

ESTUDO DO SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *Callosobruchus maculatus*
(GORGULHO DO FEIJÃO) DURANTE SEU DESENVOLVIMENTO

ANA LÚCIA SERRA LOPES

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

FORTALEZA - 1985

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em encontro-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Ana Lúcia Serra Lopes

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

22/02/85

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

Iracema Lima Ainoz

Renato de Azevedo Moreira

Aos meus pais
José Alves Lopes ("in memoriam")
e
Florinda Serra Lopes,
com o meu amor filial

e
aos meus irmãos
com toda fraternidade.

Este trabalho foi realizado graças a auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação concedida à autora e de auxílios ao 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.

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 (Projeto de Pesquisas em Sementes).

AGRADECIMENTOS

Quero deixar aqui meus agradecimentos ao professor José Xavier Filho pela inestimável orientação que me foi dada, tornando, destarte, possível a elaboração deste trabalho.

Igualmente, agradeço aos professores Iracema Lima A_inouz e Renato de Azevedo Moreira pela valiosa ajuda que me prestaram na realização desta dissertação.

Sou grata, também, aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela compreensão, estímulo e boa vontade com que sempre se houveram.

Finalmente, expresso sinceros agradecimentos ao meu irmão Francisco José, que, em suas elucubrações, após a fadiga de um dia afanoso, pacientemente, datilografou o presente trabalho em sua fase preliminar.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xi
<u>RESUMO</u>	xii
<u>ABSTRACT</u>	xiv
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	11
2.1 - <u>Insetos</u>	11
2.2 - <u>Cultivares de Feijão</u>	11
2.3 - <u>Reagentes</u>	12
3 - <u>MÉTODOS</u>	13
3.1 - <u>Criação de Insetos</u>	13
3.2 - <u>Determinação de Peso Fresco</u>	13
3.3 - <u>Determinação da Quantidade de Massa de Feijão Ingerida</u>	13
3.4 - <u>Obtenção de Larvas, Pré-pupas, Pupas e Adultos de C. maculatus para Preparação de Extratos</u> ...	14
3.5 - <u>Preparação de Azocaseína</u>	15
3.6 - <u>Preparação das Soluções Utilizadas como Substrato</u>	15
3.7 - <u>Determinação de Proteína</u>	16
3.8 - <u>Determinação de Atividades Enzimáticas e Inibidores</u>	17
3.8.1 - <u>Atividade Azocaseinásica Alcalina</u>	17

3.8.1.1 - Concentração do Substrato e dos Extratos ..	18
3.8.1.2 - Efeito do pH	19
3.8.1.3 - Efeito do Tempo de Reação	19
3.8.1.4 - Unidade de Atividade	19
3.8.2 - Atividade Azocaseinásica Ácida	20
3.8.3 - Atividade Amilásica	20
3.8.4 - Atividade Fosfatásica Ácida	21
3.8.5 - Atividades Inibitórias	22
3.9 - <u>Ação de Inibidor Bruto (IB) sobre algumas Atividades Enzimáticas de C. maculatus</u>	23
3.9.1 - Ação do IB sobre Azocaseinase Ácida	23
3.9.2 - Ação do IB sobre Azocaseinase Alcalina de C. maculatus	24
3.9.3 - Ação do IB sobre Amilase de C. maculatus	24
3.10 - <u>Resistência de Sementes ao C. maculatus</u>	25
4 - <u>RESULTADOS</u>	26
4.1 - <u>Determinação de Peso Fresco</u>	26
4.2 - <u>Quantidade de Massa Ingerida</u>	26
4.3 - <u>Determinação de Proteínas em C. maculatus</u>	26
4.4 - <u>Atividade Azocaseinásica Alcalina</u>	30
4.4.1 - Condições de Ensaio	30
4.4.2 - Comportamento Durante o Desenvolvimento	35
4.5 - <u>Atividade Azocaseinásica Ácida</u>	35
4.6 - <u>Atividade Amilásica</u>	38
4.7 - <u>Atividade Fosfatásica Ácida</u>	38
4.8 - <u>Atividade Anti-quimiotríptica</u>	38
4.9 - <u>Ação do IB sobre as Atividades Enzimáticas Estudadas</u>	42
4.10 - <u>Resistência de Sementes de Vigna unguiculata ao C. maculatus</u>	42
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	43
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	47
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	49
8 - <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u>	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Peso fresco de C. maculatus durante o desenvolvimento	27
2	Massa de feijão ingerida pelo gorgulho durante o desenvolvimento	28
3	Massa de proteína presente em C. maculatus durante o desenvolvimento	29
4	Efeito da concentração de azocaseína sobre a atividade azocaseinásica alcalina presente em extratos de pré-pupa de C. maculatus	31
5	Efeito da concentração de azocaseinase alcalina presente em extrato de pré-pupa de C. maculatus sobre a velocidade de reação	32
6	Efeito do pH sobre a atividade azocaseinásica presente em extrato de pré-pupa de C. maculatus	33
7	Efeito do tempo de reação sobre a atividade azocaseinásica alcalina presente em extratos de pré-pupa de C. maculatus	34
8	Atividade azocaseinásica alcalina de C. maculatus durante o desenvolvimento	36
9	Atividade azocaseinásica ácida de C. maculatus ao longo do desenvolvimento	37
10	Atividade amilásica de C. maculatus durante o desenvolvimento	39
11	Perfil de atividade fosfatásica ácida de C. maculatus ao longo do desenvolvimento	40

