

RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) E INIBIDORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE *Vigna sinensis* (L.) Savi

Afranio Neri Coelho

---

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de  
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1980

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 do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Afranio Neri Coêlho

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

[Redacted Signature]

\_\_\_\_\_  
José Xavier Filho

Orientador da Dissertação

[Redacted Date]

\_\_\_\_\_  
Data

[Redacted Signature]

\_\_\_\_\_  
Iracema Lima Ainouz

[Redacted Date]

\_\_\_\_\_  
Data

[Redacted Signature]

\_\_\_\_\_  
Renato de Azevedo Moreira

[Redacted Date]

\_\_\_\_\_  
Data

À memória de meu pai

## AGRADECIMENTOS

Ao professor José Xavier Filho, pela orientação dedicada e amiga durante a realização deste trabalho.

Aos professores Renato de Azevedo Moreira e Iracema Lima Ainouz, pelas valiosas sugestões e discussões apresentadas durante a execução do presente trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas, nas pessoas do Magnífico Reitor e do Chefe do Departamento de Química, sem cuja valiosa colaboração não teria sido possível concretizar este trabalho.

A todos os professores, colegas e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo incentivo e cooperação.

Finalmente, agradeço, de modo especial, a minha mulher, minha mãe e meus irmãos que, direta ou indiretamente, muito contribuíram para a realização do presente trabalho

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES/PICD), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor e pelo convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

## ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ABREVIATURAS USADAS .....	xii
SUMÁRIO .....	xiii
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
A- MATERIAIS .....	10
B- MÉTODOS .....	11
1. Preparação da farinha de feijão .....	11
2. Preparação dos extratos de farinha .....	11
3. Criação de insetos .....	12
4. Preparação dos extratos de insetos .....	12
5. Preparação dos extratos de detritos .....	12
6. Preparação dos extratos de pupas .....	13
7. Preparação de azo-caseína .....	13
8. Preparação de inibidor bruto de feijão ...	15
9. Determinação de proteína .....	17
10. Preparação das soluções utilizadas como substratos .....	17
10.1. Caseína .....	17
10.2. Hemoglobina .....	18
10.3. Azo-caseína .....	18
11. Determinação de atividades enzimáticas ...	18
11.1. Atividade azo-caseinásica .....	18
11.1.1. Concentrações ótimas de subs_ trato e enzima .....	18
11.1.2. Efeito do pH .....	19

11.1.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação .....	20
11.1.4. Unidade de atividade azo-caseinásica .....	20
11.2. Atividade hemoglobínica .....	21
11.2.1. Concentrações ótimas de substrato e enzima .....	21
11.2.2. Efeito do pH .....	21
11.2.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação .....	22
11.2.4. Unidade de atividade hemoglobínica .....	23
11.3. Atividade trípica e quimiotrípica .	23
11.4. Atividade da pepsina .....	24
12. Determinação da atividade inibitória .....	25
13. Filtração em gel dextrana .....	26
14. Nitrogênio amino-solúvel .....	27
15. Resistência de sementes ao <i>C. maculatus</i> ...	27
16. Ação da hemoglobina de pupa sobre o IB ..	28
17. Ação da azo-caseinase de pupa sobre o IB ..	29
III. RESULTADOS .....	30
1. Características das pupas utilizadas .....	30
2. Condições de ensaio .....	30
3. Nitrogênio amino-solúvel .....	44
4. Filtração em gel dextrana .....	44
5. Atividade inibitória .....	48
6. Presença de inibidores em pupas de <i>C. maculatus</i> .....	54
7. Resistência de sementes ao <i>C. maculatus</i> .....	58
8. Ação das proteases de pupas sobre o IB .....	58

	Página
IV. DISCUSSÃO .....	61
V. CONCLUSÕES .....	68
VI. BIBLIOGRAFIA .....	70



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efeito do pH sobre a atividade hemoglobínasi- ca de pupa .....	31
2. Efeito da temperatura sobre a atividade hemo- globinásica de pupa .....	32
3. Efeito do tempo sobre a atividade hemoglobiná- sica de pupa .....	33
4. Efeito da concentração de hemoglobina sobre a atividade hemoglobínásica de pupa .....	34
5. Atividade da hemoglobinase de pupa .....	36
6. Efeito do pH sobre a atividade azo-caseinási- ca de pupa .....	38
7. Efeito da temperatura sobre a atividade azo- caseinásica de pupa .....	39
8. Efeito do tempo sobre a atividade azo-caseinã- sica de pupa .....	41
9. Efeito da concentração de azo-caseína sobre a atividade azo-caseinásica .....	42
10. Atividade da azo-caseinase de pupa .....	43
11. Cromatografia em Sephadex G-100 a pH 7,6 de extrato de pupa .....	47
12. Cromatografia em Sephadex G-100 a pH 5,0 de extrato de pupa .....	49

13.	Efeito da concentração de IB de <i>Vigna sinensis</i> sobre a atividade hemoglobínásica de pupa ....	50
14.	Efeito da concentração de IB de <i>Vigna sinensis</i> sobre a atividade azo-caseinásica de pupa ....	52
15.	Efeito da concentração de IB de <i>Vigna sinensis</i> sobre a atividade da tripsina .....	53
16.	Efeito inibitório do extrato bruto de <i>Vigna <u>si</u>nensis</i> sobre a atividade azo-caseinásica .....	55
17.	Efeito inibitório do extrato bruto de <i>Vigna <u>un</u>guiculata</i> sobre a atividade azo-caseinásica ..	56
18.	Correlação entre a emergência de adultos de <i>C. maculatus</i> e a concentração de inibidores de tripsina da semente .....	59
19.	Correlação entre a emergência de adultos de <i>C. maculatus</i> e a concentração de inibidores de azo-caseinase da semente .....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
1. Comparação entre as atividades enzimáticas de pupas e adultos de <i>C. maculatus</i> .....	37
2. Comparação entre a atividade hemoglobínica de pupa e a atividade da pepsina .....	45
3. Comparação entre a atividade azo-caseinásica de pupa e a atividade da pepsina .....	46
4. Inibição da tripsina e das proteases ácidas da pupa pelo IB de <i>Vigna sinensis</i> .....	51

## ABREVIATURAS USADAS

IB	- inibidor bruto
IT	- inibidor de tripsina
UE	- unidade de enzima
UI <sub>T</sub>	- unidade de inibidor de tripsina
UI <sub>AzC-ase</sub>	- unidade de inibidor de azo-caseinase
UI <sub>Hb-ase</sub>	- unidade de inibidor de hemoglobinaase
U <sub>AzC-ase</sub>	- unidade de azo-caseinase
U <sub>Hb-ase</sub>	- unidade de hemoglobinaase
Prot	- proteina
Peps	- pepsina
Leu	- leucina

## SUMÁRIO

Pupas de *Callosobruchus maculatus* apresentam forte atividade proteolítica em pH ácido. Utilizando-se hemoglobina e azo-caseína como substrato foram detectados valores de pH ótimos de 3,5 e 5,0, respectivamente. As atividades hemoglobinásica e azo-caseinásica são mais forte em pupas que em adultos, sendo que a atividade hemoglobinásica é cerca de 17 vezes mais forte que a atividade azo-caseinásica.

O extrato bruto de pupa de *Callosobruchus maculatus*, quando submetido a filtração em gel dextrana (Sephadex G-100) em pH 5,0 e 7,6 mostra dois componentes: o componente "A" de peso molecular em torno de 104.000 daltons, encerrando as atividades hemoglobinásica e azo-caseinásica e um componente "B" sem estas atividades e com peso molecular em torno de 6.000 daltons. É evidente a presença de um componente com atividade hemoglobinásica na região de peso molecular em torno de 30.000 daltons.

É evidente a presença de um inibidor de quimiotripsina em pupas de *C. maculatus*. Este inibidor pode ser um fragmento ativo do inibidor de "dupla-cabeça" tripsina/quimiotripsina. Os inibidores de tripsina, hemoglobinase e azo-caseinase podem ser fatores responsáveis pela resistência do cultivar TVu-2027 ao ataque de *C. maculatus*.

## INTRODUÇÃO

Cerca de 30% da produção mundial de grãos se perde durante o armazenamento, estimando-se que as perdas brasileiras sejam da ordem de 20%. Estas perdas são principalmente devidas à infestação por insetos (40).

No Nordeste do Brasil, onde estão concentradas as populações de mais baixa renda do país, o feijão representa uma das mais importantes fontes de proteína. Nesta região 90% da área cultivada com feijão é destinada ao cultivo do gênero *Vigna*.

De acordo com dados do IBGE (14) a produção total de feijão no Brasil em 1977 foi da ordem de 2.290.007 toneladas. No Estado do Ceará, quarto produtor brasileiro, o feijão representa a terceira mais importante fonte de renda da agricultura; sua produção no mesmo ano foi de 144.000 toneladas. Neste Estado o *Callosobruchus maculatus* (gorgulho do feijão) é responsável por uma redução de até 50% no valor comercial do feijão (32).

O *Callosobruchus maculatus* é uma das 1.300 espécies que formam a família *Bruchidae*. As espécies desta família se distribuem por todos os continentes, exceto a Antártida. O maior número de espécies se encontra nas regiões tropicais da Ásia, África, América do Sul e América Central (33).

Os bruquídios necessitam de sementes hospedeiras

para sua perpetuação, visto que seu desenvolvimento só ocorre em sementes (33). Com relação ao *Callosobruchus maculatus*, existe uma dependência muito grande com respeito à semente hospedeira; há uma preferência quase absoluta para as sementes de *Vigna* (33). O tamanho da semente e a cor do tegumento parecem não exercer nenhuma influência sobre a postura do *Callosobruchus maculatus* (2). As fêmeas já fecundadas, ovipositam sobre a casca das sementes e o período de incubação destes ovos e eclosão das larvas é de 4 a 6 dias, em épocas quentes e, em épocas frias, requer até mais de 30 dias (4). Após a eclosão, a larva de *Callosobruchus maculatus* atravessa vários estádios até atingir a fase adulta. Os seguintes valores para a duração dos estádios foram observados por Carvalho e Machado (5): 1º estágio larval, 3 dias; 2º estágio larval, 3 dias; 3º estágio larval, 2,5 dias; 4º estágio larval, 4 dias; estágio de pré-pupa, 2 dias e estágio de pupa, 5 dias. Estes são valores para as durações mínimas dos estádios.

#### ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE INSETOS

Enzimas proteolíticas têm sido estudadas em muitos insetos (7,15,16,17,18,22), sendo quase sempre classificadas como semelhantes à tripsina ou à quimiotripsina. Em comparação com as endopeptidases de bactérias e vertebrados estas enzimas foram muito pouco estudadas. A caracterização destas proteases sempre foi feita em extratos brutos, prova-

velmente devido à dificuldade de obtenção de material suficiente para sua purificação. Só recentemente é que algumas destas enzimas foram purificadas e comparadas com as proteases serínicas de mamíferos, com respeito à evolução destas endopeptidases.

Em 1968, Zwillling (41), trabalhando com *Tenebrio molitor*, conseguiu separar duas proteases a partir deste organismo: a  $\alpha$ -protease com peso molecular de aproximadamente 24.000 daltons e a  $\beta$ -protease com peso molecular em torno de 60.000 daltons. Este autor observou que os inibidores de soja, de "lima bean", de pâncreas de porco e o inibidor polivalente bovino, que normalmente inibem a tripsina e a quimiotripsina, não eram capazes, com exceção dos dois primeiros, de inibir a  $\alpha$ -protease, enquanto que a  $\beta$ -protease era inibida por todos eles.

Dahlmann e colaboradores (7), estudando as proteases de larvas e adultos de *Apis mellifica* (abelha), constataram a presença de proteases com atividade semelhante à tripsina e à quimiotripsina. Das quatro frações com atividade semelhante à quimiotripsina presente na larva, duas desaparecem na fase adulta enquanto que a protease com atividade semelhante à tripsina está presente apenas em adultos.

Trabalhando com adultos de *Aedes aegypti* Kunz (22), detectou a presença de oito diferentes espécies enzimáticas. Todas parecem ser proteases do tipo serina, com peso molecular entre 20.000 e 23.000 daltons. Sete destas pro



teases são semelhantes à tripsina e uma semelhante à quimiotripsina. Fazendo o estudo comparativo de larva e adulto, Kunz observou que a larva apresenta de 4 a 5 proteases a mais que o adulto e que a atividade das enzimas tipo tripsina é a mesma em todos os estádios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*, enquanto que a atividade da protease tipo quimiotripsina é bem mais fraca no adulto.

Jany e colaboradores (17) determinaram um peso molecular de aproximadamente 13.800 daltons para a protease tipo quimiotripsina, encontrada em larva de *Vespa orientalis*, considerado baixo quando comparado com o de outras proteases tipo quimiotripsina, isoladas de vertebrados ou invertebrados. A protease tipo quimiotripsina encontrada em larva de *Vespa crabro* é constituída de uma única cadeia polipeptídica com duas pontes dissulfeto e com peso molecular em torno de 14.500 daltons (15).

Applebaum (1), trabalhando com larvas de *Callosobruchus chinensis* e *Acanthoscelides obtectus*, observou que a atividade proteolítica destas larvas era muito baixa e não seria suficiente para suprir suas necessidades nutricionais de aminoácidos durante o desenvolvimento. O autor sugere que a ação combinada das proteases da larva com as da semente, associada à alta concentração de peptídios inicialmente presente na semente infestada, pode compensar a baixa atividade proteolítica destas larvas.

A atividade proteolítica da larva de *Callosobru-*

*chus maculatus*, em pH básico, foi recentemente observada por Gatehouse (10), utilizando os substratos  $\alpha$ -N-benzoil-L-arginina etil éster,  $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina e globulina de "cowpea" marcada com fluorresceína. Esta atividade se mostrou proporcional à quantidade de extrato de larva usada.

#### INIBIDORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM SEMENTES

Substâncias proteicas capazes de inibir as atividades das enzimas proteolíticas animais, tripsina e quimiotripsina, encontram-se amplamente distribuídas na natureza. No reino vegetal têm sido encontradas em sementes de numerosas famílias, principalmente em todas as gramíneas e leguminosas estudadas (26,31,38).

A grande maioria dos inibidores de origem vegetal apresenta peso molecular inferior a 50.000 daltons e, quase sempre, inferior a 20.000 daltons. A maior parte dos inibidores encontrados em plantas contém entre 70 e 90 aminoácidos, correspondendo a pesos moleculares que variam de 8.000 a 10.000 daltons, estando quase sempre associados como dímeros ou tetrâmeros (28,31,38).

Complexos muito estáveis são formados por ocasião da interação inibidor-enzima, estando nesta interação envolvidos seus centros ativos (31). Os inibidores específicos para tripsina possuem no seu centro ativo uma sequência

LIS-X ou ARG-X, enquanto que os inibidores de quimiotripsina apresentam normalmente LEU-X, TIR-X ou FEN-X (8,23,28), sendo isso aparentemente reflexo das especificidades das enzimas.

Apesar de conterem uma grande diversidade de substâncias tóxicas como: hemaglutininas, glicosídeos cianogênicos, fatores bociogênicos e inibidores de proteases os legumes desempenham importante papel na dieta humana, pois a maioria destas substâncias é destruída parcial ou totalmente pelo calor (25).

Apesar dos numerosos trabalhos feitos com inibidores vegetais, até hoje não se sabe exatamente qual o papel ou papéis desempenhado por estas substâncias no metabolismo da planta. Dentre os prováveis papéis desempenhados pelos inibidores o de agente protetor contra proteínases de insetos e microrganismos, atualmente é um dos mais estudados.

Em 1964 Applebaum, trabalhando com larvas de *Callosobruchus chinensis*, mostrou que a incorporação do inibidor de tripsina de soja na dieta destas larvas ao nível de 0,2% não exercia nenhum efeito sobre seu desenvolvimento e que suas proteases não eram inibidas por este inibidor nas concentrações usadas (1).

Weil e colaboradores (39), estudando os diferentes níveis de susceptibilidade apresentados por diferentes variedades de cevada ao ataque do gafanhoto, observaram que

o nível de inibidores de proteases pode ser um dos fatores responsáveis pela resistência apresentada por algumas variedades.

O efeito de inibidores de tripsina sobre o crescimento e metamorfose da larva de *Ostrinia nubilalis* ("corn borer") foi estudado por Steffens e colaboradores (34). Eles observaram que o inibidor de soja, um forte inibidor de tripsina, quando incorporado à dieta desta larva ao nível de 2 a 5%, inibia seu crescimento e retardava sua pupação, porém não era capaz de impedir o ciclo de vida. Em outro experimento, estes autores adicionaram à dieta desta larva o inibidor de tripsina de milho, tido como um fraco inibidor de tripsina, e verificaram que o mesmo não exercia nenhum efeito no crescimento e metamorfose da larva.

Janzen e colaboradores (19), estudando a influência da incorporação de pequenas doses de alcalóides na dieta normal de *Callosobruchus maculatus*, verificaram que das 11 substâncias usadas 9 eram letais ao nível de 0,1% e as outras 2 só eram letais ao nível de 1%. Fazendo este mesmo teste, utilizando aminoácidos não proteicos e aminoácidos proteicos, estes autores observaram que os aminoácidos não proteicos eram sempre mais tóxicos ao *C. maculatus*, que os aminoácidos proteicos.

