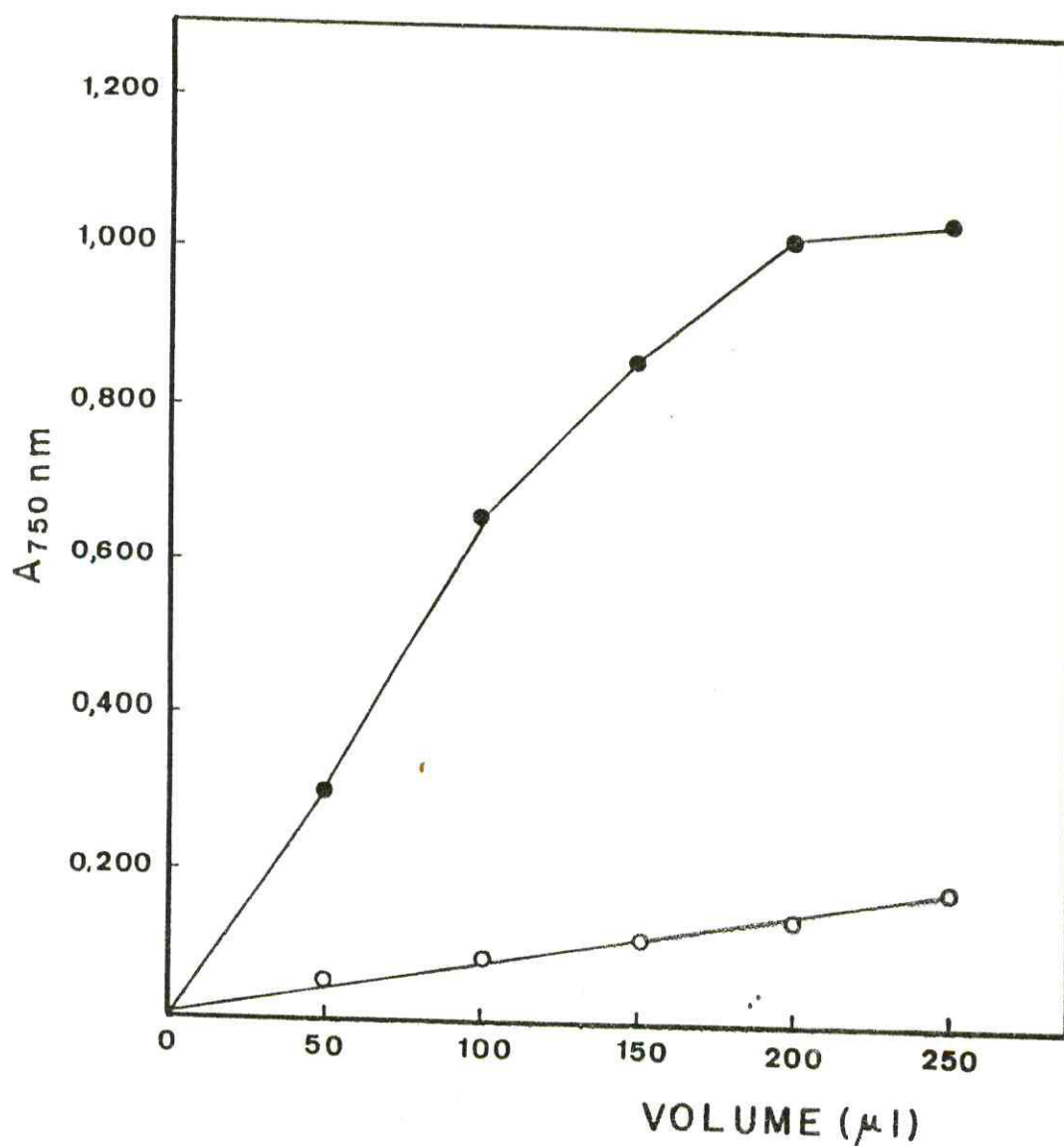


FIGURA 8 - Comparação entre as curvas de atividade hemoglobi
násica de homogenatos intestinais das larvas de
C. maculatus (o—o) e Z. subfasciatus (●—●).

acentuada (FIGURA 9). Em termos de atividade específica Z. subfasciatus apresentou 3,8 vezes mais atividade hemoglobínica e 1,7 vezes mais atividade azocaseinásica do que C. maculatus (TABELA 5).

4.3 - Quantificação das Proteinases Aspárticas e Cisteínicas Digestivas das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus e do Extrato Bruto das Sementes da Cultivar Pitiúba

Os resultados das titulações das atividades hemoglobínica e azocaseinásica dos homogenatos intestinais das larvas das duas espécies de bruquídeos e da atividade hemoglobínica do extrato bruto de farinha das sementes da cultivar Pitiúba estão mostrados nas FIGURAS 10, 11 e 12 e sumarizados na TABELA 6. Ficou demonstrado que C. maculatus apresenta menos enzima sensível a pepstatina do que enzima sensível a E-64 em termos molares. Com Z. subfasciatus ocorre o contrário, as enzimas sensíveis a pepstatina são predominantes em relação às enzimas sensíveis a E-64 (TABELA 6). Pode também ser verificado nesta mesma TABELA que Z. subfasciatus apresenta 4,4 vezes mais enzima sensível a pepstatina e 2,1 vezes mais enzima sensível a E-64 do que C. maculatus, isto expresso em termos de picomoles de enzima sensível por miligrama de peso seco de intestino-médio. A quantidade de enzima sensível a pepstatina medida no extrato de farinha das sementes se mostrou muito menor comparada à quantidade medida nos homogenatos intestinais dos insetos.

4.4 - Distribuição das Atividades Hemoglobínica e Azocaseinásica ao longo dos Intestinos-médios das Larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus

A determinação das atividades hemoglobínica e azocaseinásica nas três regiões em que foram divididos os intes