FIGURA

Página

- 12 Perfil de atividade anti-quimiotróptica ao longo do desenvolvimento de *C. maculatus* 41

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Atividade residual de azocaseinase ácida, azo caseinase alcalina e amilase após tratamento do Inibidor Bruto de Vigna unguiculata cv Se- ridó	42

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TCA - Ácido tricloroacético

NPP - Para-nitrofenil fosfato

IB - Inibidor Bruto

UA - Unidade de Atividade

UDO - Unidade de Densidade Ótica

UI_{QT} - Unidade de inibidor de quimiotripsina

RESUMO

Atividades proteolíticas alcalina e ácida, além de atividades α -amilásica, fosfatásica ácida e anti-quimiotríptica foram detectadas durante o desenvolvimento de **Callosobruchus maculatus**.

Verificou-se um paralelismo entre o aumento de peso fresco dos animais, o consumo de massa de feijão (**Vigna unguiculata**), a atividade amilásica e a atividade proteolítica alcalina. Este paralelismo parece indicar que, como em outras espécies de insetos, a digestão em **C. maculatus** é dependente de uma atividade amilásica e de uma atividade proteolítica alcalina.

A atividade proteolítica ácida parece estar associada a processos histolíticos relacionados à passagem de pupa para adulto.

As atividades fosfatásica ácida e anti-quimiotríptica apresentam um comportamento mais complexo, parecendo estar associadas às diversas fases de desenvolvimento por que passa o inseto.

Foi sugerido que a inibição da atividade proteolítica alcalina do gorgulho por inibidores de tripsina existentes no feijão de corda seria em parte responsável pela resistência de uma cultivar de **V. unguiculata** (TVu 2027) que contém cerca de duas vezes mais inibidores de tripsina do que as variedades suscetíveis (GATEHOUSE, 1979). Verificou-se, no entanto, que uma cultivar do mesmo feijão (CE 524), contendo a mesma quantidade de inibidores que a cultivar resistente, é totalmente suscetível ao ataque do gorgulho.

Experiências feitas com uma preparação rica em inibidores de tripsina e quimiotripsina mostraram que esta não foi capaz de inibir, significativamente, as atividades proteolíticas alcalina e ácida e atividade α -amilásica.

As bases da resistência de uma cultivar de feijão de

corda ao gorgulho provavelmente não se devem à presença de inibidores de tripsina em concentração elevada.

ABSTRACT

During the development of the beetle **Callosobruchus maculatus**, an alkaline and an acid proteolytic activities, as well as an acid phosphatase an alfa-amylase and an anti-chymotryptic activities were detected.