A observação de que o *C. maculatus* não se desenvolve em feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) levou Janzen (20) a sugerir que tal fato se deve à presença de fitohemaglutí-

nina, inibidor de tripsina ou compostos secundários nestas sementes. Para eliminar a possibilidade de que o feijão preto é resistente ao ataque do *C. maculatus* devido ao seu conteúdo de inibidor de tripsina, ele adicionou às sementes artificiais, feitas com farinha de sementes de *Vigna unguicu*lata (não contém fitohemoglutinina, tem inibidor de tripsina e é susceptível) inibidor de tripsina de soja e inibidor de tripsina de clara do ovo, nos níveis de 0,1 e 1%, verificando que os gorgulhos se desenvolviam normalmente nestas sementes. Sementes contendo 5% de inibidor de tripsina da clara do ovo não afetam o desenvolvimento do gorgulho, entretanto sementes com 5% de inibidor de tripsina de soja reduzem sua sobrevivência em 21%.

Gatehouse sugeriu recentemente que a resistência ao *Callosobruchus maculatus* apresentada por um cultivar de *Vigna* (TVu-2027) seria devida à concentração maior de inibidor de tripsina apresentada pela semente. Estes inibidores teriam um papel importante na resistência, por inibirem a atividade proteolítica, tipo tripsina detectada na larva do inseto (10).

O fato de que as sementes de feijões do gênero *Vigna* têm concentração relativamente alta de proteína (24-34%), substrato nitrogenado provável para as larvas de seu hospedeiro *Callosobruchus maculatus*, aliado à escassez de informação sobre o equipamento proteolítico das larvas des-

te inseto nortearam o desenvolvimento da presente investiga  
ção. O objetivo do trabalho se prende a um exame mais deta-  
lhado do espectro da atividade proteolítica de larvas de *C.*  
*maculatus* e a aspectos da interação dessa atividade com pre  
parações ricas, em inibidores de enzimas proteolíticas, ob-  
tidas de sementes de *Vigna*.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### A. MATERIAIS

No presente trabalho foram usadas sementes de diversos cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Sementes de *Vigna unguiculata* (TVu-2027) foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa-Arroz, Feijão da EMBRAPA, Goiania-Go. Estas sementes foram obtidas a partir de sementes fornecidas pelo International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan-Nigéria.

Os insetos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) utilizados foram obtidos a partir de cultura fornecida pelo Prof. José Higino Ribeiro dos Santos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Albumina sérica bovina (fração V 96-99%, Lot. 126C-0199) de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

$\alpha$ -Quimiotripsina bovina, preparação duas vezes cristalizada e liofilizada, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Caseína, preparada segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt, Alemanha.

Tripsina bovina, preparação duas vezes cristalizada, Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

Pepsina, preparação tres vezes cristalizada, Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

Hemoglobina bovina, preparação cristalizada, Worthington Biochemical Corp, New Jersey, EUA.

Sephadex G-100 e Blue dextran 2000, adquiridos de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## B. MÉTODOS

### 1. Preparação da farinha de feijão

Sementes quiescentes dos diversos cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi foram usadas para preparação das farinhas após remoção dos tegumentos. As sementes foram trituradas em gral até obtenção de uma farinha de granulação igual a 20-40 malhas por polegada linear (mesh) e armazenadas em refrigerador (5°C).

### 2. Preparação dos extratos de farinha

Os extratos das diversas farinhas foram preparados com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 (6), na proporção de 1:10 (farinha : meio de extração) sob agitação constante, à temperatura ambiente (26°C). Após esse tempo de contacto, a suspensão foi centrifugada a 2.500 x g por 30 minutos, também à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e



o sobrenadante, chamado extrato bruto, filtrado em papel qualitativo e usado para determinações de proteína e atividades anti-enzimática.

### 3. Criação de insetos

Indivíduos adultos de *Callosobruchus maculatus* desde sua chegada ao laboratório foram mantidos sobre sementes de *Vigna sinensis* cv. seridô, acondicionados em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tela de nylon. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente (26-30°C) e a cada geração, fez-se a infestação de novas sementes.

### 4. Preparação dos extratos de insetos

Na preparação desses extratos foram utilizados insetos adultos, com até 24 horas de emergência das sementes. Os insetos foram triturados em almofariz, com água destilada, na proporção de 100 indivíduos para 10 ml. A extração se processou por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 2.500 x g por 30 minutos, a 0°C, o resíduo foi desprezado e o sobrenadante filtrado em papel qualitativo e usado para determinações de proteína e ensaios de atividade enzimática e anti-enzimática.

### 5. Preparação dos extratos de detritos

O termo detrito aqui empregado engloba os detritos propriamente ditos, como restos de tegumentos origina-

dos de mudas e excrementos deixados pelas larvas durante o seu desenvolvimento. Os detritos nas sementes infestadas foram cuidadosamente retirados e deixados em contacto por uma hora com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, com agitação ocasional, na proporção de 3-4 mg/ml e à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 2.500 x g por 30 minutos, à temperatura ambiente (26<sup>o</sup>). O precipitado resultante foi desprezado e o sobrenadante filtrado em papel qualitativo.

#### 6. Preparação dos extratos de pupas

As pupas (17 a 20 dias após oviposição) foram obtidas por seccionamento cuidadoso dos cotilédones até que as mesmas fossem liberadas. As pupas assim obtidas foram liofilizadas e guardadas em frascos hermeticamente fechados, em congelador (-19<sup>o</sup>C). Os extratos de pupas foram preparados usando-se pupas liofilizadas, sendo estas trituradas em almofariz, com água destilada, em proporções que variavam de 4 a 30 mg/ml de acordo com o experimento. A extração se processou por uma hora sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada por 30 minutos a 16.000 x g a 5<sup>o</sup>C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante filtrado em papel qualitativo e guardado em congelador (-19<sup>o</sup>C).

#### 7. Preparação de azo-caseína

A preparação de azo-caseína foi feita essencialmente de acordo com o método desenvolvido por Goad (12) e

modificado por Geruza Maia (Dissertação de Mestrado em preparação). A preparação é obtida após um processo de 7 etapas :

Etapa 1 - Uma solução A constituída de :

ácido sulfanílico.....0,616 g  
brometo de potássio.....0,084 g  
ácido clorídrico 1 N.....45 ml  
água destilada.....37 ml

é agitada em banho de gelo ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Após equilíbrio adiciona-se gota a gota 18 ml da solução B (nitrito de sódio 0,2 M). Deixa-se a solução final, ácido diazo-sulfanílico, em banho de gelo ( $0^{\circ}\text{C}$ ) em agitação, por mais 15 minutos.

Etapa 2 - Prepara-se uma solução de caseína 2% em NaOH 0,1N resfriada em banho de gelo e tendo o pH ajustado a 10.

Etapa 3 - Adiciona-se a solução de ácido diazo-sulfanílico gota a gota, à solução de caseína 2%. A reação se processa em um banho de gelo e o pH é mantido em torno de 10 pela adição de NaOH 1 N. Após a adição total do ácido diazo-sulfanílico, mantém-se a mistura sob agitação por 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ , quando então a reação é parada pela adição de HCl 1 N até pH 7.

Etapa 4 - A solução de azo-caseína é dialisada exaustivamente contra NaCl 0,1 M, por 24 horas e contra água destilada por mais 24 horas.

Etapa 5 - À solução dialisada na etapa acima, é adicionado TCA 100%, sob agitação, de modo que a suspensão fique com uma concentração final de 2,5% do ácido.

Etapa 6 - Deixa-se a suspensão em repouso por 15 horas, filtra-se sob vácuo e lava-se o produto com 1 litro de TCA 2,5%.

Etapa 7 - O precipitado da etapa 6 é ressuspenso em 150 ml de água destilada, dialisado contra água por 16 horas e liofilizado.

#### 8. Preparação de inibidor bruto de feijão

A purificação parcial de inibidores de tripsina (T) e quimiotripsina (QT) foi feita de acordo com o método estabelecido por Ventura e Xavier Filho (35), utilizando-se farinha de sementes de *Vigna sinensis* cv. seridó moídas em moinho Wiley e passadas em peneira de 60 malhas por polegada linear (mesh). Esta purificação parcial, após a qual se obtém uma mistura de inibidores de tripsina e quimiotripsina, chamada de inibidor bruto (IB), consiste num processo de 3 etapas, a saber:

Etapa 1 - Extração com água: 500 g de farinha foram suspensas em 2 litros de água destilada, com agitação frequente, durante 3 horas, à temperatura ambiente (26°C). Em seguida a suspensão foi filtrada através de tecido fino de algodão. O resíduo foi ressuspense em 2 litros de água com agitação frequente por mais 3 horas, à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada e ambos filtrados foram reunidos. O resíduo foi desprezado.

Etapa 2 - Precipitação com ácido tricloroacético (TCA): ao filtrado obtido na etapa 1 foi adicionado TCA 100% (p/v), sob agitação, em volume suficiente para que a concentração final ficasse 2,5% de ácido. A suspensão foi deixada em repouso por 16 horas, a 4°C, após o que foi filtrada a vácuo. O precipitado foi desprezado.

Etapa 3 - Precipitação com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  : ao sobrenadante da etapa anterior foi adicionado sob agitação,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  sólido, de modo que a solução final ficasse 80% saturada. A suspensão foi deixada em repouso por 16 horas, a 4°C, e em seguida centrifugada a 16.000 x g durante 30 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado obtido nesta etapa foi submetido a precipitação com TCA e  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  como descrito nas etapas 2 e 3.

O precipitado foi então redissolvido em 10 ml de água destilada e dialisado contra água, a 12°C por 24 horas, e em seguida liofilizado. O material obtido foi chamado de inibidor bruto (IB).

### 9. Determinação de proteína

A concentração de proteína nos diversos extratos foi determinada pelo método do micro-biureto a 330 nm (11), usando-se como padrão albumina sérica bovina. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro Beckmann modelo DU.

### 10. Preparação das soluções utilizadas como substratos

Os substratos caseína, hemoglobina e azo-caseína, foram preparados de acordo com os métodos estabelecidos por Kunitz e Iracema Ainouz.

#### 10.1. Caseína (21)

As soluções de caseína 1% foram preparadas, suspendendo-se 1 g de caseína em 100 ml de tampão 0,1 M, pH 7,6 e aquecendo-se até ebulição por 15 minutos, quando então a caseína é totalmente solubilizada. Deixa-se esfriar, ajusta-se a pH 7,6 e em seguida completa-se o volume com água destilada para 100 ml. A solução era armazenada em congelador (-19°C).

## 10.2. Hemoglobina

Dissolve-se 1,0 g de hemoglobina bovina em 50 ml de HCl 0,06 N, adiciona-se em seguida 40 ml de tampão acetato 0,28 M, pH 3,5, ajusta-se a pH 3,5 e completa-se o volume com tampão acetato para 100 ml (I.L.Ainouz, comunicação pessoal). A solução é armazenada em congelador.

## 10.3. Azo-caseína

Uma grama de azo-caseína é suspensa em 100 ml de tampão universal pH 5,0 (6). Aquece-se e deixa-se em ebulição por 15 minutos. Deixa-se esfriar, ajusta-se a pH 5,0 e em seguida completa-se o volume com água destilada para 100 ml. A solução é mantida em congelador.

## 11. Determinação de atividades enzimáticas

As condições de ensaio para a determinação das atividades de enzimas proteolíticas de pupas foram estabelecidas, utilizando-se soluções de azo-caseína e hemoglobina. As atividades da tripsina e quimiotripsina foram determinadas, utilizando-se soluções de caseína como substrato.

### 11.1. Atividade azo-caseinásica

#### 11.1.1. Concentrações ótimas de substrato e enzima

Nestas experiências o meio de reação encerrava 1,0 ml de extrato de pupa, contendo 2, 4 e 6 pupas/ml e

2,0 ml de azo-caseína em tampão universal pH 5,0 em concentrações, variando de 0,17 a 0,53% no volume final de reação. A mistura foi incubada por 30 minutos a 50°C, sendo a reação parada com 1,0 ml de TCA 10% (p/v). Após 30 minutos de repouso as suspensões foram filtradas em papel de filtro qualitativo e 1,0 ml do filtrado alcalinizado com 1,0 ml de NaOH 2 N. A atividade enzimática foi medida pela absorbância em 440 nm dos peptídios diazotizados.

A fim de corrigir os resultados para a atividade autodigestiva do extrato, foram sempre usados controles onde o extrato e o substrato foram incubados separadamente à mesma temperatura, pelo mesmo tempo e o substrato adicionado ao extrato após adição de TCA 10%.

#### 11.1.2. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade azo-caseinásica foi estabelecido, utilizando-se o substrato na concentração de 0,33% em valores de pH que variavam de 2,5 a 10. O pH das soluções de azo-caseína foi mantido nos valores desejados por diluição de uma solução estoque de azo-caseína a 2%, preparada como no item 10.3 com tampão universal nos diversos valores de pH e estes reajustados em potenciômetro. Os ensaios foram feitos incubando-se 1,0 ml do substrato com 0,5 ml de extrato (16 pupas/ml) e 1,5 ml de tampão universal nos diversos valores de pH por 30 minutos a 50°C, sendo a reação parada com 1,0 ml de TCA 10%. Após 30



minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel qualitativo, sendo retirado 1,0 ml do filtrado e alcalinizado com 1,0 ml de NaOH 2N. A hidrólise enzimática foi medida pela absorvância em 440 nm dos produtos corados forma dos. Foram feitas provas em branco, sendo que, nestes casos, a adição de TCA precedeu à de azo-caseína.

#### 1.1.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação

A temperatura e o tempo de reação foram estabelecidos, fazendo-se ensaios de atividade enzimática nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C e intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os ensaios foram feitos incubando-se 1,0 ml do substrato a 1% com 0,5 ml de extrato (16 pupas/ml) e 1,5 ml de tampão universal, pH 5,0. A reação foi parada com 1,0 ml de TCA 10%, após 30 minutos de repouso as suspensões foram filtradas em papel qualitativo, sendo retirado 1,0 ml do filtrado e alcalinizado com 1,0 ml de NaOH 2N. A atividade azo-caseinásica foi medida pela absorvância em 440 nm dos produtos corados formados. Foram feitas provas em branco para todos os tubos.

#### 1.1.4. Unidade de atividade azo-caseinásica

Para os cálculos de atividade azo-caseinásica foi definida a seguinte unidade: 1 unidade de atividade é

a quantidade de enzima que produz uma absorvância a 440 nm de 0,1000 U.D.O. por 1,0 ml do extrato por 30 minutos de reação a 50°C e pH 5,0.

## 11.2. Atividade hemoglobínica

### 11.2.1. Concentrações ótimas de substrato e enzima

As concentrações ótimas de substrato e extrato foram determinadas, usando-se 5,0 ml de hemoglobina nas concentrações que variavam de 0,17 a 0,83% em tampão acetato 0,28 M, pH 3,5 (6) e 1,0 ml de extrato de pupa nas proporções de 1, 2 e 3 pupas/ml. A mistura foi incubada por 60 minutos, a 40°C, sendo a reação parada com 1,0 ml de TCA 40% (p/v). Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel quantitativo, sendo retirado 1,0 ml do filtrado e alcalinizado com 0,2 ml de NaOH 2N. A atividade hemoglobínica foi determinada empregando-se o reagente de Folin, modificado por Lowry (27). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Foram feitas provas em branco para todos os tubos.

### 11.2.2. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade hemoglobínica foi determinado utilizando-se hemoglobina na concentração de 1% em valores de pH, que variavam de 2,5 a 11. O pH das

soluções de hemoglobina foi mantido nos valores desejados por diluição de uma solução estoque de hemoglobina 2%, preparada como no ítem 10.2 com tampão universal e o pH reajustado em potenciômetro. Os ensaios foram feitos incubando-se 1,0 ml do extrato (2 pupas/ml) com 5,0 ml do substrato por 60 minutos, a 40°C. A reação foi cessada com 1,0 ml de TCA 40% e, após permanecer 30 minutos em repouso, as suspensões foram filtradas em papel quantitativo e retirado 1,0 ml do filtrado que foi alcalinizado com 0,2 ml de NaOH 2N. A atividade hemoglobínica foi medida usando-se o reagente de Folin, modificado por Lowry (27). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Provas em branco foram feitas para todos os tubos.

### 11.2.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação

A temperatura e o tempo de reação foram determinados, fazendo-se ensaios de atividade hemoglobínica nas temperaturas de 30, 37, 40 e 50°C e intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. As determinações foram feitas usando-se 5,0 ml de hemoglobina a 1% preparada em tampão acetato 0,28 M, pH 3,5 e 1,0 ml de extrato de pupas (2 pupas/ml), a reação foi cessada com 1,0 ml de TCA 40%. Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo e retirado 1,0 ml do filtrado que foi alcalinizado com 0,2 ml de NaOH 2N. A atividade hemoglobi-

násica foi determinada como no ítem anterior.

#### 11.2.4. Unidade de atividade hemoglobi- násica

Para os cálculos de atividade hemoglobínásica foi definida a seguinte unidade: 1 unidade de atividade é a quantidade de enzima que produz uma absorbância a 750 nm de 0,1000 U.D.O. por 1,0 ml de extrato por 60 minutos de reação a 40°C e pH 3,5.