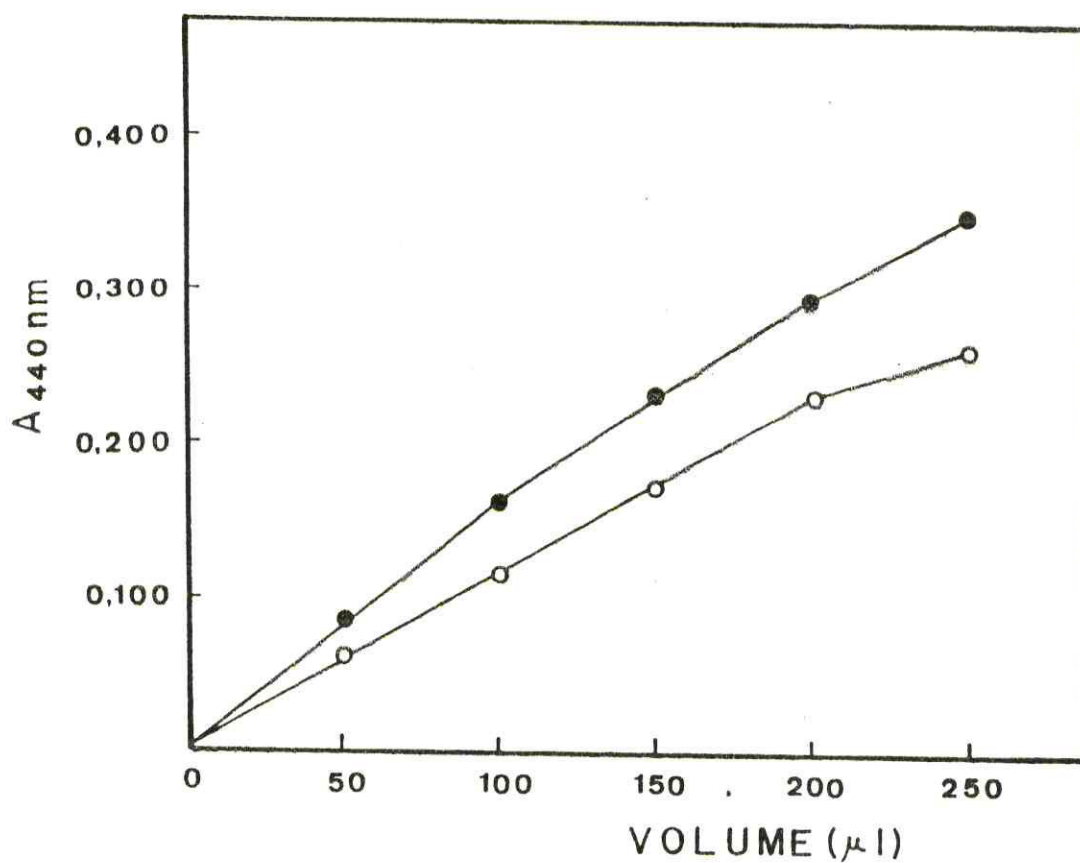


FIGURA 9 - Comparação entre as curvas de atividade azocaseinásica de homogenatos intestinais das larvas de C. maculatus (o—o) e Z. subfasciatus (●—●).

TABELA 5 - Comparação entre as atividades hemoglobínica e azocaseínica específicas de homogenatos intestinais das larvas de Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus e de cotilédones de Vigna unguiculata cv. Pitiúba.

Espécie	UAHb/mgP	UAAC/mgP
<u>C. maculatus</u>	122,45 ± 15,05 (1)	7,85 ± 0,80 (1)
<u>Z. subfasciatus</u>	467,17 ± 35,90 (3,8)	14,07 ± 2,07 (1,8)
<u>V. unguiculata</u>	2,26 ± 0,26 (0,018)	- (-)

Obs.: Os valores mostrados representam médias de três repetições feitas em triplicatas. Os números entre parênteses indicam valores relativos aos valores encontrados para C. maculatus.

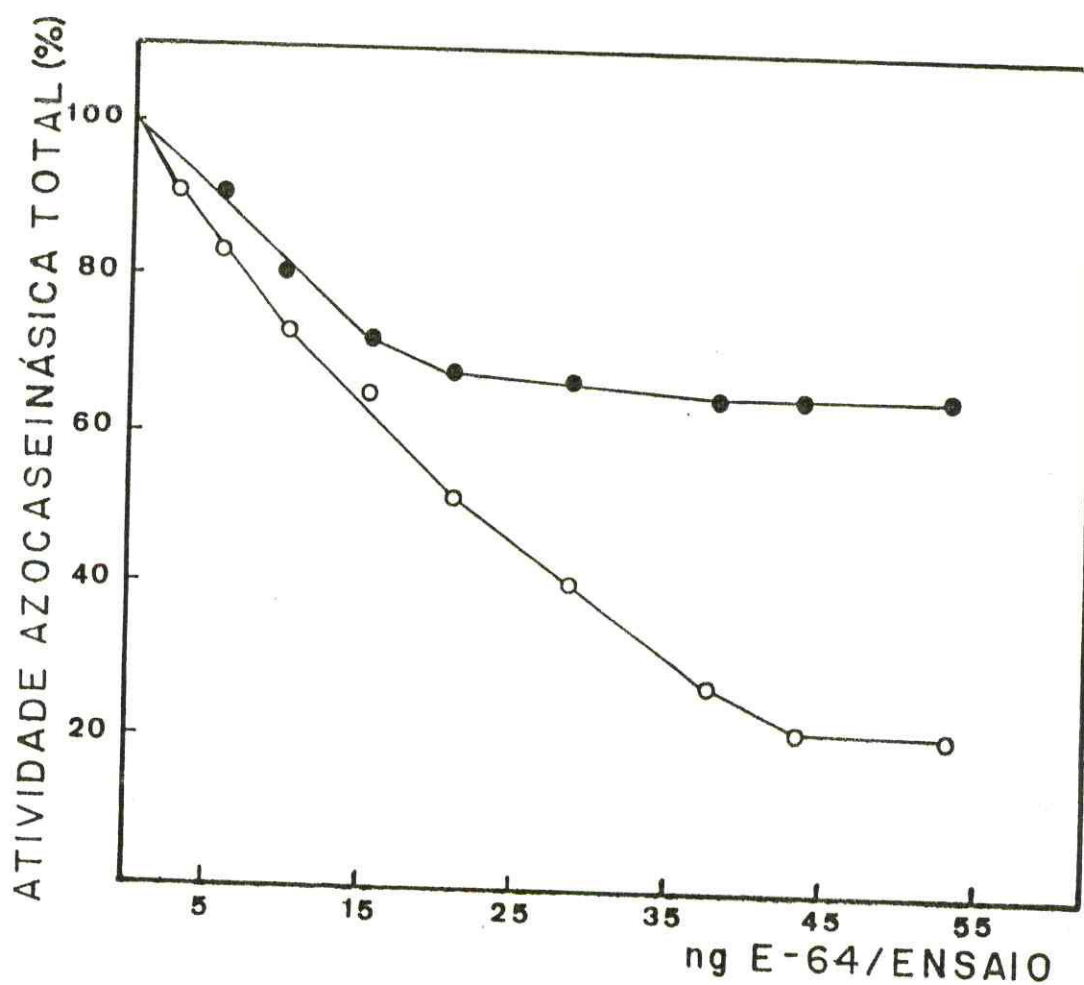


FIGURA 10 - Titulação da atividade azocaseinásica de homogenato intestinal das larvas de *Callosobruchus maculatus* (o—o) e de *Zabrotes subfasciatus* (●—●) com E-64. Homogenatos intestinais de ambas as espécies contendo 15 IM/ml.