A paralelism between the gain in fresh weight of the insect, the consumption of beans (**Vigna unguiculata**), the alfa-amylase activity, and an alkaline proteolytic activity was observed. This paralelism seems to indicate that, as in other insect species, the digestion in **C. maculatus** is dependent upon an alfa-amylase and an alkaline proteolytic activities.

The acid proteolytic activity seems to be associated to hystolytic processes associated to several phases of the insect development.

It has been suggested that the inhibition of the beetle's alkaline proteolytic activity by the seed's trypsin inhibitors is at least in part responsible for the resistance to the beetle of a cultivar of **V. unguiculata** (TVu 2027), which contains twice the concentration of trypsin inhibitors as the susceptible varieties (GATEHOUSE, 1979). However, in this work, we showed that a **V. unguiculata** cultivar (CE 524), which contains the same concentration of trypsin inhibitors as the cultivar TVu 2027, is susceptible to the beetle's attack.

The alkaline and acid proteolytic activities and the alfa-amylase activity of the beetle's larvae were not inhibited by a preparation rich in trypsin and chymotrypsin inhibitors from **V. unguiculata**.

It is concluded that the resistance of a cultivar of **V. unguiculata** to the beetle **C. maculatus** probably is not due to the presence in the seeds of high concentration of trypsin inhibitors.

ABSTRACT

During the development of the beetle **Callosobruchus maculatus**, an alkaline and an acid proteolytic activities, as well as an acid phosphatase an alfa-amylase and an anti-chymotryptic activities were detected.

A paralelism between the gain in fresh weight of the insect, the consumption of beans (**Vigna unguiculata**), the alfa-amylase activity, and an alkaline proteolytic activity was observed. This paralelism seems to indicate that, as in other insect species, the digestion in **C. maculatus** is dependent upon an alfa-amylase and an alkaline proteolytic activities.

The acid proteolytic activity seems to be associated to hystolytic processes associated to several phases of the insect development.

It has been suggested that the inhibition of the beetle's alkaline proteolytic activity by the seed's trypsin inhibitors is at least in part responsible for the resistance to the beetle of a cultivar of **V. unguiculata** (TVu 2027), which contains twice the concentration of trypsin inhibitors as the susceptible varieties (GATEHOUSE, 1979). However, in this work, we showed that a **V. unguiculata** cultivar (CE 524), which contains the same concentration of trypsin inhibitors as the cultivar TVu 2027, is susceptible to the beetle's attack.

The alkaline and acid proteolytic activities and the alfa-amylase activity of the beetle's larvae were not inhibited by a preparation rich in trypsin and chymotrypsin inhibitors from **V. unguiculata**.

It is concluded that the resistance of a cultivar of **V. unguiculata** to the beetle **C. maculatus** probably is not due to the presence in the seeds of high concentration of trypsin inhibitors.

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil detém a liderança mundial da produção de grãos de feijão (**Phaseolus** e **Vigna**, principalmente) cuja cultura é de grande importância sócio-econômica para o país. (FAO, 1982).

O feijão é uma importante fonte de proteínas (ca. de 24%) e de calorias (52%) e constitui, juntamente com o arroz, o milho e a mandioca, a base da alimentação das populações de baixa renda, fornecendo proteínas de boa qualidade, a um custo mais acessível.

Não obstante a posição de destaque que assume, a cultura de feijão apresenta baixos rendimentos médios. A maneira pouco eficiente com que vem sendo explorada, somam-se as perdas causadas por insetos, que danificam seriamente o produto.

Como pragas de expressão econômica para os feijões citamos os seguintes carunchos: **Callosobruchus maculatus**, **Zabrotes subfaciatus**, **Acanthoscelides obtectus** e **Araecerus fasciculatus** (GALLO, 1970).

O caruncho **Callosobruchus maculatus** ataca, de preferência, os feijões do gênero **Vigna**. É considerado o caruncho mais importante da Região Nordeste, uma vez que 90% da área cultivada com feijão é destinada ao cultivo desse gênero.