#### 11.3. Atividade triptica e quimiotriptica

Foram preparadas soluções estoque de tripsina dissolvidas em HCl 0,0025 M; a concentração de enzima foi determinada por meio de leituras de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Beckmann DU, usando-se como fator  $\text{óti}$ co  $F_{280 \text{ nm}}^1 \text{ mg/ml} = 0,621$  (36). As soluções continham de 0,345 a 0,379 mg/ml. Para a determinação da atividade da tripsina utilizou-se caseína como substrato, segundo o método de Kunitz (21). Diluindo-se a solução estoque de tripsina em HCl 0,0025 M, obtem-se uma solução de concentração, aproximadamente 13  $\mu\text{g/ml}$ ; essa solução diluída foi usada nos ensaios de atividade. Volumes crescentes de solução diluída de tripsina foram pipetados em tubos de ensaio e os volumes completados para 1,0 ml com HCl 0,0025 M; em seguida foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 aos diversos tubos. Os tubos assim preparados foram colocados

em banho a 37<sup>o</sup>C e após 10 minutos a reação foi iniciada pela adição de 1,0 ml de caseína a 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6. Decorridos 20 minutos a reação foi parada com 3 ml de TCA 5% e os tubos retirados do banho. Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel quantitativo e suas atividades determinadas pelo reagente de Folin, modificado por Lowry (27). A densidade ótica foi determinada num espectrofotômetro Spekol a 750 nm. Foram feitas provas em branco para as concentrações extremas de tripsina, sendo que nestes casos a adição de TCA sempre precedeu à de caseína. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco foram obtidas por interpolação.

Para a determinação de atividade quimiotrípica o procedimento foi exatamente o descrito acima com exceção das concentrações de enzima (diluída em água), que foi da ordem de 0,355 a 0,380 mg/ml. Estas concentrações foram obtidas utilizando-se o fator ótico  $F_{280\text{ nm}}^1 \text{ mg/ml} = 0,500$  (21).

#### 11.4. Atividade da pepsina

Foram preparadas soluções estoque de pepsina (0,2 mg/ml) dissolvidas em HCl 10 mM (3). Para determinação da atividade da pepsina utilizou-se como substrato azo-caseína e hemoglobina. As condições de ensaio foram as mesmas utilizadas na determinação da atividade azo-caseinásica de pupas de *Callosobruchus maculatus*.

## 12. Determinação de atividades inibitórias

Atividades inibitórias das preparações estudadas foram avaliadas por comparação de amostras, contendo quantidades crescentes de inibidores em presença de uma quantidade fixa de enzima, com amostras contendo somente tripsina, quimiotripsina ou extratos de pupas. Provas em branco para as enzimas e para concentrações extremas de inibidores foram sempre feitas. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco de inibidores foram obtidas por interpolação. Para determinação das atividades anti-tríptica e anti-quimiotríptica o método utilizado foi o de Kunitz descrito anteriormente, e as atividades foram expressas em unidades de inibidor (UI), definidas por Xavier Filho (37). As atividades anti-hemoglobínica e anti-azo-caseínica foram expressas em unidades de inibidor, assim definidas:

1  $UI_{AzC-ase}$  - é a quantidade de inibidor que baixa para 0,050 U.D.O. (440 nm) a leitura de um padrão de enzima que dá 0,100 U.D.O. (ou 1 UE) nas condições do ensaio.

1  $UI_{Hb-ase}$  - é a quantidade de inibidor que baixa para 0,050 U.D.O. (750 nm) a leitura de um padrão de enzima que dá 0,100 U.D.O. (ou 1 UE) nas condições do ensaio.

### 13. Filtração em gel dextrana

Uma coluna de Sephadex G-100 foi preparada segundo Determann (9). O gel foi deixado equilibrar em água por 72 horas com agitação ocasional, após o que foi deixado sedimentar livremente em uma coluna de 1,3 cm de diâmetro e 25 cm de altura. A coluna foi em seguida equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 ou com tampão acetato 0,02 M pH 5,0 a temperatura ambiente (26°). Uma amostra de 20 mg de "Blue dextran" foi dissolvida em 2,0 ml do tampão de equilíbrio, contendo 200 mg de sacarose e aplicada na coluna para determinar o seu volume de exclusão ( $V_0$ ). A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 20 ml por hora. Os efluentes da coluna foram recolhidos em frações de 2,0 ml, em um coletor automático de frações LKB-Radi Rac e as absorbâncias determinadas em um espectrofotômetro Spekol a 660 nm.

Aplicou-se na coluna previamente equilibrada, 1,0 ml de amostra no tampão de equilíbrio, contendo 20 mg de extrato liofilizado de pupa e 100 mg de sacarose. A eluição foi feita com tampão de equilíbrio a um fluxo de 20 ml por hora. Os efluentes da coluna foram recolhidos em frações de 2,0 ml, determinada sua densidade ótica a 280nm e as atividades azo-caseinásica e hemoglobínica.

Para os cálculos dos pesos moleculares foi usada a seguinte fórmula, dada por Determann (9) :

$\log M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o)$ , onde  $V_e$  é o volume de eluição e  $V_o$  o volume de exclusão.

#### 14. Nitrogênio amino-solúvel

Nitrogênio amino-solúvel foi medido na fração solúvel em TCA, resultante dos ensaios de atividade azo-caseinásica, hemoglobínásica e de pepsina, de acordo o método de Hyman Rosen (29). A 0,5 ml da amostra adicionou-se 0,5 ml de álcool isopropílico 50%, 0,5 ml de tampão acetato-cianeto pH 5,1 e 0,5 ml de solução de ninhidrina a 3% em metil cellosolve, sendo a mistura colocada em banho maria (100°C) por 15 minutos. Após esse tempo, os tubos contendo as amostras foram retirados do banho e adicionado a cada um deles 5,0 ml de álcool isopropílico 50%, com agitação. A cor desenvolvida foi lida a 570 nm em um espectrofotômetro Spekol. Calculou-se a concentração de nitrogênio amino-solúvel por comparação com uma curva padrão de L-leucina.

#### 15. Resistência de sementes ao *C. maculatus*

Tres sementes de diversos cultivares de *Vigna si-nensis*, de *Vigna unguiculata* (TVu-2027) e de dois cultivares de *Phaseolus vulgaris* foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, com 6,5 cm de altura e 5,0 cm de diâmetro. Cinco casais de adultos de *C. maculatus* foram introduzidos nos frascos e estes fechados com tela de nylon. Após 8 horas de permanência nos frascos os insetos foram re-



tirados, fazendo-se a remoção do excesso de ovos, deixando-se apenas 3 casais por semente (32). A emergência de insetos foi verificada diariamente e os adultos emergidos retirados. A resistência ao inseto foi medida por um índice obtido ao se multiplicar o número de adultos emergidos pelo inverso do tempo, em dias, necessário para emersão.

#### 16. Ação da hemoglobinase de pupa sobre o IB

O efeito da hemoglobinase presente em extratos de pupas sobre as atividades anti-tríptica e anti-quimio-tríptica de inibidor bruto (IB) de sementes do cultivar se ridó foi estudada medindo-se a atividade residual destes 2 tipos de inibidores após incubação de extrato de pupas com IB, nas condições de ensaio estabelecidas para a hidrólise de hemoglobina.

Duas alíquotas de 15 ml de uma solução de inibidor bruto, contendo 0,13 mg/ml em tampão universal pH 3,5 foram postas em frascos de erlenmeyer de tampa esmerilhada. Adicionou-se a um dos frascos 5,0 ml de um extrato, contendo 36 mg de pupas liofilizadas por mililitro de água destilada, obtido como no item 6. A outro frasco contendo solução de IB foram adicionados 5,0 ml de água destilada. Imediatamente após as adições acima referidas foram retiradas alíquotas de 3,0 ml para tubos de ensaio, contendo 3,0 ml de TCA 5%. Logo após esta operação ambos frascos foram postos em banho a 40°C e após 60, 120, 180 e 240 minutos

foram retiradas alíquotas de 3,0 ml para tubos, contendo 3,0 ml de TCA 5%. Após 30 minutos de repouso as suspensões foram filtradas em papel quantitativo e os filtrados, após serem neutralizados com 0,5 ml de NaOH 2 N, foram levados para 10 ml com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6. As atividades anti-tríptica e anti-quimiotríptica foram avaliadas em alíquotas convenientes das soluções acima, pelo método de Kunitz modificado por Xavier Filho (comunicação pessoal).

#### 17. Ação de azo-caseinase de pupa sobre o IB

O efeito da azo-caseinase de pupa sobre as atividades anti-tríptica e anti-quimiotríptica de IB foi investigado de modo semelhante ao descrito no item anterior. As condições estabelecidas para a determinação de azo-caseinase foram utilizadas neste caso.

### III. RESULTADOS

#### 1. Caracterização das pupas utilizadas

Pupas de *Callosobruchus maculatus* (17 dias após oviposição), quando frescas, pesam em média cerca de 5,3 mg e, após liofilização, este peso desce para mais ou menos 3,0 mg. A concentração de proteína na pupa fresca é em torno de 4% e na pupa liofilizada é de 7%.

#### 2. Condições de ensaio

No estabelecimento das condições a serem utilizadas nos ensaios das atividades hemoglobínica e azo-caseínica presentes em extratos de pupas e adultos de *Callosobruchus maculatus*, as pupas tinham de 17 a 20 dias e os adultos 1 dia após a emergência.

As variações de atividade hemoglobínica em função do pH, mostradas na Figura 1, foram determinadas no intervalo de 2,5 a 11, verificando-se uma atividade máxima a pH 3,5, sendo este valor escolhido para os ensaios subsequentes. Observou-se uma atividade máxima a 40°C (Figura 2) e o tempo de reação de 60 minutos foi escolhido tendo em vista os dados da Figura 3.

Os resultados obtidos quando do emprego de concentrações crescentes de hemoglobina e quantidades fixas de extrato de pupas encerrando atividade hemoglobínica são observados na Figura 4. Verificando-se que, para extra

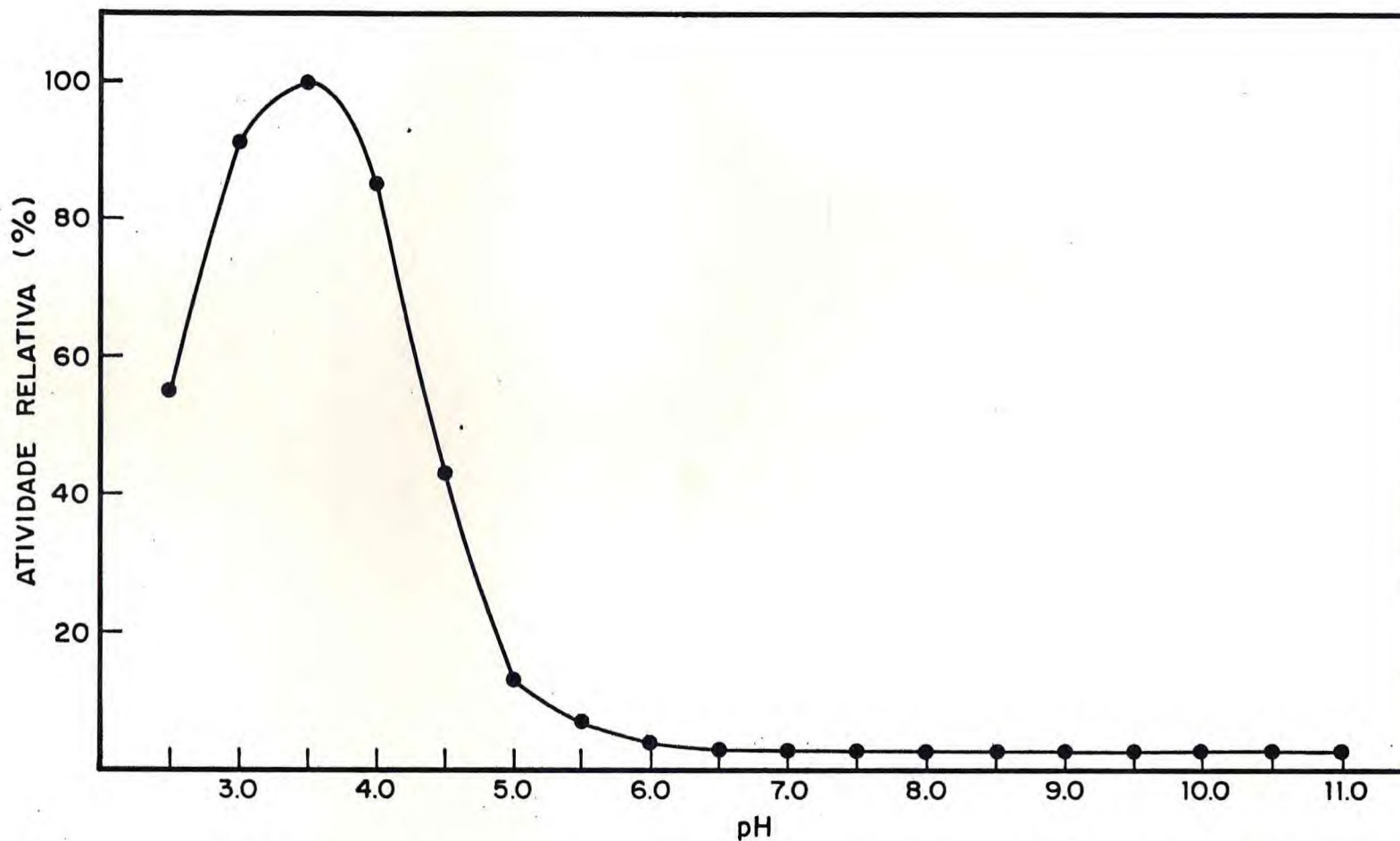


Figura 1 - Efeito do pH sobre a atividade hemoglobinásica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Condições de ensaio: 5 ml de hemoglobina 1%; 1 ml de extrato aquoso de pupa (2 pupas/ml); temperatura, 40°C; tempo de reação, 60 minutos; reação parada com 1 ml de TCA 40%. Atividade enzimática medida em 750 nm e calculada com relação à atividade máxima.

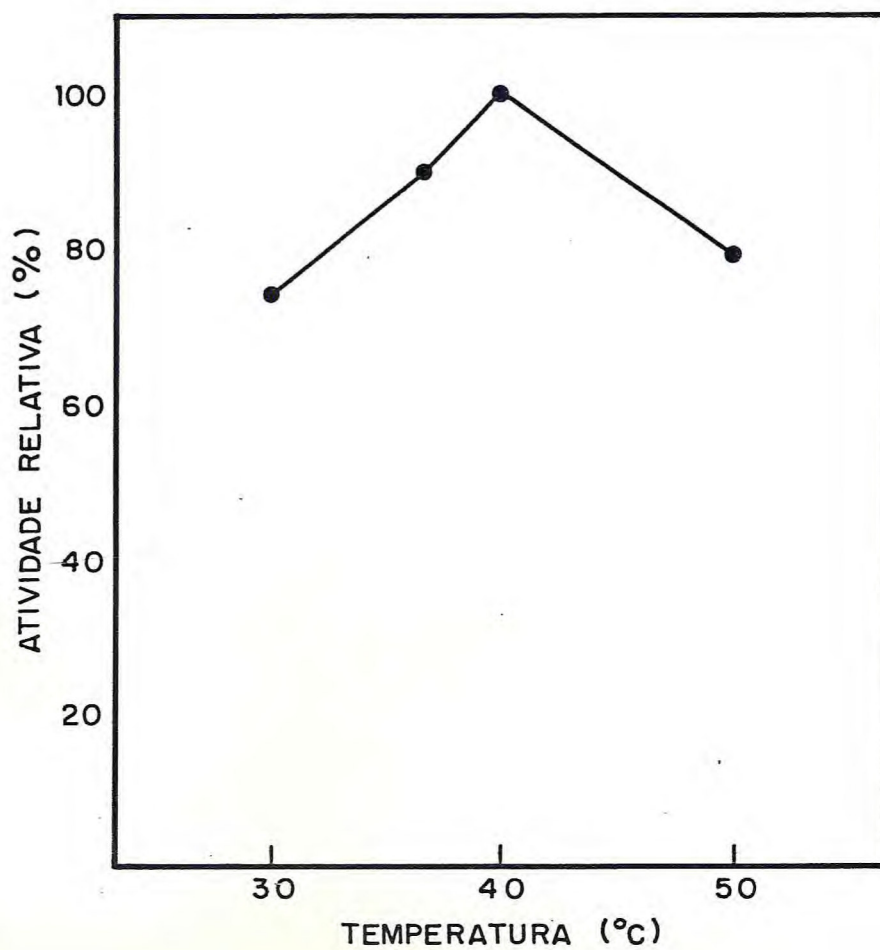


Figura 2 - Efeito da temperatura sobre a atividade hemoglobínica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Atividade determinada em pH 3,5 ( tampão acetato 0,28 M ). As demais condições de ensaio estão especificadas na Figura 1.