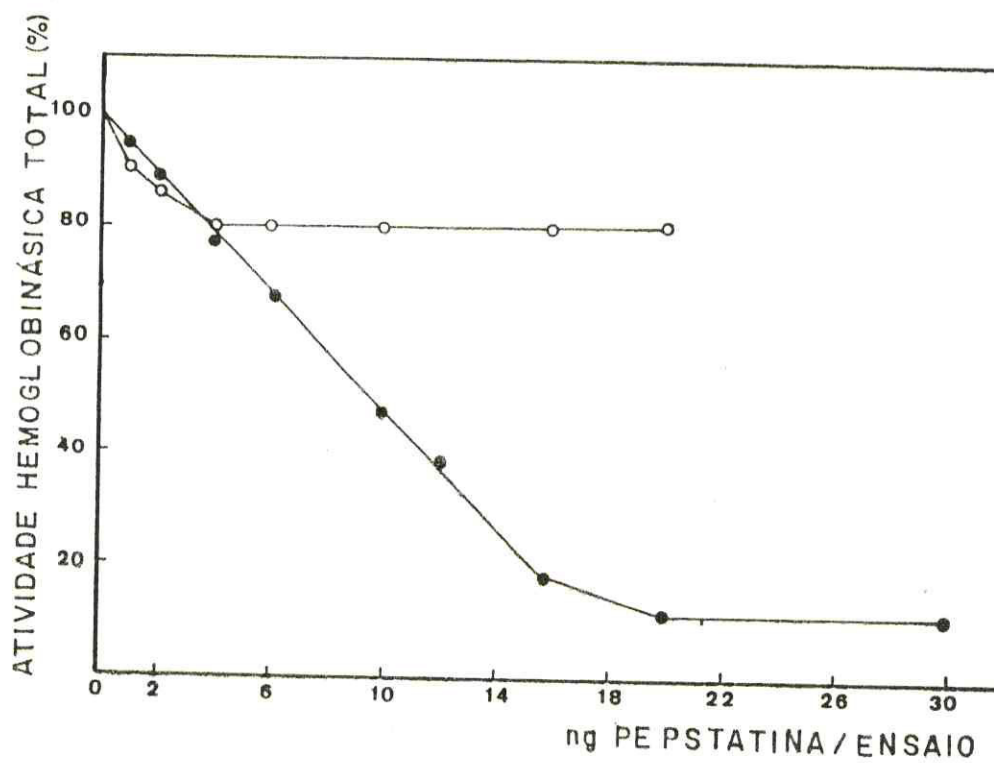


FIGURA 11 - Titulação da atividade hemoglobínica de homogenato intestinal das larvas de *Callosobruchus maculatus* (o—o) e de *Zabrotes subfasciatus* (●—●) com pepstatina. Homogenato intestinal de *C. maculatus* (4 IM/ml) e de *Z. subfasciatus* (1 IM/mT).

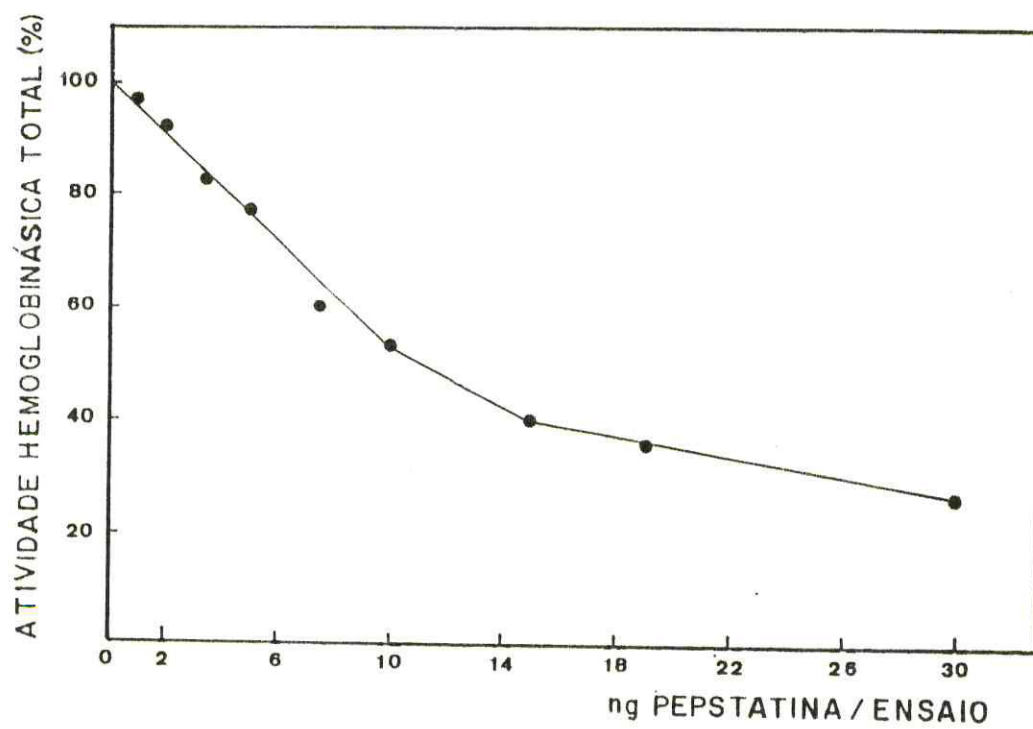


FIGURA 12 - Titulação da atividade hemoglobínica de extra-
to bruto da farinha da cultivar Pitiúba com peps-
tatina. EB contendo 10g de farinha/ml.

TABELA 6 - Comparação das atividades proteínásicas sensíveis a pepstatina ou a E-64 por miligrama de peso seco de intestinos-médios das larvas de Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus e de cotilédones de Vigna unguiculata cv. Pitiúba.

Espécie	pmoles ESep/mgPS	pmoles ESE-64/mgPS
<u>C. maculatus</u>	136,00 ± 9,85 (1)	211,97 ± 15,81 (1)
<u>Z. subfasciatus</u>	598,97 ± 42,06 (4,4)	460,10 ± 6,93 (2,17)
<u>V. unguiculata</u>	1,10 ± 0,10 (0,008)	- (-)

Obs.: Os valores acima são médias de pelo menos três repetições feitas em triplicatas. Os números entre parênteses indicam valores relativos aos valores determinados em C. maculatus.

tinós-médios (regiões proximal, média e distal) mostrou que as duas atividades são maiores na região média dos intestinos-médios das larvas dos dois carunchos, enquanto as regiões proximal e distal apresentam praticamente os mesmos valores de atividade proteínásica em cada espécie (TABELA 7).