No Estado do Ceará, terceiro produtor brasileiro de feijão (IBGE, 1984), o **Callosobruchus maculatus** é responsável por uma redução de até 50% no valor comercial do feijão (SANTOS, 1971). Os insetos apresentam infestação cruzada, isto é, atacam os grãos tanto no campo como nos depósitos. A postura no campo é efetuada nas vagens abertas ou defeituosas (GALLI, 1980). Nos depósitos as perdas brasileiras de feijão são da ordem de 20% (WIENDL, 1969).

O **Callosobruchus maculatus** pertence à ordem dos Coleópteros, que se caracteriza por apresentar desenvolvimento

por holometabolia. As espécies de insetos que se desenvolvem por holometabolia passam por quatro fases características em seus ciclos biológicos, as quais são: ovo, larva, pupa e adulto. Quando a larva completa o seu desenvolvimento ingressa em uma subfase muito característica denominada pré-pupa, a qual corresponde a um período preparatório para transformar-se em pupa. Transcorrido o período pré-pupal, o inseto holometabólico transforma-se em pupa (SANTOS, 1974).

A uma temperatura de 27°C e 70% de umidade relativa para criação de *C. maculatus* o período de incubação dos ovos e eclosão das larvas é de 4,5 dias. Após a eclosão da larva, até atingir a fase adulta, os valores para as durações mínimas dos diversos estádios são os seguintes: 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; estágio de pupa, 5 dias (CARVALHO e MACHADO, 1967).

INIBIDORES DE PROTEINASES

A ocorrência de substâncias de natureza protéica capazes de inibir a atividade de enzimas proteolíticas - os inibidores de proteinases - tem sido observada em microorganismos e em diferentes famílias dos reinos animal e vegetal (RICHARDSON, 1977, VOGEL *et al.*, 1968, RYAN, 1973 e WEBER 1978).

Em microorganismos foi registrada a presença de inibidores de tripsina no meio de cultura de *Clostridium botulinum* e inibidores de outras proteinases têm sido encontrados em muitas espécies de actinomicetos (RICHARDSON, 1977 e WHITAKER, 1981).

No reino animal foi detectada a presença de inibidores de proteinases no suco pancreático, sangue, urina e colostro de mamíferos, em nematódios, na clara do ovo de certos pássaros, nos venenos de certas cobras e de insetos (RYAN, 1979 e VOGEL *et al.*, 1968).

No reino vegetal encontram-se amplamente distribuídos principalmente nas plantas com sementes. Entre as dicotiledôneas o maior número de espécies que contém esses inibidores pertence às leguminosas e às solanáceas; nas monocotiledôneas sua distribuição é mais ampla entre as gramíneas (RICHARDSON, 1977).

Os inibidores de origem vegetal têm atividade contra enzimas proteolíticas de origem animal e microbiana que tenham especificidade semelhante à da tripsina e à da quimiotripsina e, apenas raramente, têm ação contra proteinases vegetais (RYAN, 1973 e RYAN, 1981).

Os inibidores ligam-se às enzimas através de seus centros ativos formando complexos muito estáveis (RYAN, 1973 e RYAN, 1981). Os centros ativos dos inibidores de tripsina contêm sempre uma ligação Arg-X ou Lis-X, enquanto que os de quimiotripsina têm normalmente Leu-X ou Fen-X (LASKOWSKI e SEALOCK, 1971 e RICHARDSON, 1977), sendo isto, aparentemente, reflexo das especificidades das enzimas. Esses inibidores são proteínas que apresentam pouca ou nenhuma quantidade de carboidrato. Possuem peso molecular dentro de uma faixa de 4.000 a 80.000 daltons, geralmente inferior a 50.000, e mais comumente inferior a 20.000 daltons (RYAN, 1973). A maior parte deles contém entre 70 e 90 resíduos de aminoácidos, correspondentes a pesos moleculares de 8.000 a 10.000 e os de peso molecular aparentemente grande são geralmente proteínas poliméricas, normalmente di, tri ou tetraméricas, cujos protômeros têm peso molecular em torno de 10.000 daltons (RICHARDSON, 1977).