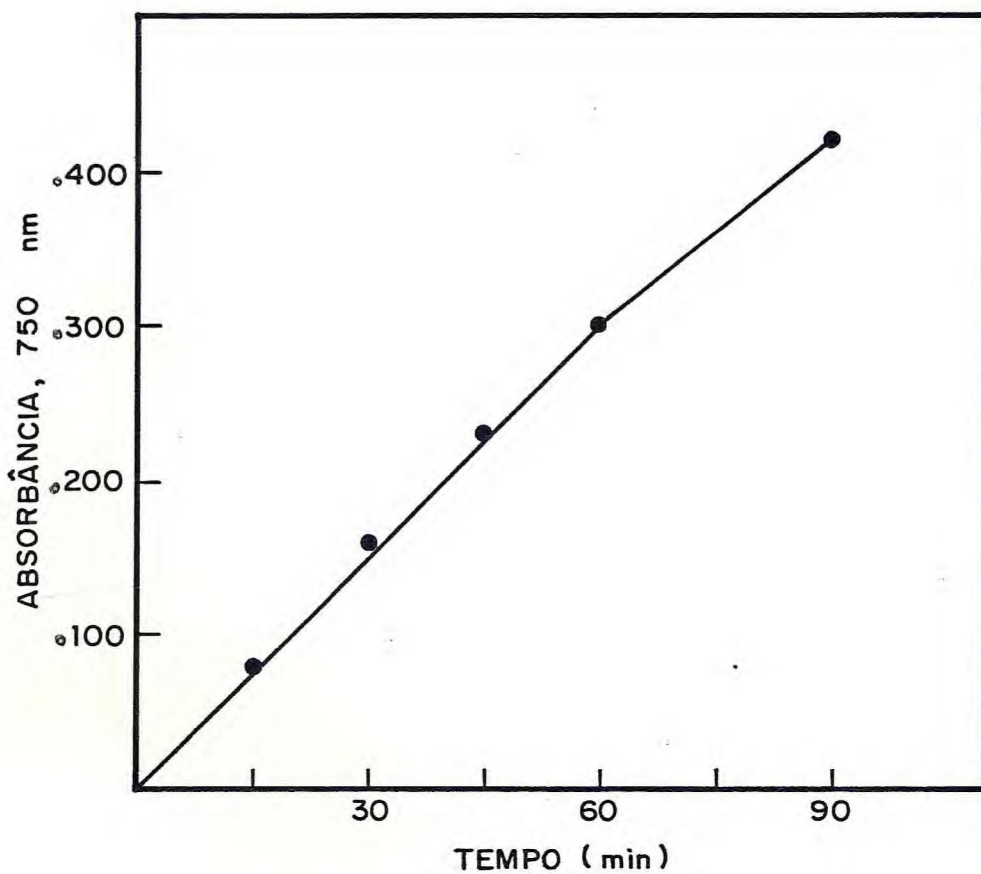


Figura 3 - Efeito do tempo sobre a atividade hemoglobínica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão acetato 0,28 M, pH 3,5. As demais condições de ensaio estão descritas na Figura 1. Alíquotas de 1 ml dos filtrados foram usadas para medidas de absorvância em 750 nm, após reação com o reagente de Folin.

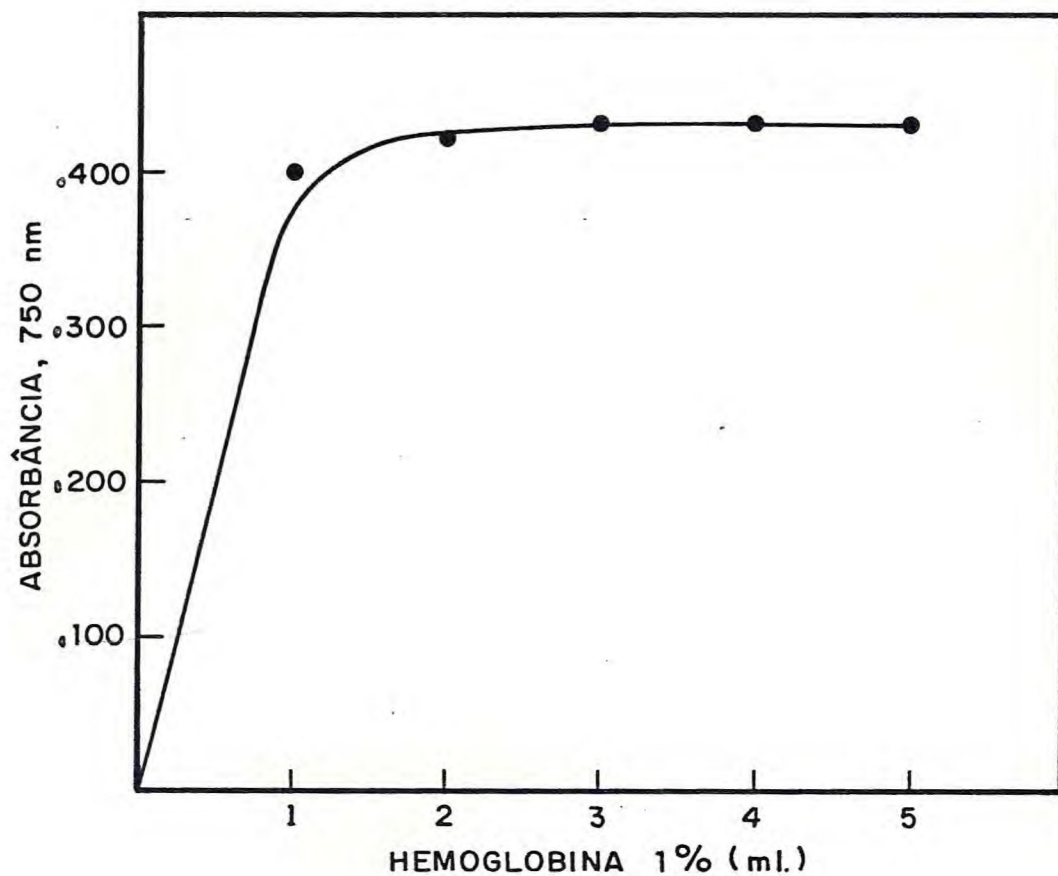


Figura 4 - Efeito da concentração de hemoglobina sobre a atividade hemoglobínica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Condições de ensaio: hemoglobina 1%, pH 3,5 em tampão acetato (0,28 M); 1 ml de extrato aquoso de pupa (2 pupas/ml); tempo de incubação, 60 minutos; temperatura, 40°C; reação para da com 1 ml de TCA 40%. Aliquotas de 1 ml dos filtrados foram usadas para medidas de absorvância em 750 nm, após reação com reagente de Folin.

tos de pupas com 6 mg/ml, a concentração final de hemoglobina, 0,83% no volume de reação é suficiente para saturar a enzima.

Após o estabelecimento da concentração de substrato foram feitos ensaios, variando-se, agora, a concentração da enzima presente no extrato. De acordo com a Figura 5, a atividade hemoglobinásica aumenta linearmente em função de quantidades crescentes de enzima.

Feita a análise dos dados acima foram estabelecidas as seguintes condições de ensaio para a atividade hemoglobinásica: pH, 3,5; tempo de reação, 60 minutos; temperatura, 40°C; substrato, 5,0 ml de hemoglobina 1%; extrato, 1,0 ml da preparação contendo de 6 a 8 mg/ml de pupa liofilizada, resultando um volume de reação de 6,0 ml. Foi utilizado 1,0 ml de TCA 40% (p/v) a fim de parar a reação.

Uma vez estabelecidas as condições de ensaio com pupas de *Callosobruchus maculatus*, foi feita a determinação de atividade hemoglobinásica em extrato de insetos com 1 dia após emergência das sementes, verificando-se que a atividade hemoglobinásica na pupa é cerca de 5 vezes maior que no inseto adulto (Tabela 1).

A influência do pH sobre a atividade azo-caseinásica de pupas é mostrada na Figura 6, observando-se uma atividade máxima a pH 5,0.

As variações da atividade azo-caseinásica em função da temperatura (Figura 7) foram determinadas nas tempe



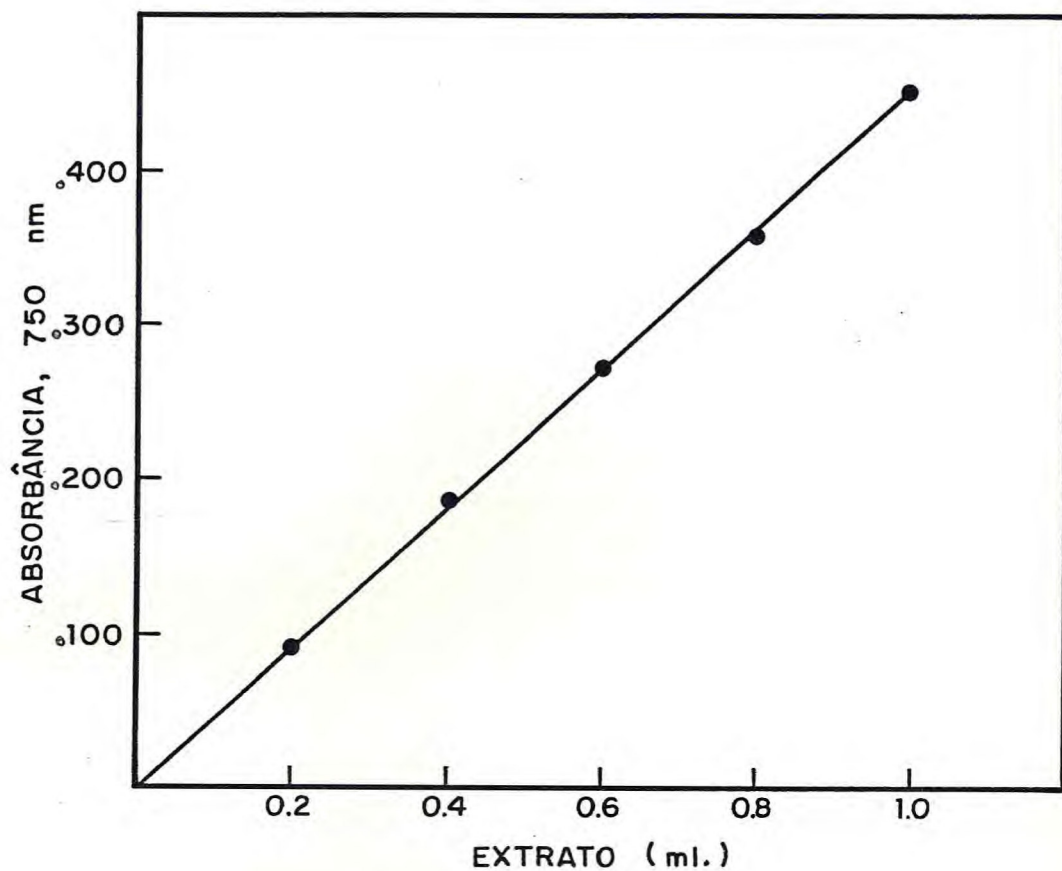


Figura 5 - Efeito da hemoglobinasase presente em extrato de pupa de *Callosobruchus maculatus* sobre a velocidade de reação. As condições de ensaio são as mesmas descritas na Figura 4.

TABELA 1

Enzima	Unidade/indivíduo		Pupas/Adultos
	Adultos	pupas	
Hemoglobinase	0,440	2,213	5
Azo-caseinase	0,210	0,432	2

Unidades de hemoglobinase ( $UE_{Hb}$ ) e azo-caseinase ( $UE_{AzC}$ ) em adultos (1 dia) e pupas de *C. maculatus*.

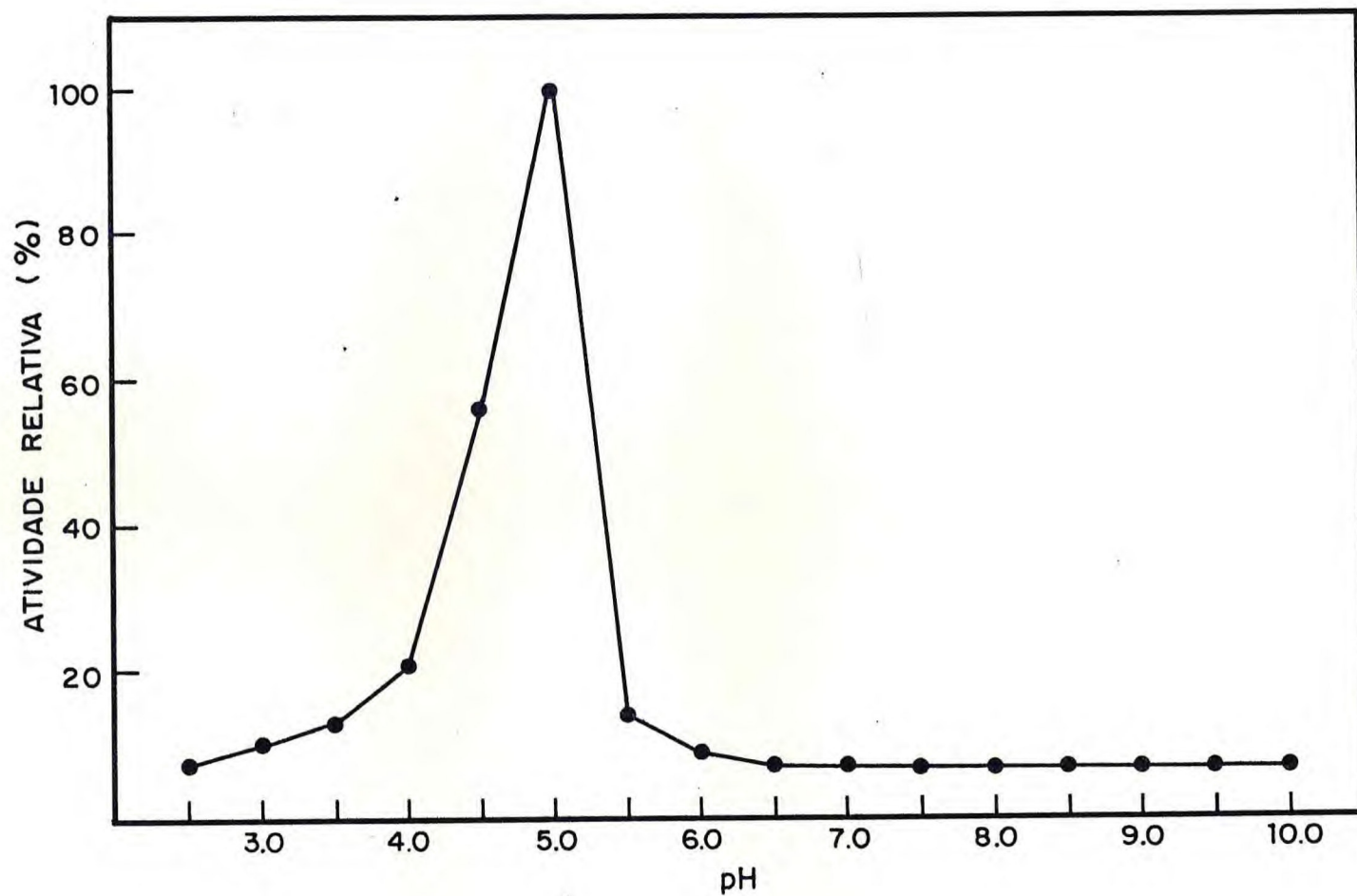


Figura 6 - Efeito do pH sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Condições de ensaio: 1 ml de azo-caseína a 1%; 0,5 ml de extrato aquoso de pupa (16/pupas/ml); 1,5 ml de tampão universal (pH 2,5 a 10); tempo de incubação, 30 minutos; temperatura, 50°C; reação parada com 1,0 ml de TCA 10%. A atividade enzimática foi medida pela absorvância em 440 nm, após a adição de 1 ml de NaOH 2 N a 1 ml do filtrado e calculada em relação à atividade máxima.

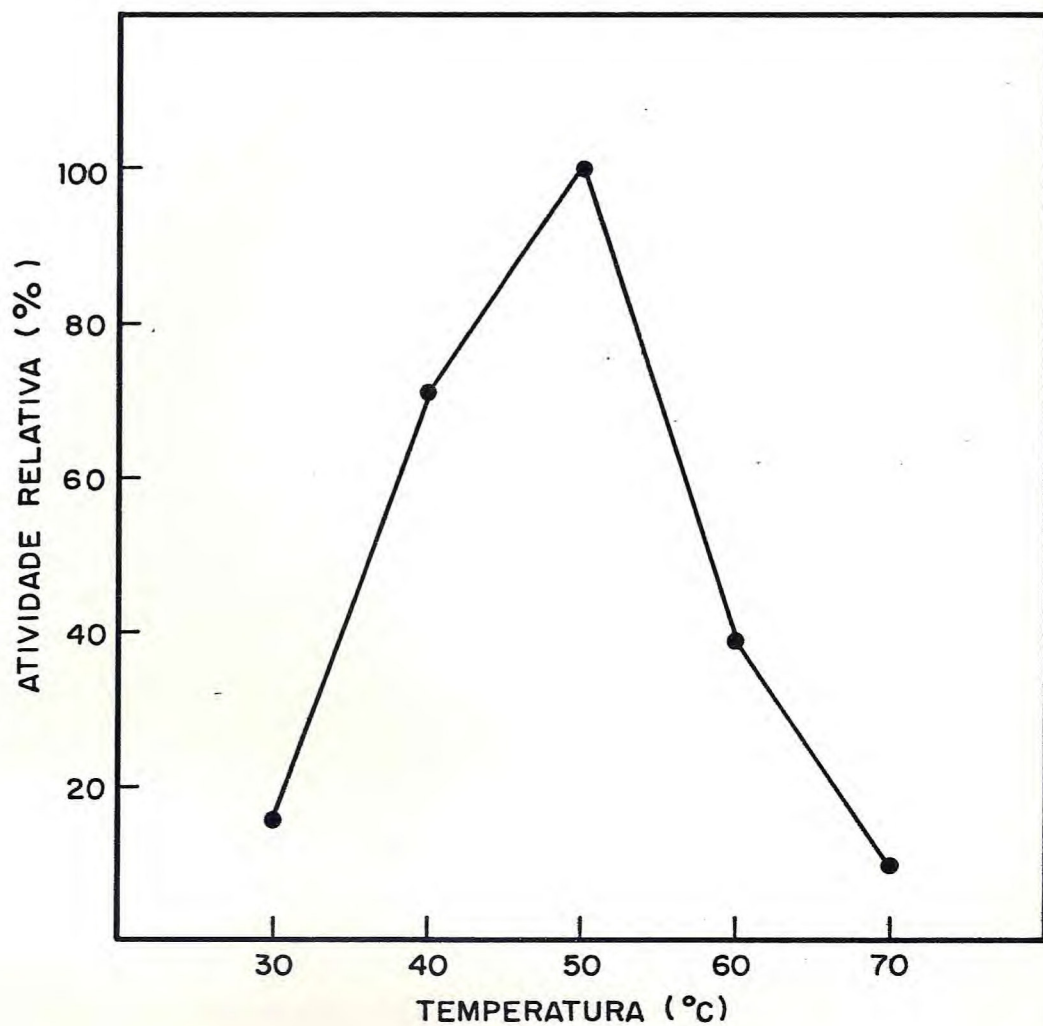


Figura 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Atividade determinada em pH 5,0 (tampão acetato 0,28 M). As demais condições de ensaio foram especificadas na Figura 6.

raturas de 30 a 70°C, observando-se uma temperatura ótima de 50°C. O tempo de reação de 30 minutos foi escolhido levando-se em consideração os dados da Figura 8.