4.5 - Medida do pH ao longo dos Intestinos-médios das Larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Para a determinação dos valores de pH ao longo dos IMs de ambas as espécies de bruquídeos foram utilizadas as mesmas secções usadas para a determinação da distribuição das atividades proteínásicas. Nas duas espécies de insetos as três regiões mostraram valores diferentes de pH (TABELA 8). Para *C. maculatus* a região média se mostrou a mais ácida (pH 5,5) e a região proximal a mais alcalina, com uma unidade de pH acima da região média, enquanto a região distal apresentou meia unidade de pH acima da região média. A região média do intestino-médio das larvas de *Z. subfasciatus* também foi a mais ácida (pH 6,0) comparada com a região proximal (pH 7,0) e com a região distal (pH 6,5).

TABELA 7 - Distribuição das atividades hemoglobínica e azo caseinásica nos intestinos-médios das larvas de Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus.

Região	Espécie			
	<u>C. maculatus</u>		<u>Z. subfasciatus</u>	
	UAHb/Região	UAAC/Região	UAHb/Região	UAAC/Região
Proximal	1,46 ± 0,28	0,75 ± 0,07	10,91 ± 2,28	0,67 ± 0,19
Média	3,35 ± 0,69	2,93 ± 0,04	23,67 ± 2,92	3,38 ± 0,39
Distal	1,52 ± 0,18	0,77 ± 0,01	9,66 ± 2,49	0,72 ± 0,22

Obs.: Os valores acima são médias de pelo menos três determinações feitas em triplicata.

TABELA 8 - Determinação de pH ao longo dos intestinos-médios das larvas de Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus.

Região	pH	
	<u>C. maculatus</u>	<u>Z. subfasciatus</u>
Proximal	6,5	7,0
Média	5,5	6,0
Distal	6,0	6,5

5 - DISCUSSÃO

Os resultados sobre a inibição das atividades proteolíticas com pepstatina e E-64 e o fracionamento de homogenatos intestinais das larvas de C. maculatus mostraram inequivocamente a presença de proteinases aspárticas ao lado das proteinases cisteínicas nesta espécie de bruquídeo.

Ficou mostrado que logo na etapa de filtração em Sephadex G-75 proteinases sensíveis a pepstatina e proteinases sensíveis a E-64 foram parcialmente separadas. Embora ambas as atividades hemoglobínica e azocaseínica tenham se distribuído ao longo de toda a faixa de frações com atividade de proteinásica, os perfis destas duas atividades não coincidiram (FIGURA 1). A atividade hemoglobínica se mostrou mais alta numa faixa de alto peso molecular, enquanto a atividade azocaseínica se encontrou deslocada para uma zona de peso molecular menor, passando aí a ser mais alta que a atividade hemoglobínica. É provável que as condições de ensaio da atividade hemoglobínica tenham favorecido a ação de proteinases aspárticas tipo catepsina D, as quais possuem pH ótimo na faixa de 2,8 a 4,0 e são particularmente muito ativas contra hemoglobina (BARRETT, 1977b), enquanto as condições de ensaio da atividade azocaseínica tenham favorecido a ação das proteinases cisteínicas presentes no homogenato intestinal das larvas de C. maculatus, que já ficou demonstrado serem proteinases tipo catepsina B (KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS et al., 1989), as quais se caracterizam por um pH ótimo em torno de 5,0 e são ativadas por cisteína e estabilizadas por agentes quelantes (BARRETT, 1977a; STOREY & WAGNER, 1986).

A FIGURA 2 mostra que de fato duas frações com propriedades mecânicas diferentes se encontravam parcialmente separadas no passo de filtração em Sephadex G-75. Quando as atividades hemoglobínica e azocaseínica foram medidas

separadamente e tratadas com pepstatina e E-64, a atividade hemoglobínásica foi totalmente inibida por pepstatina na região de alto peso molecular, enquanto o restante da atividade não foi inibido ou sofreu inibição somente parcial (FIGURA 2a). O inverso foi observado com a atividade azocaseínásica, pois E-64 inibiu totalmente esta atividade na região de baixo peso molecular, inibindo parcialmente ou não inibindo o restante da atividade que se estendeu à região correspondente àquela sensível a pepstatina.

A fração de alto peso molecular sensível a pepstatina da Sephadex G-75 (fração SA, FIGURA 2a) quando foi submetida à cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose resultou numa única fração com atividade hemoglobínásica (fração CA) (FIGURA 3). A verificação dos efeitos de diversos inibidores de enzimas proteolíticas sobre a atividade hemoglobínásica da fração CA confirmou a presença de proteinase aspártica (TABELA 2). Esta fração foi bastante inibida por pepstatina, enquanto E-64 não teve praticamente nenhuma ação inibitória sobre sua atividade hemoglobínásica. DAN, que também é considerado um inibidor específico de proteinases aspárticas (BARRETT, 1977b) inibiu consideravelmente a atividade da fração CA. A inibição de proteinases aspárticas por diazo compostos é aumentada na presença do íon cúprico (BARRETT, 1977b). Com a fração CA a inibição foi um pouco aumentada na presença de Cu^{2+} , no entanto da mesma forma que observado por HOUSEMAN & DOWNE (1982a) com Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae), o íon cúprico sozinho foi capaz de inibir bastante a atividade hemoglobínásica da fração estudada. HOUSEMAN & DOWNE (1982a) sugeriram que apesar da inibição pelo íon cúprico não ter sido observada com pepsina e catepsina D, que são as proteinases aspárticas mais conhecidas, este íon pode interagir com um grupo carboxílico essencial na proteinase do inseto inibindo-a. A fração CA não foi inibida pelos inibidores de proteinases serínicas TLCK e TPCK e nem pelos agentes quelantes EDTA e 1,10-fenantrolina. A inibição por AIA pode ser considerada inespecífica, pois é possível que este composto como um potente agente alquilante seja capaz de mo-

dificar um grupo reativo na molécula da proteinase resultando em inibição.

O pH ótimo de hidrólise de hemoglobina pela fração CA foi igual a 3,3, mostrando um deslocamento em relação ao pH ótimo de hidrólise de hemoglobina pelo homogenato intestinal que foi igual a 4,0 (FIGURA 4). O deslocamento do pH ótimo de hidrólise de um substrato exógeno por uma fração aspártica isolada em relação ao pH ótimo do homogenato intestinal foi também observado em R. prolixus, indicando a presença de outra proteinase com pH ótimo mais elevado, provavelmente catepsina B (HOUSEMAN & DOWNE, 1982a,b).

A hidrólise de albumina sérica pela fração CA representou 30% do valor da hidrólise de hemoglobina (TABELA 3). A comparação da hidrólise destes dois substratos é um meio de diferenciar se uma proteinase aspártica é do tipo pepsina ou catepsina D (BARRETT, 1977b). Enquanto pepsina hidrolisa os dois substratos igualmente bem, catepsina D hidrolisa albumina pelo menos a um valor 10% menor da velocidade de hidrólise de hemoglobina. Apesar do valor obtido com a fração CA ter excedido este valor, ela se aproxima mais das características de uma proteinase tipo catepsina D.