A maioria dos inibidores de proteinases tem alta percentagem de cistina, apresentando inúmeras ligações S-S, o que confere a essas substâncias considerável resistência a agentes desnaturantes (calor, uréia, solventes orgânicos ácidos, bases, etc.) sendo esta a propriedade física mais notável dos inibidores; como uma classe de proteínas todos aparentemente contêm prolina e muitos não contêm triptofano e metionina e apresentam baixo conteúdo de tirosina e fenilalanina (LASKOWSKI e SEALOCK, 1971).

Apesar das numerosas investigações realizadas com inibidores de plantas até hoje não se conhece, exatamente, qual o papel, ou papéis, desempenhados por essas substâncias no metabolismo vegetal.

Os recentes progressos obtidos levaram ao estabelecimento de cinco prováveis funções para os inibidores, as quais não são, necessariamente, independentes (RYAN, 1973, RICHARDSON, 1977 e MAYER e SHAIN, 1974).

a) Agentes reguladores da atividade de proteinases endógenas

Algumas evidências sugerem um papel regulador da atividade de proteinases endógenas para os inibidores de origem vegetal. Esta função é pouco aceitável tendo em vista que a atividade inibitória da maioria dos inibidores de proteinases de planta é específica para proteinases digestivas de alguns animais e microorganismos (RYAN, 1979). Contudo, foi demonstrada a presença de inibidores de proteases endógenas em algumas sementes como as de alface, centeio, arroz, cevada, feijão de corda (RICHARDSON, 1977) bem como em tubérculos de batata (RYAN, 1973). Acredita-se que estes inibidores possam manter essas enzimas em um estado inativo nos órgãos quiescentes e que durante o processo germinativo os complexos sejam desfeitos e as enzimas assim liberadas exerçam sua função na mobilização de reservas protéicas enquanto o conteúdo dos inibidores diminui (RICHARDSON, 1977).

b) Proteínas de reserva

Alguns autores sugerem que toda proteína característica da semente e que exista numa proporção superior a 5% da proteína total, seja uma proteína de reserva. Altas concentrações de inibidores foram detectadas em sementes e tubércu

los. Teores de inibidores da ordem de 10% da proteína solúvel da semente são comumente encontrados (RYAN, 1973). Os inibidores, além de serem encontrados nos tecidos de reserva, também estão presentes em outras partes da planta. Em alguns casos, essa presença é transitória, indicando que eles desempenham uma função de reserva, apenas temporária. Em muitas espécies há acúmulo de inibidores na semente durante a maturação e seu desaparecimento se dá durante a germinação (XAVIER FILHO, 1973).

c) Mecanismo de dispersão endozóica de sementes

Sementes ingeridas por pássaros e outros animais que se alimentam de frutos ou plantas inteiras são frequentemente excretadas em condições viáveis (RICHARDSON, 1977). A presença de altas concentrações de inibidores de proteinases e mesmo de inibidores de outras enzimas digestivas, como amilase, aumentaria a probabilidade de as sementes passarem através do sistema digestivo sem serem danificadas pelas enzimas digestivas desses animais.

d) Proteção contra disrupção da estrutura subcelular

Os tecidos de reserva de sementes apresentam corpúsculos que foram comparados aos lisossomos de células animais - os corpos protéicos - sendo os repositórios das enzimas hidrolíticas responsáveis pela mobilização das reservas neles contidas (MATILE, 1968). A liberação de constituintes hidrolíticos dos corpos protéicos, em especial enzimas proteolíticas, causaria danos às proteínas citoplasmáticas. Essas proteínas seriam então protegidas pelos inibidores de proteinases, inclusive os inibidores de tripsina que estão localizados no citoplasma (BAUMGARTNER e CHRISPEELS, 1976).

e) Agentes protetores contra proteínases de insetos e microorganismos

Uma das mais interessantes funções e, talvez, a mais potencialmente útil dos inibidores de proteínases, para as plantas é a proteção contra o ataque de insetos e microorganismos. Inúmeros microorganismos secretam proteínases que facilitam a invasão microbiana em tecidos vegetais, pela hidrólise das proteínas existentes nas paredes celulares. Como muitas das enzimas secretadas por microorganismo são semelhantes à tripsina e à quimiotripsina em suas especificidades, a presença de inibidores de tais proteínases na planta dificultaria a penetração de microorganismos. Muitos são os inibidores de origem vegetal que inibem as enzimas digestivas de trato intestinal de insetos e suas larvas (RICHARDSON, 1977). Deste modo alguns autores sugerem que os inibidores surgiram como um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de insetos. Entre os trabalhos mais recentes abordando este aspecto podemos citar o de (RYAN, 1978), onde ele mostra que o ataque de insetos a folhas de tomateiro induz à liberação de um hormônio (PIIF - "Proteinase inhibitor inducing factor"), o qual é distribuído rapidamente por toda planta, causando a síntese acelerada de inibidores.