A curva de efeito do substrato sobre a velocidade de reação mostra que, para extratos com concentração igual a 24 mg/ml de pupa, uma concentração final de 0,53% de azocaseína no volume de reação é suficiente para saturar a enzima (Figura 9).

Escolhida a concentração saturante de substrato (0,33%) foram feitos ensaios mantendo-se fixa esta concentração e variando-se a concentração de enzima. Como mostra a Figura 10, a atividade azocaseinásica guarda uma relação linear com quantidades crescentes de enzima.

Após a análise dos dados acima foram estabelecidas as seguintes condições de ensaio para a atividade azocaseinásica: tempo de reação, 30 minutos; pH, 5,0; temperatura, 50°C; 1,0 ml de azocaseína 1%; 1,0 ml de extrato de pupa (24 mg/ml) e 1,0 ml de tampão acetato 0,28 M, pH 5,0, perfazendo um volume de reação de 3,0 ml. Foi utilizado 1,0 ml de TCA 10% (p/v) para parar a reação.

A atividade azocaseinásica presente em extrato de inseto com 1 dia após emersão das sementes foi determinada utilizando-se as mesmas condições estabelecidas para pupas. Verificou-se que a atividade azocaseinásica de pupa é cerca de 2 vezes maior que a do inseto adulto (Tabela 1).

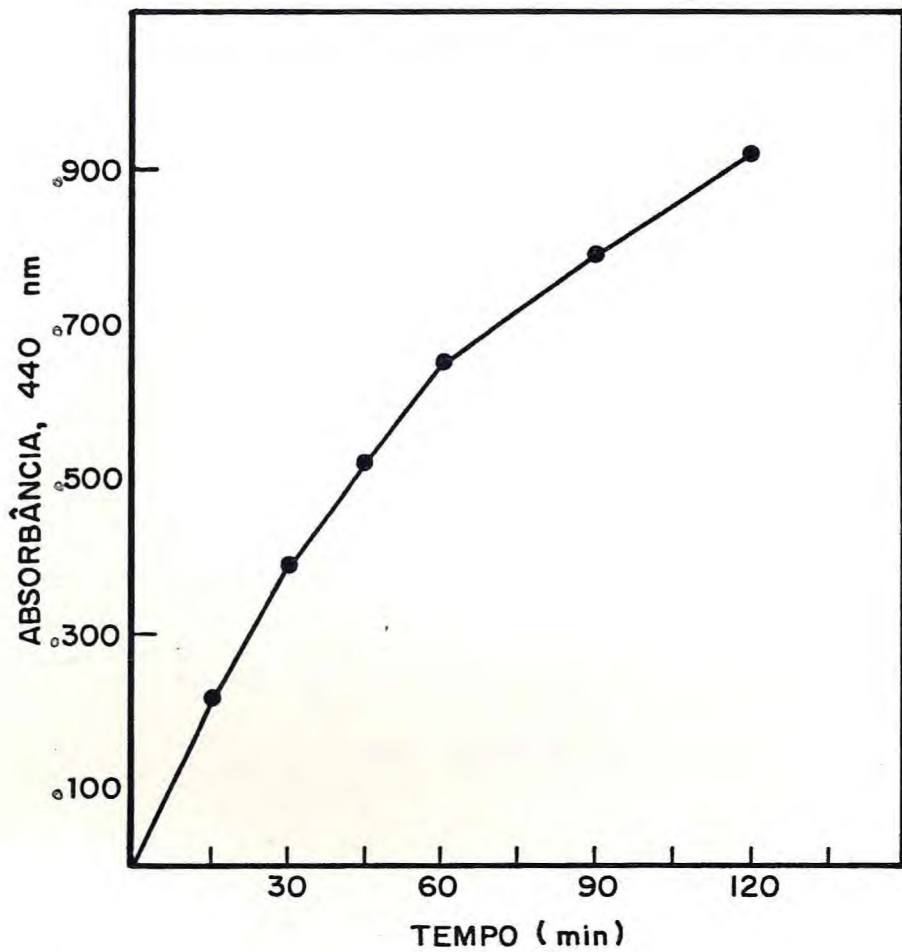


Figura 8 - Efeito do tempo sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Os ensaios de atividade foram feitos em tampão acetato 0,28 M, pH 5,0. As demais condições de ensaio estão descritas na Figura 6. Aliquotas de 1,0 ml dos filtrados foram usadas para medidas de absorbância em 440 nm, após adição de 1,0 ml de NaOH 2 N.

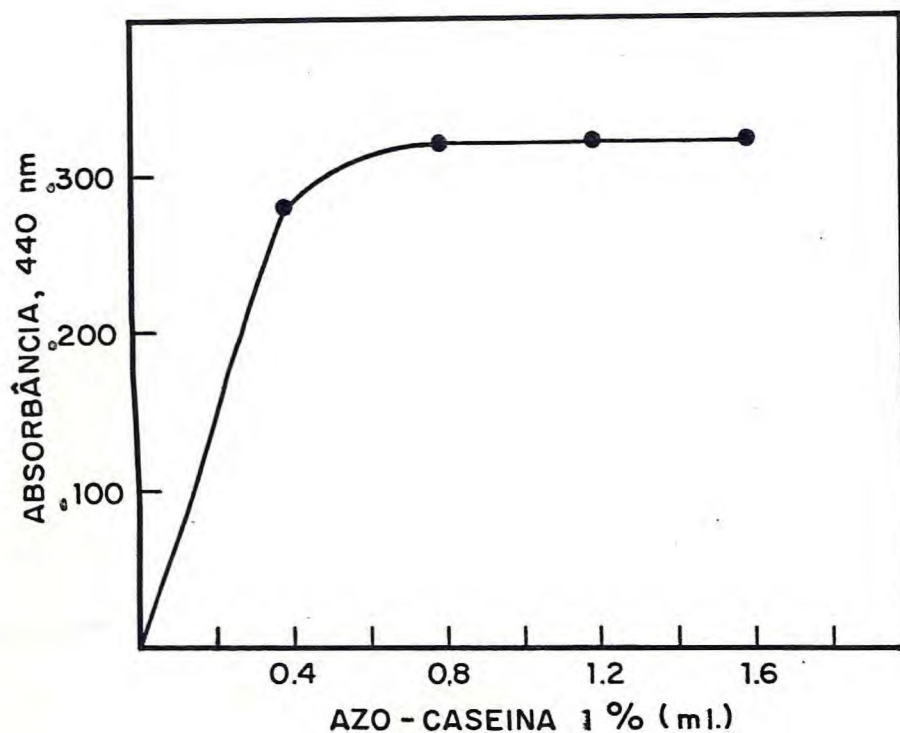


Figura 9 - Efeito da concentração de azo-caseína sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Condições de ensaio: azo-caseína 1%, pH 5,0 em tampão acetato (0,28 M); 1,0 ml de extrato aquoso de pupa (8 pupas/ml); temperatura, 50°C; tempo de incubação, 30 minutos; reação parada com 1,0 ml de TCA 10%. A atividade enzimática foi medida pela absorvância a 440 nm, após adição de 1,0 ml de NaOH 2 N a 1,0 ml do filtrado.

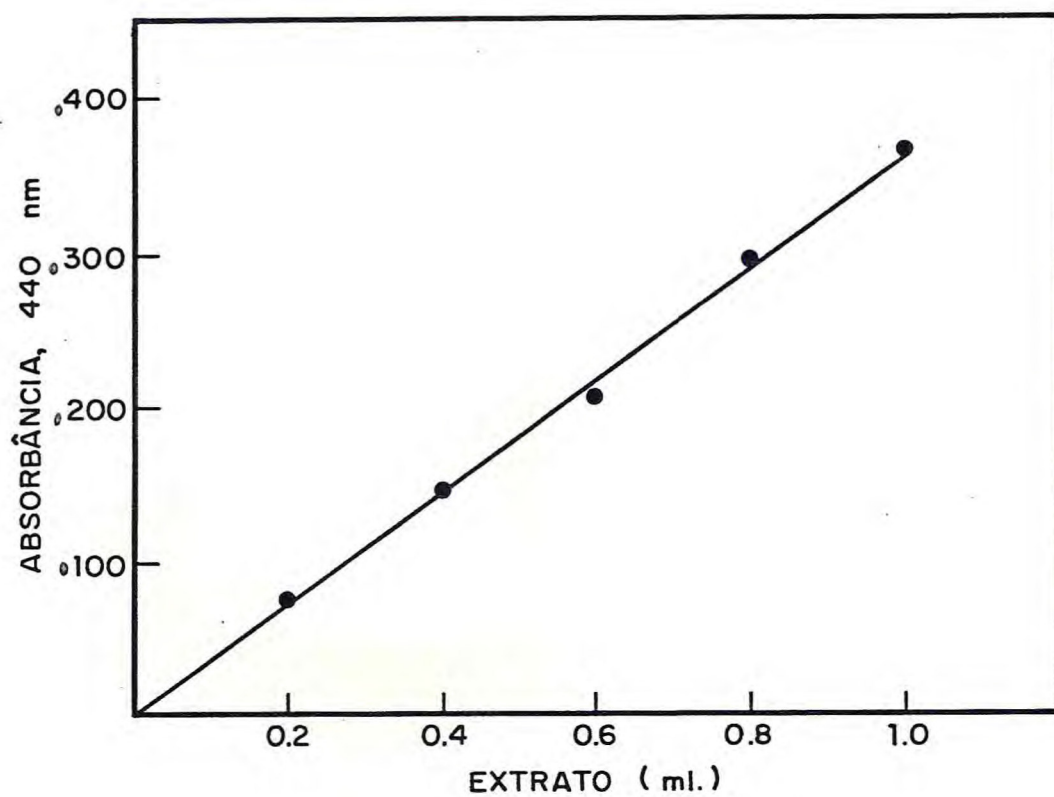


Figura 10 - Efeito da concentração de azo-caseína se presente em extrato de pupa de *Callosobruchus maculatus* sobre a velocidade de reação. As condições de ensaio são as mesmas descritas na Figura 9.



### 3. Nitrogênio amino-solúvel

A quantidade de nitrogênio amino-solúvel referida a uma curva padrão de leucina foi determinada nos filtrados dos ensaios de atividade hemoglobínica e azo-caseínica de pupas de *Callosobruchus maculatus* e comparada com a determinada nos filtrados dos ensaios de atividade de pepsina utilizando-se hemoglobina e azo-caseína como substratos nas mesmas condições de ensaio desenvolvidas para as atividades hemoglobínica e azo-caseínica. Os resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3 sugerem que a atividade hemoglobínica é cerca de 17 vezes maior que a atividade de azo-caseínica.

### 4. Filtração em gel dextrana

O extrato total de pupas, dialisado e liofilizado, mostrou 2 componentes quando submetido à filtração em gel dextrana (Sephadex G-100) em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6. Um componente A, de peso molecular em torno de 104000 daltons, encerrando as atividades hemoglobínica e azo-caseínica. O componente B não encerra estas atividades e tem peso molecular em torno de 6.000 daltons (Figura 11). Quando se usou tampão acetato 0,02 M, pH 5,0 como tampão de eluição, o comportamento do extrato de pupas foi idêntico ao anterior, mostrando que a distribuição de peso molecular para as duas atividades não depende de pH, pelo me-

TABELA 2

Enzima	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g peps}$	$\mu\text{M Leu}/\text{pupa}$	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g pupa}$	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g prot}$	$\mu\text{g peps}/\mu\text{g prot}$
Pepsina	$12 \times 10^{-3}$				
Hb-ase		$180 \times 10^{-3}$	$0,06 \times 10^{-3}$	$0,875 \times 10^{-3}$	0,073

$\mu\text{M}$  de leucina produzido nas seguintes condições de ensaio: substrato, hemoglobina 1%; temperatura,  $40^{\circ}\text{C}$ ; pH, 3,5; tempo de reação, 60 minutos

TABELA 3

Enzima	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g peps}$	$\mu\text{M Leu}/\text{pupa}$	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g pupa}$	$\mu\text{M Leu}/\mu\text{g prot}$	$\mu\text{g peps}/\mu\text{g prot}$
Pepsina	$23 \times 10^{-3}$				
AzC-ase		$22 \times 10^{-3}$	$0,0074 \times 10^{-3}$	$0,1 \times 10^{-3}$	0,0043

$\mu\text{M}$  de leucina produzido nas seguintes condições de ensaio: substrato, azo-caseína 1%; temperatura,  $50^{\circ}\text{C}$ ; pH, 5,0; tempo de reação, 30 minutos.

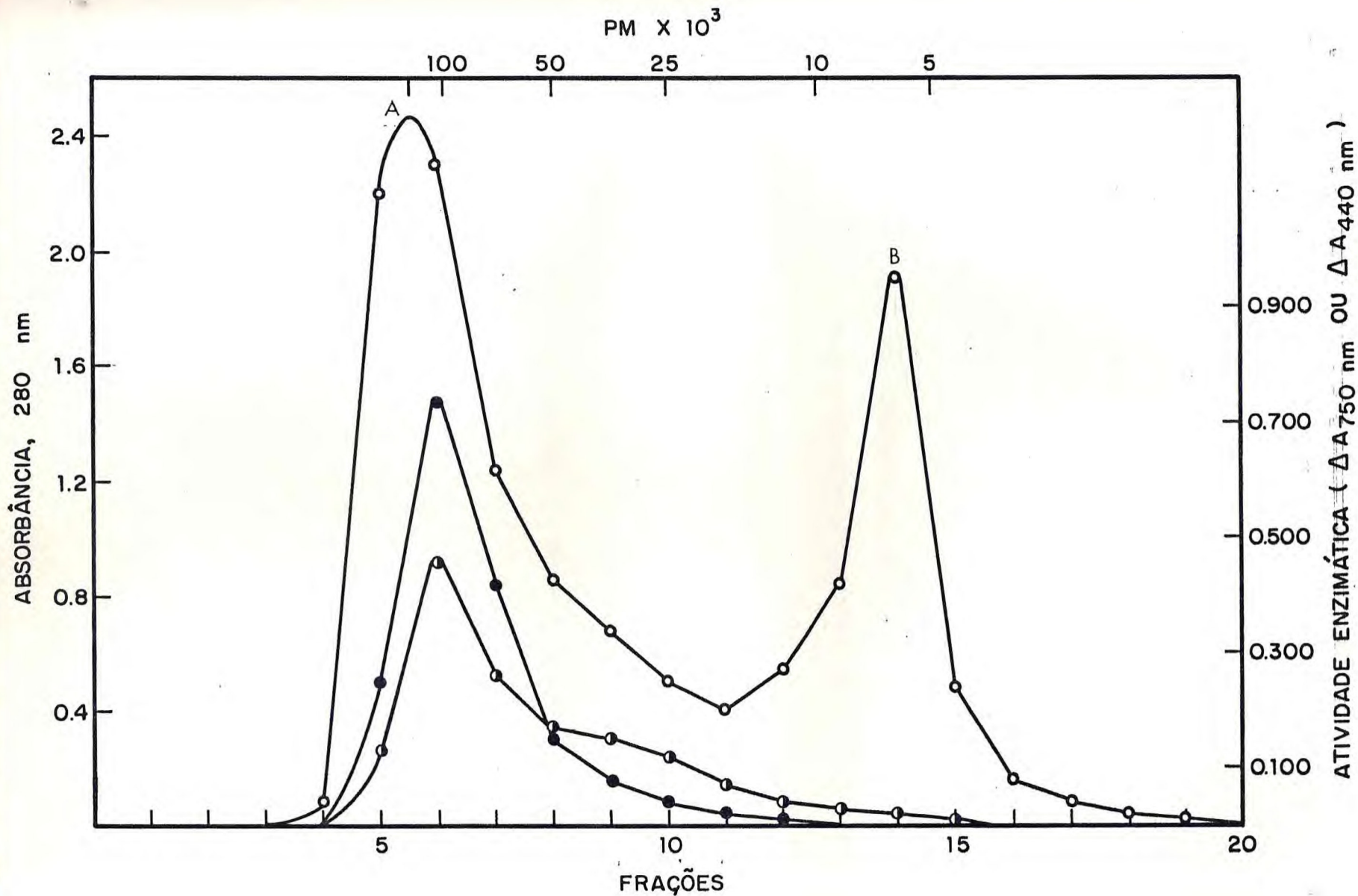


Figura 11 - Cromatografia em Sephadex G-100 de extrato de pupa dialisado e liofilizado. Coluna 1,3 cm x 18 cm; tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6; Volumes das frações, 2,0 ml. (○-○) concentração de proteína (A<sub>280 nm</sub>); (●-●) atividade azo-caseinásica (A<sub>440 nm</sub>); (◻-◻) atividade hemoglobínásica (A<sub>750 nm</sub>).

nos na região utilizada (Figura 12). Tanto em pH 7,6 como em pH 5,0 foi evidenciada a presença de um componente com atividade hemoglobínica na região de peso molecular em torno de 30.000 daltons. Este componente aparentemente não apresenta atividade azo-caseínica.