Um fato interessante ocorrido durante o fracionamento do homogenato intestinal das larvas de C. maculatus a pH 6,0 foi a diferença nas posições de eluição dos picos de atividade hemoglobínica sensíveis a pepstatina na coluna de Sephadex G-75. Quando o homogenato intestinal foi aplicado à coluna de Sephadex G-75 a fração com atividade hemoglobínica sensível a pepstatina (fração SB, FIGURA 5) foi eluída no volume de exclusão da coluna. A fração SB foi então submetida a uma cromatografia de troca iônica e quando a fração hemoglobínica obtida (fração CB, FIGURA 6) foi repassada na coluna de Sephadex G-75 o pico de atividade sensível a pepstatina foi eluído não mais no volume de exclusão, mas numa zona correspondente a um peso molecular de 62.000D (FIGURA 7). Isto se deve provavelmente à complexação da proteinase aspártica com proteínas e/ou peptídeos inativos oriundos da semente, e quando se avançou na purificação da enzima

o complexo foi total ou parcialmente desfeito, de modo que a enzima passou a ser mais retida pelo gel. Casos semelhantes de diferentes posições de eluição e de formação de complexos entre proteinases aspárticas e proteínas inativas de sementes foram descritos em arroz (DOI *et al.*, 1980) e em sementes de V. unguiculata (LOPES *et al.*, 1989). Devido a este fato é provável que a determinação do peso molecular da fração SC (FIGURA 7) esteja superestimado, sendo necessária a realização de outros experimentos que possibilitem obter a enzima não complexada. A falta de material devida aos baixos níveis de recuperação da atividade enzimática não tornaram possível levar a cabo experimentos neste sentido.

Outro fato importante observado fôï a grande instabilidade das frações proteinásicas aspárticas à medida que se avançava no processo de isolamento, tornando difícil seu manuseio. Como mostram as TABELAS 1 e 4 os rendimentos em ambas as condições de pH usadas foram muito baixos. No entanto deve ser lembrado o fato que somente parte da atividade hemoglobínica do passo de filtração em dextrana foi recuperada na forma de frações sensíveis a pepstatina, e que todos os passos de purificação mostrados nas TABELAS 1 e 4 se referem à atividade dos homogenatos intestinais, que apresentam a ação combinada de pelo menos dois tipos de proteinases. Baixos níveis de recuperação também foram observados no isolamento da catepsina D de Triatoma phillosoma pallidipennis (HOUSEMAN & DOWNE, 1982a) e a purificação de uma catepsina D a partir de pupas de Aldrichina grahani só foi possível com a tomada de medidas para a estabilização da atividade enzimática (KAWAMURA *et al.*, 1987).

Os estudos sobre proteinases digestivas das larvas de C. maculatus feitos até agora se referiram exclusivamente à presença de proteinases cisteínicas (GATEHOUSE *et al.*, 1985; KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS *et al.*, 1989). O uso do homogenato intestinal não fracionado e a não utilização de inibidores específicos de proteinases aspárticas na investigação dos tipos de proteinases presentes nos IMs das larvas de C. maculatus podem explicar em parte o fato de GATEHOUSE *et al.*

(1982) não terem encontrado indícios da presença de proteínas aspárticas no estudo feito usando mioglobina e vicilina como substratos. HOUSEMAN & DOWNE (1982a,b) chamaram a atenção para o fato de não ter sido possível a caracterização da catepsina D dos IMs de R. prolixus e T. phillosoma pallidipennis antes do fracionamento dos homogenatos intestinais devido à interferência da presença de catepsina B.

KITCH & MURDOCK (1986) purificaram parcialmente uma fração do homogenato intestinal das larvas de C. maculatus com propriedades típicas de proteinase cisteínica como ativação por agentes tiólicos, inibição por agentes bloqueadores de grupos SH e com pH ótimo de hidrólise de ³Hmethemoglobina igual a 5,0. Esta fração cisteínica parcialmente purificada apresentou características de catepsina B, sendo a primeira vez que se encontrou proteinase catéptica agindo extracelularmente em insetos fora da ordem Hemiptera, onde foram primeiramente descritas.

CAMPOS et al. (1989) isolaram três frações proteínicas todas com características de catepsina B a partir de HI das larvas de C. maculatus. Estas frações foram diferentemente retidas em gel de DEAE-Celulose, no entanto todas apresentaram o mesmo peso molecular em torno de 25.000D e o mesmo pH ótimo de hidrólise de azocaseína, possivelmente representando diferentes formas isoenzimáticas.

Outras duas espécies de bruquídeos tiveram suas proteinases digestivas isoladas e parcialmente caracterizadas. Em Acanthoscelides obtectus a fração denominada de "proteína se purificada" por WIEMAN & NIELSEN (1987) teve sua atividade de contra ³Hmethemoglobina inibida em 92% por pCMB 0,1M, 69% por E-64 0,01mM, 100% por E-64 0,1mM e 100% por pepstatina 0,01mM. A fração foi ativada por cisteína e DTT e apresentou dois ótimos de pH para hidrólise de hemoglobina. WIEMAN & NIELSEN (1987) admitiram que a posse de dois pHs ótimos pelo homogenato intestinal sugeria a presença de mais de uma proteinase digestiva, no entanto não fizeram nenhum comentário a respeito dos dois pHs ótimos apresentados pela "proteínase purificada", a qual foi considerada como uma proteinase cis-

teínica semelhante à isolada em C. maculatus por KITCH & MURDOCK (1986).

Em Z. subfasciatus foi demonstrada pela primeira vez a presença de proteinase aspártica, além das proteinases cisteínicas em intestinos-médios das larvas de um bruquídeo (LEMOS, 1988). Estas duas classes de proteinases não foram separadas por filtração em Sephadex G-75, somente sendo isoladas por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose. Neste aspecto as proteinases digestivas de Z. subfasciatus diferiram das proteinases de C. maculatus que foram separadas por filtração em gel.

O uso de proteinases catépticas para digestão extracelular de proteínas em insetos foi descrito pela primeira vez em hemípteros hematófagos (HOUSEMAN, 1978; HOUSEMAN & DOWNE, 1980, 1981, 1982a,b). Segundo HOUSEMAN et al. (1985) estes hemípteros heterópteros evoluíram de ancestrais tipo homópteros sugadores de seiva vegetal, os quais perderam as suas proteinases serínicas originais uma vez que suas dietas eram isentas de proteínas. Ao retornarem a uma dieta rica em proteínas os ancestrais dos heterópteros passaram a se utilizar de proteinases lisossomais. No entanto, a existência de famílias de heterópteros que se utilizam de proteinases serínicas contraria esta hipótese (TERRA, 1988). Uma hipótese alternativa para a evolução dos hemípteros hematófagos foi proposta por TERRA (1988) observando que os bruquídeos também se utilizam de proteinases lisossomais como catepsina B (KITCH & MURDOCK, 1986; CAMPOS et al., 1989). Como estes coleópteros se alimentam de sementes de leguminosas ricas em inibidores de proteinases serínicas, o uso de proteinases lisossomais pode ter evoluído em resposta à pressão seletiva exercida pela presença desses inibidores. Similarmente, o uso dos mesmos tipos de proteinases pelos reduvídeos e outros hemípteros hematófagos pode ser resultado destes insetos terem evoluído a partir de hemípteros sugadores de sementes da mesma forma ricas em inibidores de proteinases serínicas.