O nível de inibidores de proteínases pode também ser um dos fatores responsáveis pela resistência apresentada por algumas variedades de cevada ao ataque de gafanhoto (WEIEL e HAPNER, 1976).

STEFFENS **et al.** (1978), estudando o efeito de inibidores de tripsina sobre o crescimento e metamorfose da larva de *Ostrinia nubilalis* (Corn borer), 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 atrasava sua pupação, entretanto o inibidor de tripsina de milho, conhecido como um fraco inibidor de tripsina, quando adicionado à dieta desta larva não exercia nenhum efeito no seu crescimento e metamorfose.

A resistência do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) ao ataque de *C. maculatus* levou JANZEM et al. a sugerir que tal fato se deve à presença de fitohemaglutinina ou inibidor de tripsina ou compostos secundários nessas sementes. Para descartar a possibilidade de que o não desenvolvimento de *C. maculatus* em feijão preto se deve ao seu conteúdo de inibidor de tripsina eles adicionaram inibidor de tripsina de soja e inibidor de tripsina de clara do ovo nos níveis de 0,1 e 1% a sementes artificiais feitas com farinha de semente de *Vigna unguiculata* (que segundo os autores não contém fitohemaglutinina, tem inibidor de tripsina e é suscetível). Verificaram também que os gorgulhos se desenvolviam normalmente nestas sementes. Entretanto, quando se eleva o nível desses inibidores para 5%, sementes com inibidor de tripsina de soja reduzem a sobrevivência de *C. maculatus* em 21% enquanto sementes contendo inibidor de tripsina da clara do ovo não afetam o seu desenvolvimento.

GATEHOUSE et al. (1979), sugeriram, recentemente, que o fator responsável pela resistência apresentada por um cultivar de *Vigna unguiculata* (TVu 2027) ao *C. maculatus* é o elevado nível de inibidor de tripsina nestas sementes. Estes inibidores teriam um importante papel na resistência por inibirem a atividade proteolítica, semelhante à tripsina detectada na larva do inseto.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ALGUMAS ENZIMAS DE INSETOS

A metamorfose inclui uma série de eventos ontogenéticos através dos quais o inseto se transforma de larva a adulto. Os processos de transformação envolvem principalmente a destruição da maior parte dos tecidos e órgãos larvais e a diferenciação de estruturas. Essas mudanças são refletidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas bem como sobre a atividade de certas enzimas (CHEN, 1966).

O sistema enzimático digestivo dos insetos depende

da natureza de sua dieta (WIGGLESWORTH, 1974).

Proteases digestivas de insetos foram estudadas em extratos brutos ou homogenatos de tecido intestinal. Os substratos normalmente usados são gelatina, caseína e hemoglobina (LAW *et al.*, 1979). O tipo e a atividade das enzimas proteolíticas são estádio - específicas. Este fato não é surpreendente desde que, em muitas espécies de insetos, a larva e o adulto têm condições nutricionais e hábitos alimentares to talmente diferentes (CHEN, 1978).

Enzimas proteolíticas estudadas em muitos insetos são quase sempre classificadas como semelhante à tripsina ou à quimiotripsina (JANY *et al.*, 1978 e KUNZ, 1978). 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 bissellielle** e **Locusta migratoria**. Proteases do tipo quimiotripsina já foram isoladas de **Vespa orientalis**, **Apis mellifera** e **Pieris brassica**. Dos insetos estudados, poucos são os que apresentam forte atividade proteolítica em pH ácido e, dentre eles podemos citar: **Calliphora erythrocephala**, **Locusta migratoria migratoroides**, **Chironomus tentans** e **Antheraceae pernyi** (LAW *et al.*, 1979).