##### 5. Atividade inibitória

O gráfico de inibição de hemoglobinase de pupas pelo inibidor bruto de *Vigna sinensis* cv. seridó é mostrado na Figura 13. Observa-se que, para inibir totalmente a atividade hemoglobínica encerrada em 4 mg de pupas, são necessárias 5 mg de inibidor bruto. Como as pupas apresentam 7% de proteína, verifica-se que são necessárias 17,8 mg de inibidor bruto para inibir completamente a atividade hemoglobínica encerrada em 1,0 mg de proteína de pupa (Tabela 4).

A inibição de azo-caseinase de pupas pelo inibidor bruto é mostrada na Figura 14. A partir desse gráfico é possível se calcular que são necessárias 6,1 mg de inibidor bruto para abolir completamente a atividade azo-caseínica encerrada em 1,0 mg de proteína de pupa (Tabela 4).

A Figura 15 mostra a inibição de tripsina ainda pelo mesmo inibidor bruto observando-se que são necessárias apenas 0,3 mg de inibidor bruto para inibir completamente a atividade de 1,0 mg de tripsina (Tabela 4).

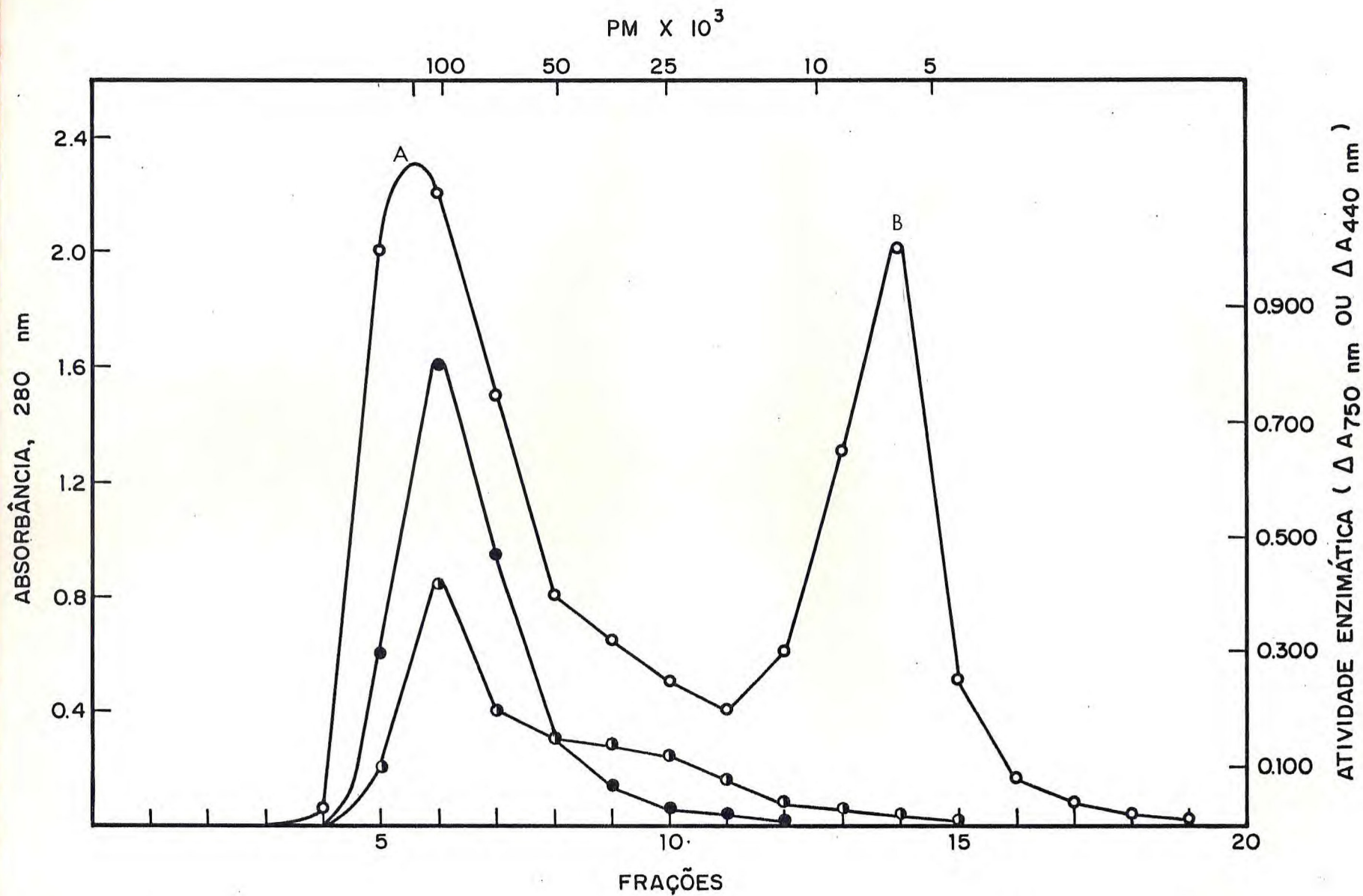


Figura 12 - Cromatografia em Sephadex G-100 de extrato de pupa dialisado e liofilizado. Coluna 1,3 cm x 18 cm; tampão acetato 0,02 M, pH 5,0. Volumes das frações, 2,0 ml. (○-○) concentração de proteína (A<sub>280 nm</sub>); (●-●) atividade azo-caseinásica (A<sub>440 nm</sub>); (○-○) a-

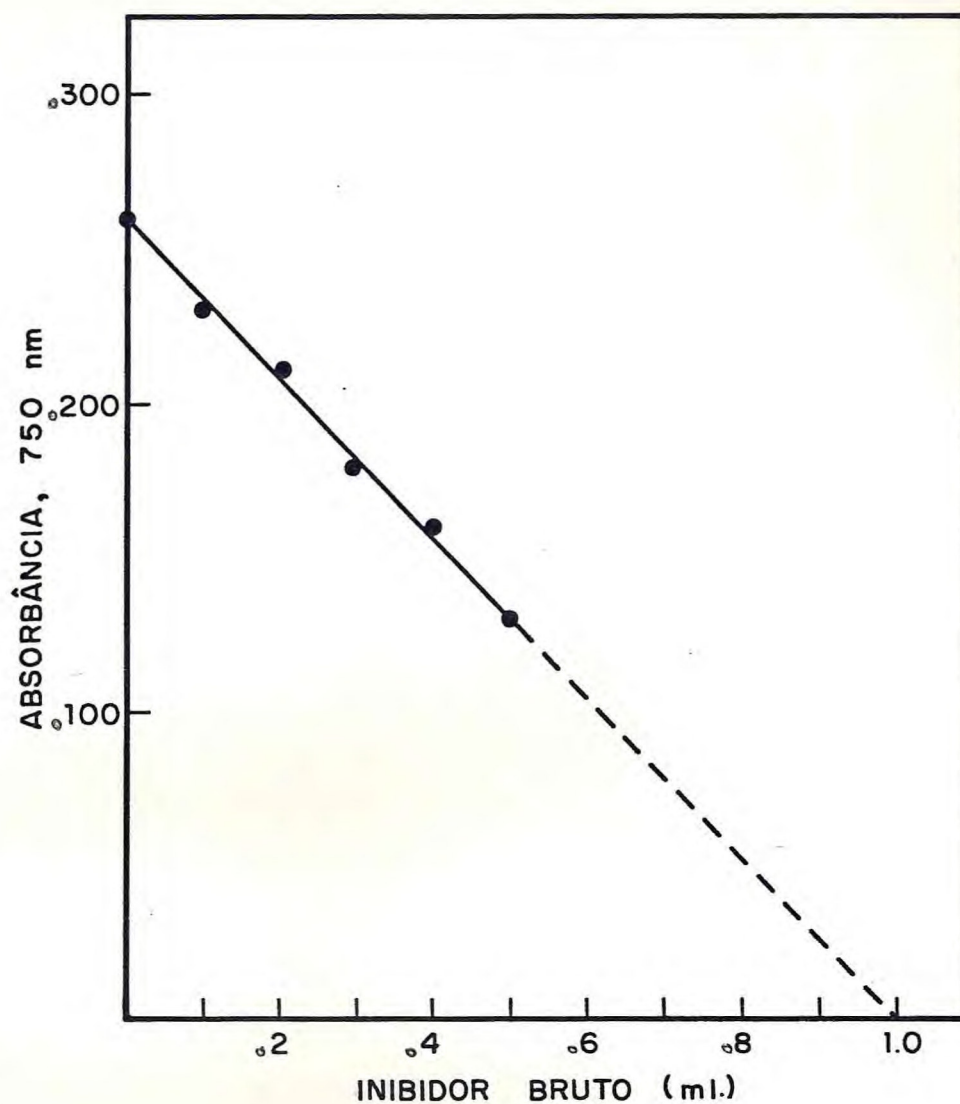


Figura 13 - Efeito da concentração do IB de *Vigna sinensis* cv. seridõ sobre a atividade hemoglobínica presente em extrato de pupa de *C. maculatus*. Foi utilizado 0,5 ml de extrato aquoso de pupa (2 pupas/ml). A solução de inibidor bruto foi preparada em água destilada na proporção de 5 mg/ml. As demais condições de ensaio foram as estabelecidas para o ensaio de hemoglobinase.

TABELA 4

Enzima	IB/proteína (mg/mg)
Hemoglobinese	17,80
Azo-caseinase	6,10
Tripsina	0,30

Relação entre a quantidade de inibidor bruto de *Vigna sinensis* cv. seridô e a quantidade de proteína de pupa ou tripsina necessária para abolir as atividades hemoglobínica, azo-caseinásica e triptica.



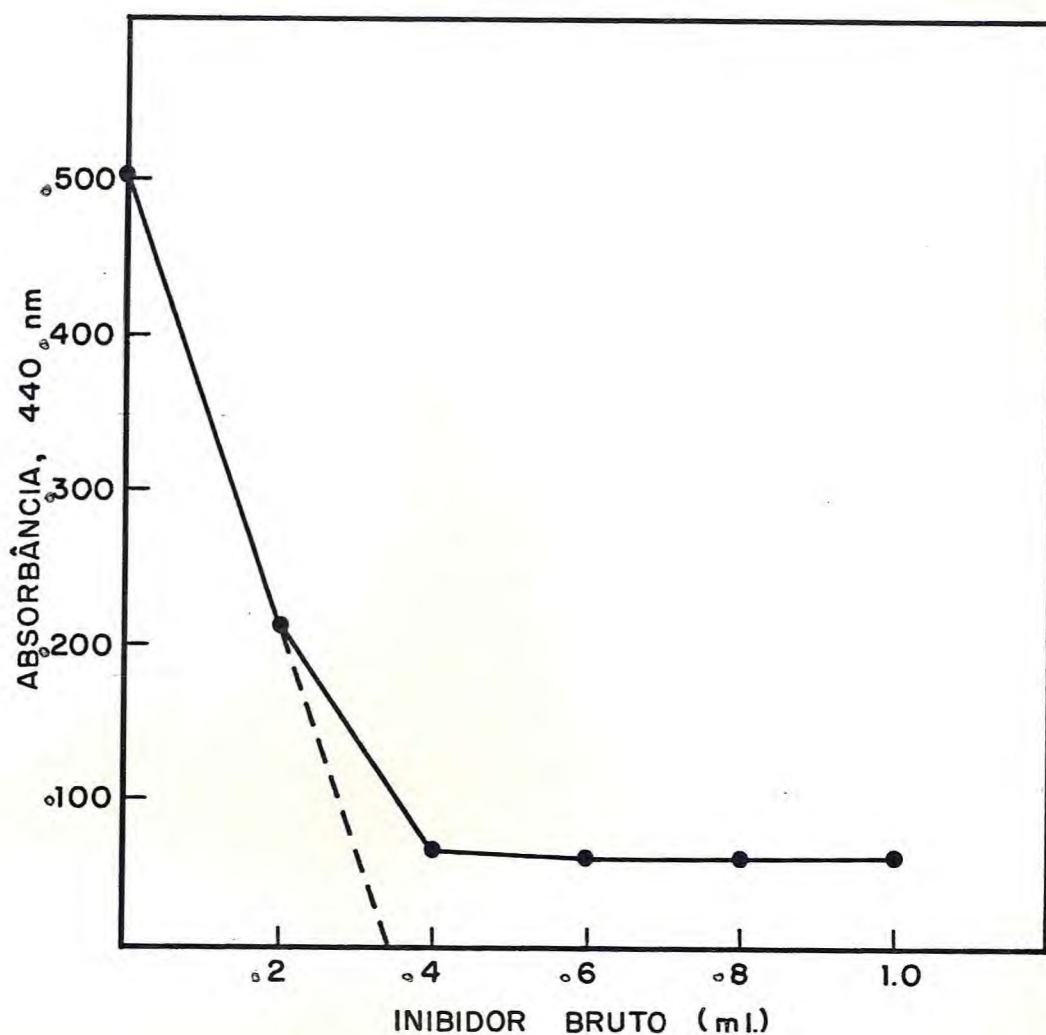


Figura 14 - Efeito da concentração de IB de *Vigna sinensis* cv. seridô sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *Callosobruchus maculatus*. Foi utilizado 1,0 ml de extrato aquoso de pupa (10 pupas/ml). A solução de IB foi preparada em água destilada na proporção de 38 mg/ml. As demais condições de ensaio foram as estabelecidas para o ensaio de azo-caseinase.

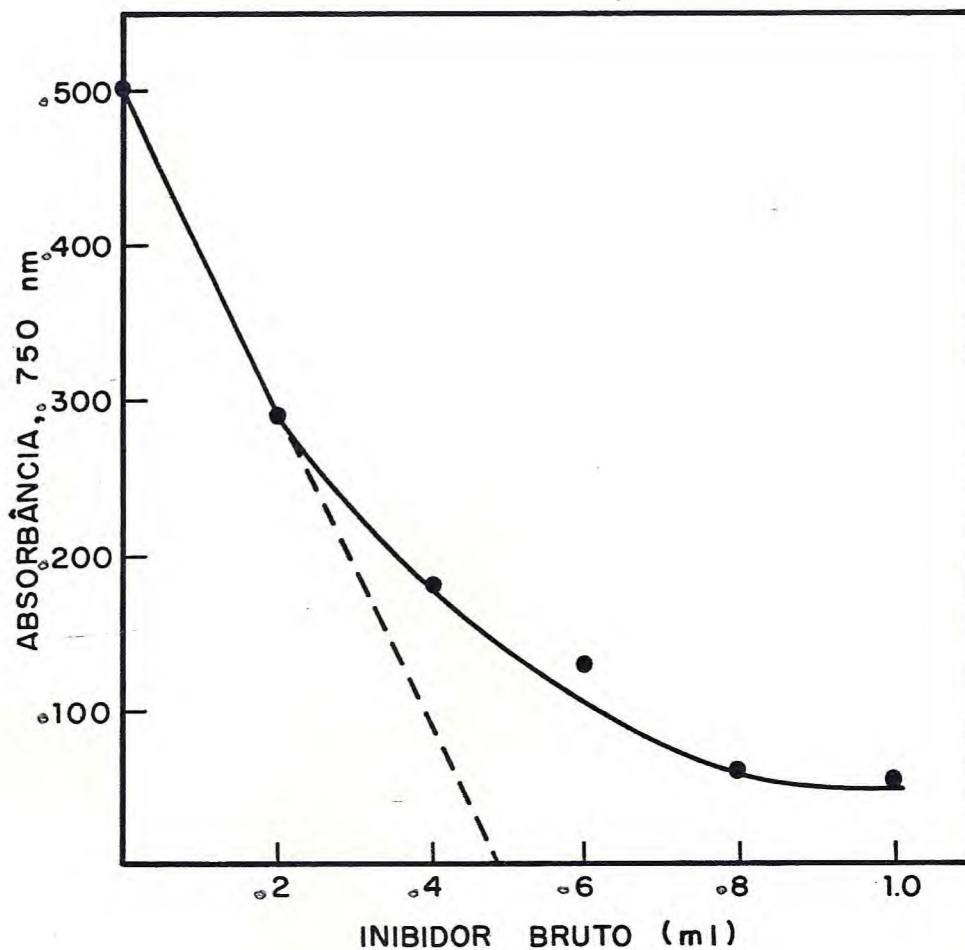


Figura 15 - Efeito da concentração do IB de *Vigna sinensis* cv. seridô sobre a atividade da tripsina (13,3  $\mu\text{g/ml}$ ; sendo utilizados 0,5 ml). A solução de IB foi preparada em água destilada na concentração de 4  $\mu\text{g/ml}$ . As condições de ensaio foram aquelas usadas para determinação de tripsina e descritas em Métodos.