As propriedades da proteinase aspártica isolada de

C. maculatus, como o pH ótimo e a alta reatividade contra hemoglobina, a caracterizam como uma proteinase tipo catepsina D, com exceção do peso molecular de 62:000D, que está fora da faixa típica para catepsinas D (40.000 - 50.000) (BARRETT, 1977b). Este fato está de acordo com as semelhanças observadas entre bruquídeos e hemípteros hematófagos. É provável que a proteinase aspártica isolada de Z. subfasciatus (LEMONS, 1988) também seja uma catepsina D, e que a inibição por pepstatina e as evidências de uma outra proteinase além da proteinase cisteínica detectada em A. obtectus (WIEMAN & NIELSEN, 1987) também representem a presença desse tipo de proteinase lisossomal. Provavelmente a presença de proteinases lisossomais como proteinases digestivas seja um caso geral entre os bruquídeos.

Uma vez demonstrada a presença de proteinases aspárticas e cisteínicas em IMs larvais de C. maculatus e Z. subfasciatus surgem as questões a respeito da quantidade e distribuição destas enzimas e das condições de pH em que elas se encontram no trato intestinal das duas espécies de carunchos. Estas questões se tornaram relevantes em virtude de dois fatos: primeiro, as evidências do envolvimento de fatores protéicos de natureza globulínica no mecanismo de resistência de certas cultivares de V. unguiculata a C. maculatus e segundo, a observação de que as larvas de Z. subfasciatus se desenvolvem bem tanto nas cultivares resistentes como nas suscetíveis a C. maculatus (XAVIER-FILHO et al., 1989).

A quantificação das proteinases aspárticas e cisteínicas em IMs das larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus demonstrou que em C. maculatus as proteinases cisteínicas predominam em relação às proteinases aspárticas, e o contrário ocorre em Z. subfasciatus, pois nesta espécie as proteinases aspárticas são predominantes (TABELA 6). A comparação interespecífica mostrou que Z. subfasciatus apresenta mais atividade proteinásica do que C. maculatus em termos molares, tendo 4,4 vezes mais proteinase aspártica e 2,1 vezes mais proteinase cisteínica (TABELA 6).

A comparação das atividades hemoglobínica e azocaseinásica entre os HIs das larvas dos dois bruquídeos (FIGU-

RAS 8 e 9) reforça os dados das titulações, que mostraram uma maior quantidade de proteinase aspártica, possivelmente tipo catepsina D em Z. subfasciatus. Como este tipo de proteinase apresenta uma grande reatividade contra hemoglobina (BARRETT, 1977b) a maior concentração de catepsina D em Z. subfasciatus levou a uma grande diferença nas curvas de atividade hemoglobínica (FIGURA 8), enquanto a diferença nas curvas de atividade azocaseinásica não foi tão acentuada (FIGURA 9), pois as condições do ensaio desta atividade favorecem a ação de catepsina B, que não está presente numa diferença tão grande entre os dois bruquídeos (Ver TABELA 6).

O fato das sementes maduras de V. unguiculata também possuírem proteinases aspárticas (LOPES et al., 1989) chama a atenção para a possibilidade de interferência destas enzimas nas determinações de atividade hemoglobínica feitas com os homogenatos intestinais. Porém, como mostram as TABELAS 5 e 6 a atividade hemoglobínica específica e a quantidade em termos molares de proteinase aspártica nas sementes são muito menores do que nos insetos.

A determinação da distribuição das atividades hemoglobínica e azocaseinásica mostrou que ambas as atividades são maiores na região média dos IMs das duas espécies de bruquídeos (TABELA 7). A região média dos IMs também se mostrou a mais ácida em relação às outras regiões em que foram divididos os IMs das duas espécies de carunchos (TABELA 8). Os resultados com relação aos valores de pH aqui determinados contrastam com os valores obtidos em IM de C. maculatus por KITCH & MURDOCK (1986), e com os valores obtidos em IM de A. obtectus por WIEMAN & NIELSEN (1987) uma vez que estes autores não tiveram a preocupação de fazer medidas de pH em diferentes regiões, mencionando um único valor de pH para todo o IM (6,1 para C. maculatus e 6,5 para A. obtectus).

As diferenças nos sistemas proteínasicos digestivos de C. maculatus e Z. subfasciatus, em particular a grande diferença de proteinases aspárticas, podem estar relacionadas à capacidade de se desenvolver ou não em determinadas cultivares de V. unguiculata. Provavelmente o maior potencial pro:

teinásico digestivo das larvas de Z. subfasciatus as torne capazes de se desenvolver nas cultivares resistentes a C. maculatus.

6 - CONCLUSÕES

1 - Larvas de Callosobruchus maculatus se utilizam, da mesma forma que as larvas de Zabrotes subfasciatus, de proteinases aspárticas e cisteínicas para digerirem as proteínas de suas sementes hospedeiras.

2 - A proteinase aspártica isolada de IMs das larvas de C. maculatus apresenta propriedades semelhantes às de catepsina D.

3 - Proteinases cisteínicas predominam em termos molares em relação às proteinases aspárticas de IM das larvas de C. maculatus, enquanto em IM das larvas de Z. subfasciatus as proteinases aspárticas predominam em relação às proteinases cisteínicas.

4 - Em termos de atividade específica, os IMs das larvas de Z. subfasciatus apresentam 3,8 vezes mais atividade hemoglobínica e 1,8 vezes mais atividade azocaseinásica do que os IMs das larvas de C. maculatus.

5 - Os IMs das larvas de Z. subfasciatus apresentam 4,4 vezes mais proteinases sensíveis a pepstatina e 2,1 vezes mais proteinases sensíveis a E-64 do que os IMs das larvas de C. maculatus.

6 - A distribuição das atividades hemoglobínica e azocaseinásica não é uniforme ao longo dos IMs das larvas de C. maculatus e Z. subfasciatus, sendo ambas as atividades maiores na região média dos IMs das larvas dos dois bruquídeos.