As atividades anti-azo-caseinásicas de extratos brutos de sementes dos diversos cultivares de *Vigna sinensis* e do cultivar TVu-2027 de *Vigna unguiculata* foram determinadas pelo método estabelecido. Duas curvas típicas para o cultivar seridô e para o cultivar TVu-2027 são mostradas nas Figuras 16 e 17, respectivamente. As atividades anti-tríptica foram também determinadas para os mesmos cultivares. A Tabela 5 mostra ambos os tipos de atividade anti-enzimática dos diversos extratos brutos das sementes e do inibidor bruto do cultivar seridô. A relação entre os dois tipos de inibidores sugere que o inibidor de azo-caseinase não é purificado quando da preparação de inibidor bruto, pois, enquanto a atividade anti-tríptica passa de 4.180 para 1.040.000 a anti-caseinásica passa de 549 para apenas 658 (Tabela 5).

#### 6. Presença de inibidores em pupas e adultos

Extratos de pupas e adultos de *C. maculatus* foram examinados com a finalidade de se determinar a presença de atividade anti-tríptica e anti-quimiotríptica. Os resultados obtidos mostraram que somente a atividade anti-quimiotríptica se encontra presente em pupas com 17-20 dias, na proporção de 0,036  $UI_{QT}/mg$ .

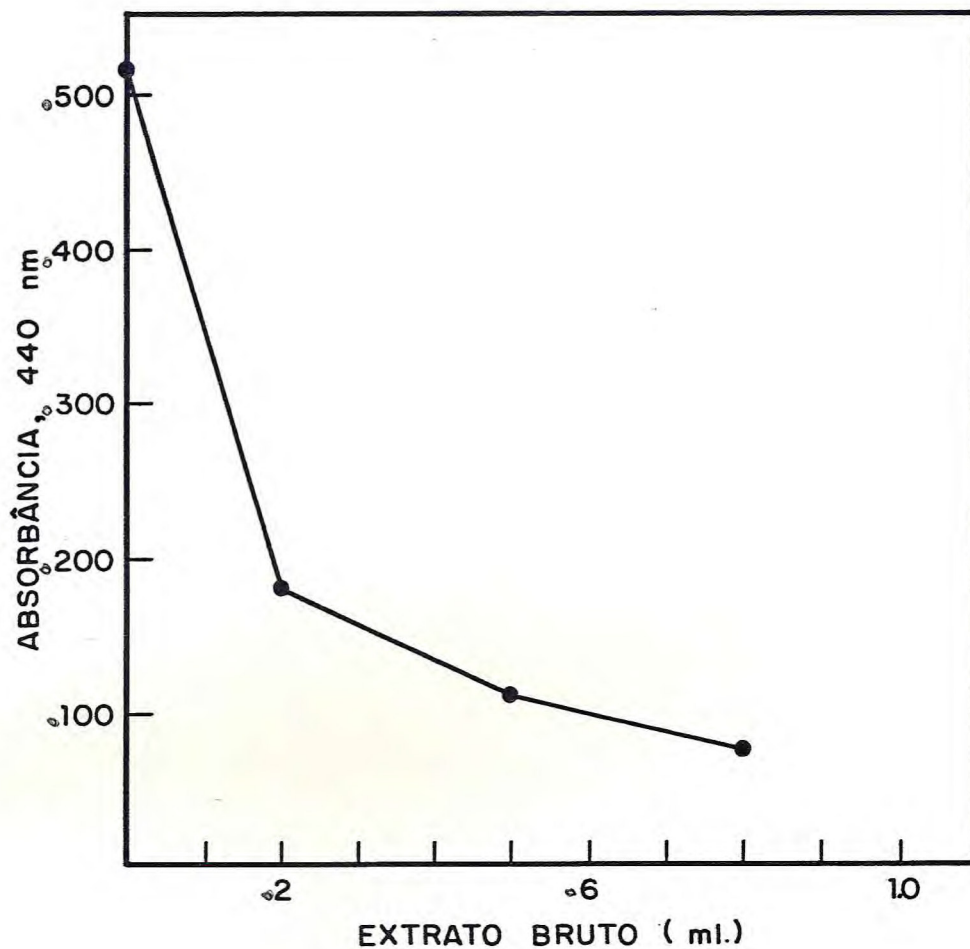


Figura 16 - Efeito inibitório da concentração de extrato bruto de *Vigna sinensis* cv. seridô 1:10 (farinha : meio de extração) sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato aquoso de *Callosobruchus maculatus* (10 pupas/ml). As condições de ensaio foram as estabelecidas para o ensaio de atividade azo-caseinásica.

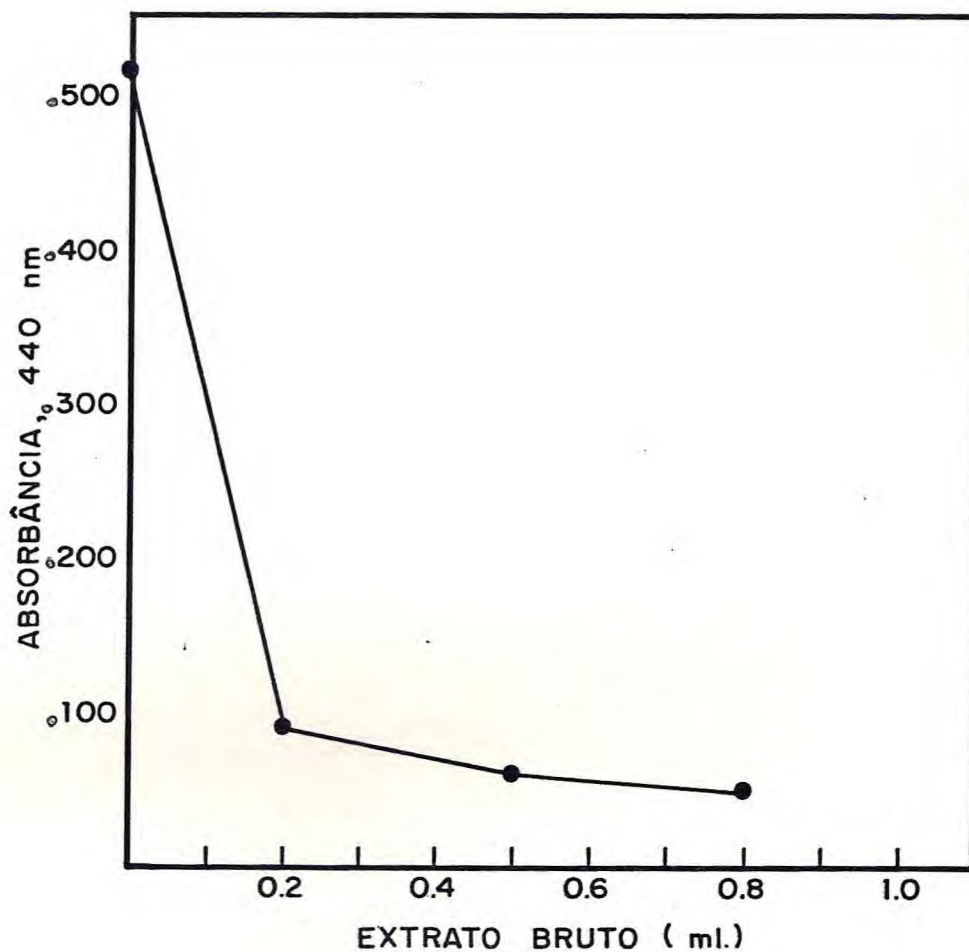


Figura 17 - Efeito inibitório da concentração de extrato bruto de *Vigna unguiculata* (TVu-2o27) 1:10 (farinha:meio de extração) sobre a atividade azo-caseinásica presente em extrato de pupa de *Callosobruchus maculatus* (10 pupas/ml). As condições de ensaio foram aquelas estabelecidas para o ensaio de atividade azo-caseinásica.

TABELA 5

Cultivares	$UI_T/g^*$	$UI_{AzC-ase}/g$	$UI_T/UI_{AzC-ase}$
CE-01 (seridó)	4.100	549	7,47
CE-25	3.740	541	6,91
CE-31	4,320	510	8,47
CE-237	4.500	550	8,18
CE-315	4.500	558	8.00
Pitiúba	5.800	578	10.03
Red-bow	13.100	571	22.94
Q. cadeira	15.700	590	26,61
TVu-2027	24.000	703	34,42
IB (seridó)	1.040.000	658	1580

Inibição da atividade triptica e da atividade azo-caseinásica de pupas de *Callosobruchus maculatus* por extratos brutos de diversos cultivares de *Vigna sinensis*, TVu-2027 (*Vigna unguilata*). Para comparação são mostrados os valores para o IB do cultivar seridó.

\* De acordo com Xavier Filho  $1UI_T = 0,6 \mu g$ , portanto o cultivar seridó apresenta cerca de 0,25% de inibidor e o inibidor bruto cerca de 62%.

### 7. Resistência da semente ao *Callosobruchus*

A Figura 18 mostra a correlação entre a concentração de inibidores de tripsina de diversas sementes e a emergência de adultos de *Callosobruchus maculatus* em *Vigna unguiculata* (TVu-2027), *Phaseolus vulgaris* (Rico 23 e um cultivar "mulatinho") e diversos cultivares de *V. sinensis*. A correlação entre a emergência de adultos de *C. maculatus* e a concentração de inibidores de azo-caseinase presentes nas sementes é mostrada na Figura 19.

### 8. Ação das proteases de pupa sobre o IB do cultivar seridô

Uma preparação bruta de inibidores de *V. sinensis* cv. seridô foi incubada com extrato de pupa de *C. maculatus* com a finalidade de observar-se a ação exercida pelas proteases destas pupas sobre a atividade anti-tríptica e anti-quimiotríptica do IB. Os resultados obtidos mostraram que as atividades anti-tríptica e anti-quimiotríptica do IB permaneciam inalteradas.

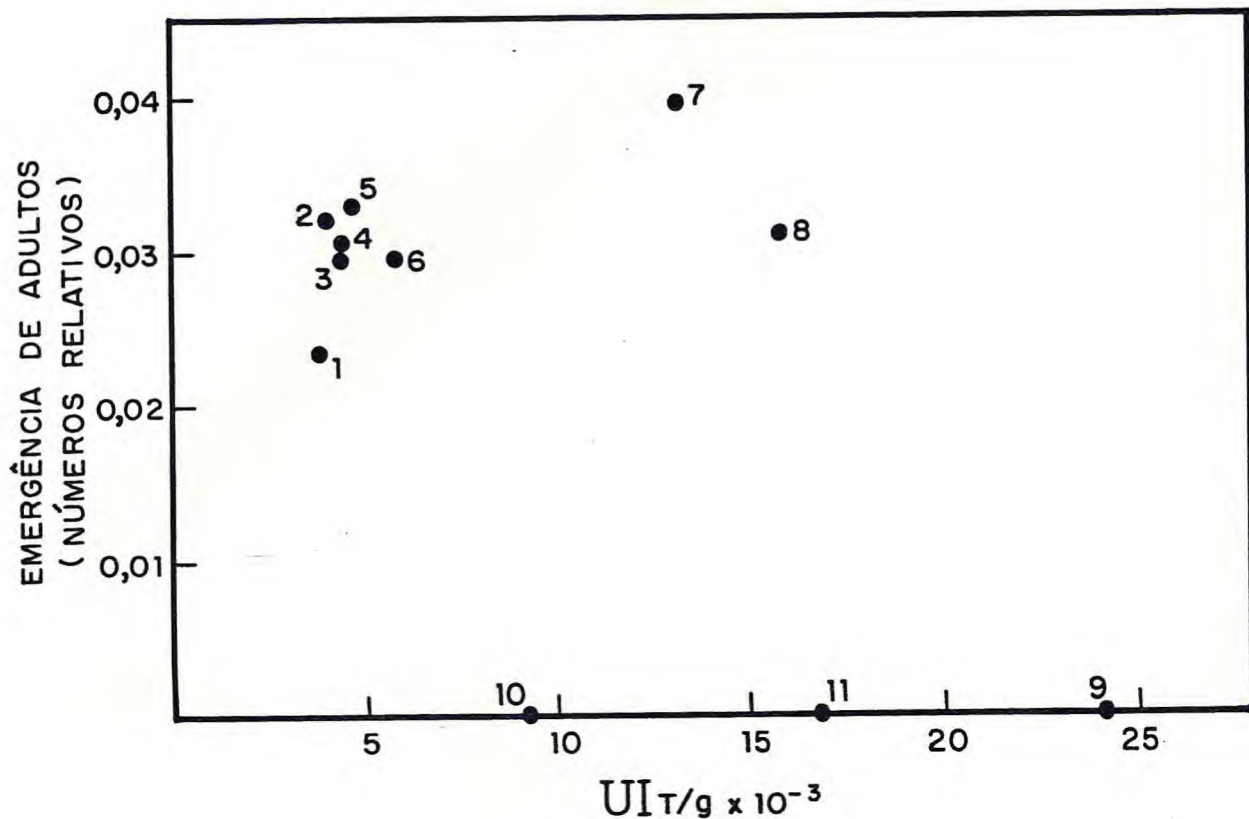


Figura 18 - Correlação entre a emergência de adultos de *Callosobruchus maculatus* em diversos cultivares de *Vigna sinensis* ( (1) CE-25; (2) CE-01; (3) CE-31; (4) CE-237; (5) CE-315; (6) pitiúba; (7) red-bow; (8) quebra cadeira ), em *Vigna unguiculata* ( (9) TVu-2027 ) e em *Phaseolus vulgaris* ( (10) "mulatinho"; (11) rico-23 ) e a concentração de inibidores de tripsina nestas sementes.



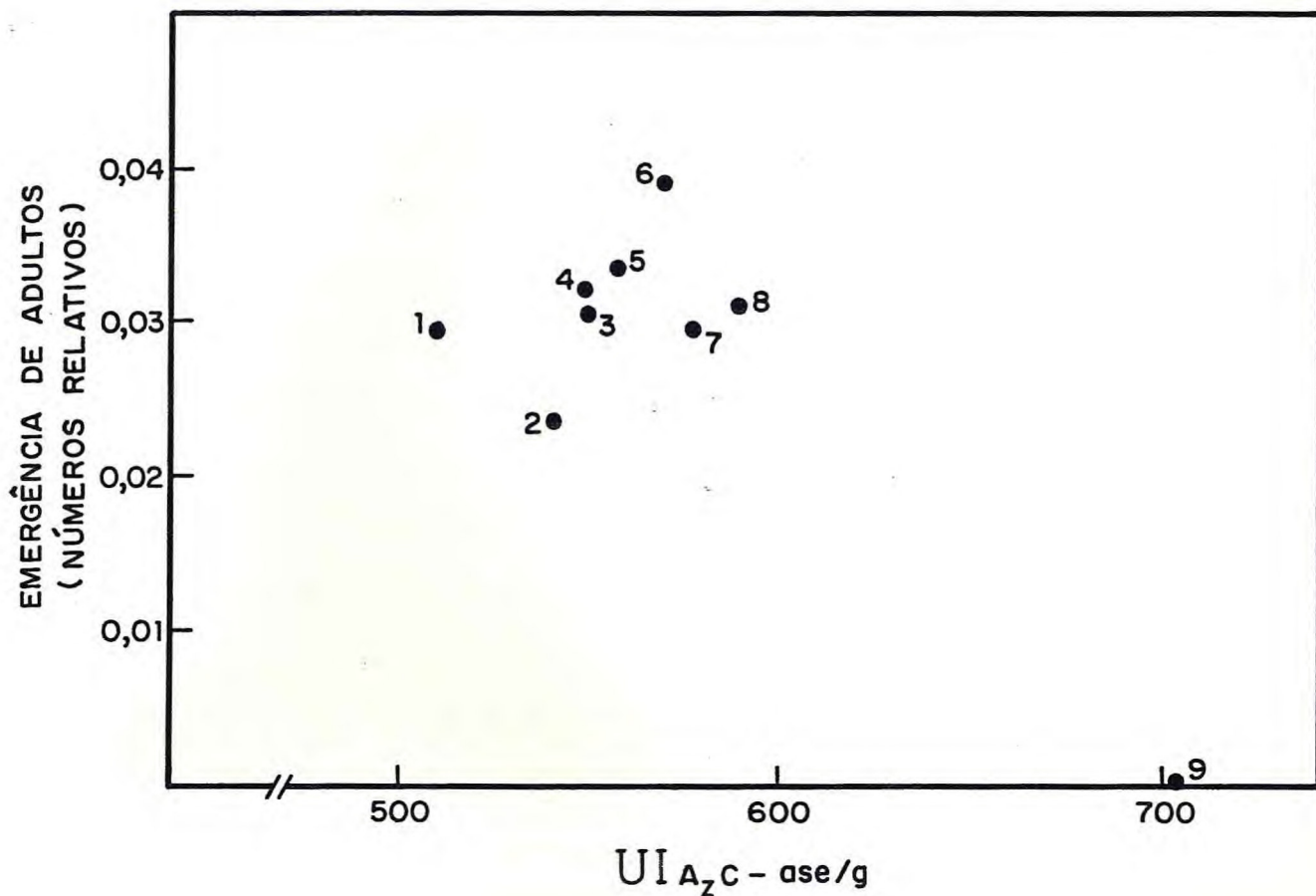


Figura 19 - Correlação entre a emergência de adultos de *Callosobruchus maculatus* em diversos cultivares de *Vigna sinensis* ( (1) CE-25; (2) CE-01; (3) CE-31; (4) CE-237; (5) CE-315; (6) pitiúba; (7) red-bow; (8) quebra cadeira ) e em *Vigna unguiculata* ( (9) TVu-2027 ) e as concentrações de inibidores de azo-caseinase nestas sementes.