7 - O pH varia ao longo dos IMs das larvas de Z. subfasciatus e C. maculatus, sendo a região média dos IMs a mais ácida, a região proximal a mais alcalina, com uma unidade de pH acima da região média, e a região distal intermediária, com meia unidade de pH acima do valor da região média.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLEBAUM, S.W. Physiological aspects of host specificity in the Bruchidae - I. General considerations of developmental compatibility. J. Ins. Physiol., Vol. 10, pp. 783-788 (1964).
- BAKER, T.A., NIELSEN, S.S., SHADE, R.E. & SINGH, B.B. Physical and chemical attributes of cowpea lines resistant and susceptible to Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). J. stored Prod. Res., Vol. 25, N. 1, pp. 1-8 (1989).
- BARRETT, A.J. Cathepsin B and other thiol proteinases. In "Proteinases from Mammalian Cells and Tissues", pp. 181-208, Barrett, A.J. ed., North-Holland, Amsterdam (1977a).
- BARRETT, A.J. Cathepsin D and other carboxyl proteinases. In "Proteinases from Mammalian Cells and Tissues", pp. 209-248 Barrett, A.J. ed., North-Holland, Amsterdam (1977b).
- BASTOS, J.A.M. Avaliação dos prejuízos causados pelo gorgulho Callosobruchus maculatus em amostras de feijão-de-corda, Vigna sinensis, colhidas em Fortaleza, Ceará. Pesq. Agropec. Bras., 8, pp. 131-132 (1973).
- BIRCH, A.N.E., FELLOWS, L.E., EVANS, S.V. & DOHERTY, K. Para-aminophenylalanine in Vigna: possible taxonomic and ecological significance as a seed defence against bruchids. Phytochemistry, Vol. 25, N. 12, pp. 2745-2749 (1986).
- BOOKER, R.H. Observations on three bruchids associated with cowpea in Northern Nigeria. J. stored Prod. Res., Vol. 3, pp. 1-15 (1967).
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-154 (1976).
- CAMPOS, F.A.P., XAVIER-FILHO, J., SILVA, C.P. & ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid

- beetle Callosobruchus maculatus (F.). Comp. Biochem. Physiol., Vol. 92B, N. 1, pp. 51-57 (1989).
- CHANDRAKANTHA, J. & MATHAVAN, S. Changes in developmental rates and biomass energy in Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae) reared on different foods and temperatures. J. Stored Prod. Res., Vol. 22, N. 2, pp. 71-75 (1986).
- 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).
- CREDLAND, P.F. Effect of host availability on reproductive performance in Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 22, N. 1 pp. 49-54 (1986).
- CREDLAND, P.F. Effect of host change on the fecundity and development of an unusual strain of Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 23, N. 2 pp. 91-98 (1987).
- CREDLAND, P.F. & DICK, K.M. Food consumption by larvae of three strains of Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 23, N. 1 pp.31-40 (1987)
- CREDLAND, P.F., DICK, K.M. & WRIGHT, A.W. Relationships between larval density, adult size and egg production in the cowpea seed beetle, Callosobruchus maculatus. Ecological Entomology 11, 41-50 (1986).
- DICK, K.M. & CREDLAND, P.F. Egg production and development of three strains of Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 20, N. 4 pp. 221-227 (1984).
- DICK, K.M. & CREDLAND, P.F. Variations in the response of Callosobruchus maculatus (F.) to a resistant variety of cowpea. J. Stored Prod. Res., Vol. 22, N. 1 pp. 43-48 (1986a).

- DICK, K.M. & CRADLAND, P.F. Changes in the response of Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae) to a resistant variety of cowpea. J. Stored Prod. Res., Vol. 22, N. 4 pp. 227-233 (1986b).
- DOI, E., SHIBATA, D., MATOBA, T. & YONEZAWA, D. Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. Agric. Biol. Chem., 44(4), 741-747 (1980).
- DOMENICHINI, G. Contributo alla conoscenza del Callosobruchus maculatus F. e dei suoi parassiti. Bulletino di Zool. Agri. e Bach., Torino, 17(2) pp. 101-122 (1951).
- FREIRE-FILHO, F.R. Origem, evolução e domesticação do caupi. Em "O Caupi no Brasil", Watt, E.E. & Araújo, J.P.P. eds., Embrapa-IITA, Ibadan, Nigéria, pp. 27-46 (1988).
- GATEHOUSE, A.M.R. Antinutritional proteins in plants. In "Developments in Food Proteins", Vol. 3, pp. 245-293, Hudson, B.J.F. ed., Elsevier, Londres (1984).
- 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. Entomol. Exp. Appl., 39, 279-286 (1985).
- 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).
- GOLOB, P. & KILMINSTER, A. The biology and control of Zabrotes subfasciatus (Boheman) (Coleoptera : Bruchidae) infesting red kidney beans. J. Stored Prod. Res., Vol. 18, pp. 95-101 (1982).
- HANADA, K., TAMAI, M., MOROMOTO, S., ADACHI, T. OHMURAK, S., SAWADA, J. & TAWAKA, I. Inhibitory activities of E-64 derivatives on papain. Agric. Biol. Chem., 42, 537-541 (1978).

- HEYWOOD, V.H. The Leguminosae - A systematic purview. In "Chemotaxomy of the Leguminosae", pp. 1-29, Harborne, J.B., Boulter, D. & Turner, B.L. eds., Academic Press, Londres (1971).
- HOUSEMAN, J.G. A thiol-activated digestive proteinase from adults of Rhodnius prolixus Stål (Hemiptera : Reduviidae). Can. J. Zool. 56, 1140-1143 (1978).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Endoproteinase activity in the posterior midgut of Rhodnius prolixus Stål (Hemiptera : Reduviidae). Insect Biochem., Vol. 10, pp. 363-66 (1980).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Identification and partial characterization of digestive proteinases from Triatoma phyllosoma pallidipennis Stål (Hemiptera : Reduviidae). Comp. Biochem. Physiol., Vol. 70B, pp. 713-717 (1981).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of Rhodnius prolixus Stål (Hemiptera : Reduviidae). Insect Biochem., Vol. 12, N. 6, pp. 651-655 (1982a).
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Identification and partial characterization of digestive proteinases from two species of bedbug (Hemiptera : Cimicidae). Can. J. Zool., 60:1837-1840 (1982b).
- HOUSEMAN, J.G., MORRISON, P.E. & DOWNE, A.E.R. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of Phymata wolffii Stål (Hemiptera : Phymatidae). can. J. Zool., 63:1288-1291 (1985).
- 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, pp. 437-477 (1964).
- JACKAI, L.E.N. & DAOUST, R.A. Insect pests of cowpeas. Ann. Rev. Entomol. 31:95-119 (1986).
- JANZEN, D.H. How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae : Callosobruchus maculatus) die on nonhost seeds. Ecology 58, pp. 921-927 (1977).
- JANZEN, D.H. Specificity of seed attacking beetles in a Costa Rican deciduous forest. Journal of Ecology, 68, pp. 929-952 (1980).

- JANZEN, D.H. The defences of legumes against herbivores. In "Advances in Legume Systematics", pp. 951-977, Polhill, R.M. & Raven, P.H. eds., Royal Botanic Gardens, Kew (1981).
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.B. & BELL, E.A. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle Callosobruchus maculatus. Phytochemistry, Vol. 16, pp. 223-227 (1977).
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.B. & LIENER, I.E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. Science, 192:795-796 (1976).
- JANZEN, D.H., RYAN, C.A., LIENER, I.E. & PEARCE, G. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. J. Chem. Ecol., Vol. 12, N. 6 (1986).
- JOHNSON, C.D. Seed beetle host specificity and the systematic of the Leguminosae. In "Advances in Legume Systematics", pp. 995-1027, Polhill, R.M. & Raven, P.H. eds., Royal Botanic Gardens, Kew (1981).
- KAWAMURA, M., WADANO, A. & MIURA, K. Purification and characterization of insect cathepsin D. Insect Biochem., Vol. 17, N. 1, pp. 77-83 (1987).
- KITCH, L.W. & MURDOCK, L.L. Partial characterization of a major proteinase from larvae of Callosobruchus maculatus (F.). Arch. Insect Biochem. Physiol. 3(6), pp. 561-576 (1986).
- LEMOIS, F.J.A. Estudo sobre as proteinases e amilases de larvas de Zabrotes subfasciatus (Boh.) (Coleoptera : Bruchidae). Tese de Mestrado defendida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC (1988).
- LOPES, C.F., AINOUIZ, I.L., SILVA, C.P. & XAVIER-FILHO, J. Acidic proteinases from resting cotyledons of cowpea (Vigna unguiculata). Arq. Biol. Tecnol., 32(3):507-514 (1989).
- LOWRY, O.H., ROSEBORGH, N.J., FARR, A.L. & RANDLL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, pp. 265-275 (1951).

- MEIK, J. & DOBIE, P. The ability of Zabrotes subfasciatus to attack cowpeas. Entomol. Exp. Appl. 42, pp. 151-158 (1986).
- MESSINA, F.J. Resistance of Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae) in selected cowpea lines. Envir. Entomol., 14, pp. 868-872 (1984).
- NG, N.R. & MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin and germ plasm. In "Cowpea, Research, Production and Utilization", pp. 11-21, Singh, S.R. & Rachie, K.O. eds., John Wiley & Sons, Chichester (1985).
- NIELSEN, S.S. Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases - A review. Cereal Chem. 65(5): 435-442 (1988).
- ODUM, E.P. "Ecologia", primeira edição, Rio de Janeiro, Interamericana, 434pp. (1985).
- PIMBERT, M.P. Reproduction and oviposition preferences of Zabrotes subfasciatus stocks reared from two host plant species. Entomol. Exp. Appl., 38, pp. 273-276 (1985).
- PREVETT, P.F. Field infestation of cowpea (Vigna unguiculata) pods by beetles of the families Bruchidae and Curculionidae in Northern Nigeria. Bull. Entomol. Res., 52(4):635-645 (1961).
- PUSZTAI, A. Lectins. In "Toxicants of Plant Origin", Vol. III, pp. 29-71. SHEEKE, P.R. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
- REDDEN, R.I., DOBIE, P. & GATEHOUSE, A.M.R. The Inheritance of seed resistance to Callosobruchus maculatus F. in cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.). I Analyses of parental, F₁, F₂, F₃ and Backcross seed Generations. Aus. J. Agric. Res. 34, 681-695 (1983).
- SALES, M.G. & RODRIGUEZ, M.A.C. Consumo, qualidade nutricional e métodos de preparo do caupi. Em "O Caupi no Brasil", pp. 697-722, Watt, E.E. & Araújo, J.P.P. eds., Embrapa-IITA Ibadan, Nigéria (1988).
- SANO-FUJII, I. Effect of bean water content on the production of the active form of Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera : Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 20, N. 3, pp. 153-161 (1984).

- SANO-FUJII, I. The genetic basis of the production of the active form of Callosobruchus maculatus (F.) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res., Vol. 22, N. 3, pp. 115-123 (1986).
- SANTOS, J.H.R. Aspectos da biologia do Callosobruchus maculatus (Fabr., 1775) (Col., Bruchidae) sobre sementes de Vigna sinensis Endl. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura, Piracicaba (1971).
- SANTOS, J.H.R., ARAÚJO, J.P.P. & QUINDERÉ, M.A.W. Distribuição importância e manejo das pragas do caupi no Brasil. Em "O Caupi no Brasil", pp. 607-658, Watt, E.E. & Araújo, J.P.P. eds., Embrapa-IITA, Ibadan, Nigéria (1988).
- SIMMONDS, M.S.J., BLANEY, W.M. & BIRCH, A.N.E. Legume seeds: the defences of wild and cultivated species of Phaseolus against attack by bruchid beetles. Annals of Botany 63, pp. 177-184 (1989).
- SINGH, S.R. & RACHIE, K.O. eds., Cowpea, Research, Production and Utilization (John Wiley and Sons, Chichester)(1985).
- SOUTHGATE, B.J. Biology of the Bruchidae. Ann. Rev. Entomol., 24:449-473 (1979).
- STOREY, R.D. & WAGNER, F.W. Plant Proteases: A need for uniformity. Phytochemistry, Vol. 25, N. 12, pp. 2701-2709 (1986).
- TEIXEIRA, S.M., MAY, P.H. & SANTAN, A.C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. Em "O Caupi no Brasil", pp. 101-136, Watt, E.E. & Araújo, J.P.P. eds., Embrapa-IITA, Ibadan, Nigéria (1988).
- TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. Brazilian J. Med. Biol. Res., 21:675-734 (1988).
- UMEZAWA, H. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. In "Methods Enzimology", Vol. 45, pp. 678-695, Lorand, L. ed., Academic Press, New York (1978).
- WARUI, C.M. Bruchid infestation of cowpea varieties in the field. Insect Sci. Appl., Vol. 5, N. 4 pp. 283-286 (1984).

- WASSERMAN, S.S. Genetic variation in adaptation to foodplants among populations of the southern cowpea weevil, Callosobruchus maculatus: evolution of oviposition preference. Entomol. Exp. Appl. 42:201-212 (1986).
- WIEMAN, K.F. & NIELSEN, S.S. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval Acanthoscelides obtectus Say (Coleoptera : Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol., Vol. 89B, pp. 419-426 (1987).
- XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F.A.P., ARY, M.B., SILVA, C.P., CARVALHO, M.M.M., MACEDO, M.L.R., LEMOS, F.J.A. & GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (Vigna unguiculata) and the resistance/susceptibility to predation by Callosobruchus maculatus. J. Agric. Food Chem., 37, pp. 1139-1143 (1989).
- 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).
- XAVIER-FILHO, J. & VENTURA, M.M. Trypsin inhibitors in cowpea: a review. Comments Agric. & Food Chem., Vol. 1, N. 5, pp. 239-264 (1988).