#### IV. DISCUSSÃO

Proteases digestivas de insetos foram sempre estudadas em extratos brutos ou homogenatos de tecido intestinal. Os substratos normalmente usados foram gelatina, caseína e hemoglobina (24). As proteases isoladas de insetos apresentam, em sua quase totalidade, atividade semelhante à tripsina ou à quimiotripsina. As do tipo tripsina têm peso molecular entre 17.000 e 32.000 daltons e já foram isoladas de *Pieris brassica*, *Apis mellifera*, *Manduca sexta*, *Vespa orientalis*, *Tineola bisselliella* e *Locusta migratoria* (24). Proteases, tipo quimiotripsina, já foram isoladas de *Vespa orientalis*, *Apis mellifera* e *Pieris brassica* (24).

Dos insetos estudados, poucos são os que apresentam proteases ativas em pH ácido e, dentre eles, podemos citar: *Calliphora erythrocephala*, *Locusta migratoria migratoroides*, *Chironomus tentans* e *Antheracea pernyi* (24).

Pupas de *Callosobruchus maculatus* apresentaram forte atividade proteolítica em pH ácido. Utilizando-se hemoglobina e azo-caseína como substrato foram detectados valores de pH ótimos de 3,5 e 5,0, respectivamente. As atividades hemoglobínica e azo-caseinásica de pupa em pH alcalino (> 7,0) correspondem a 3% e 7%, respectivamente, de sua atividade nos respectivos valores de pH ótimo (Figuras 1 e 6). Ambas atividades são mais fortes em pupas que em

adultos (Tabela 1), sendo que a atividade hemoglobínica é cerca de 17 vezes maior que a atividade azo-caseínica (Tabelas 2 e 3).

Um peso molecular de aproximadamente 104.000 daltons, por filtração em gel (Sephadex G-100), foi encontrado para as duas proteases ácidas. É evidente a presença de um componente com atividade hemoglobínica na região de peso molecular de 30.000 daltons. Aparentemente este componente não apresenta atividade azo-caseínica. Pode-se também observar que a distribuição de peso molecular para as duas atividades não depende de pH, pelo menos na região estudada (Figuras 11 e 12).

Quando um inseto seleciona sua semente hospedeira, é bastante razoável aceitar-se a idéia de que seu sistema proteolítico seja capaz de digerir extensivamente as proteínas desta semente, principalmente se esta é rica em proteína, como é o caso de *Vigna* (24-34%). Este sistema, necessariamente, forneceria os aminoácidos requeridos para o desenvolvimento da larva.

Em confronto com esta idéia simples, Applebaum, no entanto, trabalhando com *Callosobruchus chinensis*, sementes de *Cicer arietinum*, *Vicia faba*, *Lens esculenta* (susceptíveis) e *Phaseolus vulgaris* (resistente), sugeriu que larvas deste bruquídio apresentavam uma atividade proteolítica incapaz de suprir as necessidades nutricionais requeridas

pelo inseto em desenvolvimento. Esta observação levou o autor a afirmar que essa baixa atividade proteolítica, aliada às proteases da semente e ao nível de peptídios inicialmente presentes na semente, poderia fornecer os aminoácidos necessários ao desenvolvimento da larva (1).

A atividade proteolítica baixa encontrada em *C. chinensis*, referida por Applebaum, provavelmente se deve ao fato do autor ter trabalhado em pH alcalino. Isto o teria levado a sugerir também que o inseto teria esta baixa atividade proteolítica em virtude de seu hospedeiro ser rico em inibidores de tripsina (1).

Embora seja certo que *Callosobruchus maculatus* (filogeneticamente muito próximo ao *Callosobruchus chinensis*) tenha baixa atividade proteolítica tipo tripsina (10), esta é bastante baixa, provavelmente cerca de 290 vezes menor do que a atividade hemoglobínica e cerca de 17 vezes menor que a atividade azo-caseinásica descritas neste trabalho.

Existem sementes, normalmente não hospedeiras, que são resistentes ao ataque de *C. maculatus*, mas permitem a oviposição (18). Janzen sugeriu que esta resistência poderia ser devida à presença de fitohemaglutinina, inibidores de tripsina ou outros compostos secundários presentes nestas sementes, além de não afastar a possibilidade de interferência do tegumento (18, 20). A incorporação do inibidor

de tripsina de soja nos níveis de 0,1 e 1% a sementes artificiais, não causa nenhum efeito sobre o desenvolvimento da larva de *C. maculatus*, entretanto, quando se eleva este nível para 5% ocorre uma redução de 21% na sobrevivência do inseto (20).

A resistência ao ataque de *C. maculatus* testada com sementes de *Vigna* mostrou que apenas um cultivar (TVu-2027) era resistente (Figura 18). Esta semente apresenta cerca de 1,5% de inibidor de tripsina, enquanto nas demais a concentração varia de 0,23 a 0,94%. As duas sementes de *Phaseolus vulgaris* testadas, também são resistentes ao *C. maculatus*, embora a concentração de inibidores de tripsina nestas sementes seja inferior a 1%.

Gatehouse (10) sugeriu recentemente que o nível de inibidores de tripsina presente no cultivar TVu-2027, por sua ação sobre a atividade tipo tripsina, seja o fator responsável pela resistência desta semente ao ataque de *Callosobruchus maculatus*. Esta sugestão parece não ter muita consistência, pois, a relação de inibição (a 70%) de protease tipo tripsina de larva e o inibidor de tripsina purificado de *Vigna* é de 1:5.000, como calculado a partir de seus dados (10).

As atividades hemoglobínica e azo-caseinásica presentes em larvas de *C. maculatus* são inibidas por extratos brutos de diversos cultivares de *Vigna sinensis* e pelo

IB do cultivar seridô, aparentemente com constantes de associação bastante altas (Figuras 13 e 14, Tabela 4). Isto sugere que os inibidores destas proteases poderiam também contribuir para a resistência apresentada pelo cultivar TVu-2027, se esta fosse devida à inibição de enzimas proteolíticas.

Os inibidores de tripsina parecem não ser os responsáveis por essa forte inibição da atividade azo-caseínica. Isto se torna evidente pelo fato de que o extrato de *Vigna sinensis* cv. seridô contém cerca de 0,25% de inibidores de tripsina e o IB deste mesmo cultivar apresenta cerca de 62% desses inibidores, entretanto a concentração de inibidores de azo-caseinase destas duas preparações é praticamente a mesma (Tabela 5).

As proteases ácidas, hemoglobinasase e azo-caseinase, de pupas de *Callosobruchus maculatus* não são capazes de destruir, "in vitro", os inibidores de tripsina de *V. sinensis* cv. seridô. Estes se encontram na semente numa proporção maior com relação às proteases da pupa. Mesmo o cultivar seridô, que tem baixo teor de inibidores de tripsina, apresenta uma concentração destas substâncias de 0,5 a 8,3 vezes maior que a concentração de proteases larvais. Esta quantidade aparentemente poderia ser suficiente para inibir todas as proteases da larva (Tabelas 2, 3, 5).

É tentador sugerir aqui, que os inibidores de

tripsina (ou mesmo os inibidores de azo-caseinase e hemoglobina-se) provavelmente sejam responsáveis pela resistência do cultivar TVu-2027 ao *C. maculatus*, não somente porque inibam as proteases tipo tripsina (ou hemoglobina-se e azo-caseinase) da larva, mas por causa da sua própria indigestibilidade.

Os inibidores de proteases, em sua conformação nativa, são moléculas compactas cujos centros ativos estão, invariavelmente, localizados no interior de alças formadas por pontes dissulfeto (24). Nesta conformação os inibidores não sofrem, normalmente, o ataque de endopeptidases. Para que eles possam ser digeridos é necessário que as pontes dissulfeto sejam reduzidas, o que provavelmente ocorre no trato digestivo das larvas, o qual parece ser fortemente redutor (24). A resistência do cultivar TVu-2027 ao *C. maculatus* provavelmente se deve ao fato de que o "poder redutor" encontrado no trato digestivo da pupa não é suficiente para diminuir a alta concentração de inibidores de tripsina presente na semente. Esta interpretação é sugerida por duas observações: a primeira, de que algumas larvas de *Callosobruchus maculatus* conseguem alcançar a fase adulta no cultivar resistente, embora não consigam emergir, e, a segunda é a observação da presença de um inibidor de quimiotripsina em pupas de *C. maculatus* que se desenvolvem em *V. sinensis* cv. seridó. Este inibidor poderia ser um fragmento ativo do ini

bidor de "dupla cabeça" isolado por Ventura e Xavier (35). Como sugeriu Maria Ruschel (30), os centros anti-tríptico e anti-quimiotríptico deste inibidor, apresentam diferente resistência à redução por  $\beta$ -mercaptoetanol. Este inibidor de quimiotripsina larval seria, portanto, resultado de redução incompleta do inibidor de tripsina/quimiotripsina da semente.

Parece lícito sugerir aqui que a resistência ao *Callosobruchus maculatus* apresentada pelo cultivar TVu-2027 se deve, pelo menos em parte à insuficiência do "poder reductor" do trato digestivo da larva frente à alta concentração de inibidores de tripsina da semente.



## W. CONCLUSÕES

1. Pupas de *Callosobruchus maculatus* apresentam forte atividade proteolítica em pH ácido, sendo uma atividade hemoglobínica com pH ótimo a 3,5 e uma atividade azo-caseínica, cujo pH ótimo é 5,0.
2. As atividades hemoglobínica e azo-caseínica são mais fortes em pupas que em adultos. Em pupas, a atividade hemoglobínica é cerca de 17 vezes mais forte que a atividade azo-caseínica.
3. O extrato bruto de pupa, quando submetido à filtração em gel dextrana (Sephadex G-100) em pH 5,0 e 7,6, apresenta um componente com peso molecular em torno de 104.000 daltons, encerrando as atividades hemoglobínica e azo-caseínica. Observa-se também um componente com peso molecular em torno de 30.000 daltons, com atividade hemoglobínica.
4. Foram detectados em extratos brutos de diversos cultivares de *Vigna sinensis* e no inibidor bruto do cultivar seridó fortes atividades inibitórias das duas enzimas ácidas.
5. Os inibidores de tripsina existentes em sementes de *Vigna* não são afetados pelas duas atividades.

6. Foi observada a presença de um inibidor de quimiotripsina em pupas de *Callosobruchus maculatus*.
7. Os inibidores de tripsina parecem não ser os responsáveis pela inibição da atividade azo-caseinásica presente em *Callosobruchus maculatus*.
8. A resistência do cultivar TVu-2027 ao *Callosobruchus maculatus* poderia ser devida à alta concentração de inibidores de tripsina, os quais não seriam adequadamente destruídos no trato digestivo da larva.

## VI. BIBLIOGRAFIA

01. APPLEBAUM, S.W. 1964. Physiological aspects of host specificity in the *Bruchidae* - I. General considerations of developmental compatibility. *J. Ins. Physiol.*, 10, 783-788.
02. BASTOS, J.A.M. 1969. Influência da cor do feijão de corda, *Vigna sinensis* Endl., no ataque do gorgulho *Callosobruchus analis* Fabr., 1775. (*Col., Bruchidae*). *Turrialba*, 19, 296-297. (citado em 32).
03. BERGMAYER, H.U. 1974. Methods of enzymatic analysis. 2nd vol. 2, pp. 567-1124, Academic Press, New York.
04. BONDAR, G. 1963. Notas biológicas sobre bruchídeos observados no Brasil. *Arq. Inst. Biol. Veget.*, 3, 7-44. Rio de Janeiro. (citado em 32).
05. CARVALHO, J.P. e MACHADO, M.U.M. 1967. A entomofauna dos produtos armazenados. Contribuição para o estudo do *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). *Bol. Soc. Portuguesa de Ciências Naturais*, 11, 133-240.
06. CYRIL LONG, Ed. 1961. *Biochemist's handbook*. F. and F. N. Spon Ltda., London. pp. 32-41.
07. DAHLMANN, B., JANY, K.-D. and PFLEIDERER, G. 1978. The midgut endopeptidases of the honey bee (*Apis mellifera*)

- ca): comparision of the enzymes in diferent ontogenetic stages. *Insect Biochem.*, 8, 203-211.
08. DECHARY, J.M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors. *Econ. Bot.*, 24 (2), 113-122.
09. DETERMANN, H. 1969. Gel cromatography - gel filtration, gel permeation, molecular sieves. 2nd. ed. New York, Springer-Verlag, 202 p.
10. GATEHOUSE, A. 1979. Protease inhibitors and the biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. Ph.D. Thesis. University of Durham, England.
11. GOA, J. 1953. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5, 218-222.
12. GOAD, L.J. 1963. Ph.D. Thesis. University of Manchester.
13. HAYNES, R. and FEENEY, R.E. 1967. Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from lima bean. *J. Biol.*, 242, 5378-5385.
14. IBGE. 1978. Anuário estatístico do Brasil. Secretaria de Planejamento da Presidência da República, 1498p.

15. JANY, K.-D., HAUG, H. and ISHAY, J. 1978. Trypsin-like endopeptidases from the midgut of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect. Biochem.*, 8, 221-230.
16. JANY, K.-D., HAUG, H. and PFLEIDERER, G. 1978. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidases of from the larva of the hornet *Vespa crabro*. *Biochemistry*, 17 (22), 4675-4682.
17. JANY, K.-D., TABATABAI, M.S. and PFLEIDERER, G. 1974. Molecular weight determination of the chymotrypsin-like protease of the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*, by affinity labeling of the active center. *FEBS Letters*, 48 (1), 53-55.
18. JANZEN, D.H. 1977. How southern cowpea weevil larvae (*Bruchidae: Callosobruchus maculatus*) die on seeds. *Ecology*, 58, 921-927.
19. JANZEN, D.H., JUSTER, H.B. and BELL, E.A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry*, 16, 223-227.
20. JANZEN, D.H., JUSTER, H.B. and LIENER, I.E. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in

- black beans on a *Bruchidae* beetle. *Science*, 192, 795.
21. KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin. II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30, 291-310.
22. KUNZ, P.A. 1978. Resolution and properties of the proteinases in adult *Aedes aegypti* (L.). *Insect. Biochem.*, 3, 169-175.
23. LASKOWSKI, M. and LASKOWSKI, M.Jr. 1954. Naturally occurring trypsin inhibitors. *Adv. Prot. Chem.* (C. Anfisen, M. Anson, K. Barley and J. Edsall, Eds.), vol. 9, pp. 203-242, Academic Press, New York.
24. LAW, J.H., DUNN, P.E. and KRAMER, K.J. *Insect proteases and peptidases.*
25. LIENER, I.E. 1961. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *American J. of Clinical Nutr.*, 11, 281-298.
26. LIENER, I.E. and KAKADE, M.L. 1969. Protease inhibitors in toxic constituents of plant foodstuffs ( I.E. LIENER, ed.), pp. 7-68, Academic Press, New York.
27. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

28. RICHARDSON, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry*, 16, 159-169.
29. ROSEN, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 67, 10-15.
30. RUSCHEL, M.A. 1979. Estudo comparativo de inibidores de quimiotripsina em tres cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.
31. RYAN, C.A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 173-196.
32. SANTOS, J.H.R. 1971. Aspectos da biologia do *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1792) (Col. *Bruchidae*) sobre sementes de *Vigna sinensis* Endl. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade Federal de São Paulo.
33. SOUTGATE, B.J. 1979. Biology of the *Bruchidae*. *Ann. Rev. Entomol.*, 24, 449-473.

34. STEFFENS, R., FOX, F.R. and KASSELL, B. 1978. Effect of the trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). J. Agric. Food Chem., 26 (1), 170-174.
35. VENTURA, M.M. and XAVIER FILHO, J. 1966. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization. Ann. Acad. Brasil. Sci., 38, 553-566.
36. XAVIER FILHO, J. 1969. Ação do calor sobre inibidor trípico de soja no estado sólido. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
37. XAVIER FILHO, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. J. Food Sci., 39, 422-423.
38. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E. 1968. Natural proteinase inhibitors. Academic Press, New York.
39. WEIEL, J. and HAPNER, K.D. 1976. Barley proteinase inhibitors: a possible role in grasshopper control? Phytochemistry, 15, 1885-1887.
40. WIENDL, F.M. 1969. Alguns usos e efeitos das radiações gama em *Zabrotes subfasciatus* (Boh., 1833) (Col. *Bru chidae*). Dissertação de mestrado apresentada à Esco



la Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. (citado em 32).

41. ZWILLING, V.R. 1968.  $\alpha$ - und  $\beta$ -protease aus *Tenebrio molitor*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 326-332.