Apesar de carboidrases digestivas terem sido estudadas em muitas espécies de insetos, relativamente pouco se sabe sobre as características bioquímicas individuais dessas enzimas. Duas categorias de carboidrases são comumente reconhecidas α -amilase e β -amilase que hidrolisam ligações glicosídicas de polissacarídeos e glicosidases as quais hidrolisam ligações glicosídicas de oligo e dissacarídeos (CHIPPENDALE, 1978). É grande a importância dessas enzimas no desenvolvimento de insetos em sementes ricas em amido, tal como muitas das sementes de leguminosas que servem como hospedeiras para insetos (PODOLER and APPLEBAUM, 1970a), por exemplo, **Callosobruchus maculatus**.

Recentemente foi isolada e caracterizada uma amilase típica de larva inteira de **Tenedrio molitor** contendo cálcio. Foram também isoladas e caracterizadas glicosidases de adultos de **Locusta migratória** e abelha (CHIPPENDALE, 1978).

PODOLER e APPLEBAUM (1971a e 1971b) caracterizaram, isolaram e purificaram uma α -amilase de **Callosobruchus chinensis**.

No transcurso dos seus ciclos biológicos os insetos sofrem modificações bastante variáveis na sua morfologia. Estas modificações são efetuadas durante as fases de desenvolvimento, crescimento e transformações dos órgãos internos. Entre as variações ocorridas nos órgãos internos incluem-se a histólise (digestão dos tecidos da fase jovem) e histogênese (neo-construção dos tecidos do adulto) (SANTOS, 1974). Vários processos metabólicos especializados são requeridos durante essas modificações. Possivelmente todos esses processos envolvem a ação de enzimas específicas tais como proteases, peptidases e enzimas lisossomiais (LAW et al., 1979).

Existem poucos registros sobre a ocorrência de enzimas proteolíticas no desenvolvimento de ovos de insetos (CHEN, 1966). SHULOV et al. (1975) observaram a presença de pelo menos dois tipos de endopeptidases no desenvolvimento de **Locusta migratoria migratoroides**. Uma endopeptidase semelhante à catepsina, que hidrolisa caseína a pH 5,6, aparece em torno do 5º dia após o começo do desenvolvimento e aumenta sua atividade em períodos posteriores. Uma enzima semelhante à tripsina, que ataca a caseína a pH 7,8, torna-se detectável somente no 8º dia de desenvolvimento, atingindo um pico na hora da eclosão. Uma terceira enzima que age sobre o tripeptídeo leucilglicilglicina tem sido observada em idade embrionária de 4-5 dias, mas sua atividade permanece baixa durante o desenvolvimento. Em **Bombix** e **Schistocerea**, uma atividade proteolítica a pH 8,0 foi registrada somente no final da embriogênese (CHEN, 1966).

Fosfatases são enzimas de larga ocorrência em tecidos animais. Sua importância em tecidos embrionários tem sido repetidamente apontada (CHEN, 1966). Determinações quantitativas de fosfatase alcalina no desenvolvimento do ovo de **Schaerodema molestum** foi feita por INDIRA (1963). A atividade enzimática é muito baixa no começo do desenvolvimento. Com exceção de um breve retardamento entre 48 e 72 horas, ela au

menta rapidamente até 96 horas de idade e, depois disso, permanece constante. O primeiro aumento corresponde ao período de gastrulação e alongação de células e o segundo ocorre no período de intensa atividade histolítica.

Em outros insetos a ocorrência de fosfatase alcalina pode ser detectada somente em estádios embriológicos tardios.

Em *Drosophila* YAO (1950) registrou a presença de fosfatase ácida em todos os estádios, mas nenhuma variação aparente foi mostrada durante a embriogênese.

CHINO (1961) realizou análises bioquímicas de fosfatases em ovos em diapausa e não diapausa de *Bombyx mori*. A ocorrência da fosfatase ácida, que quebra glícerol fosfato e sorbitol 6 fosfato, pode ser detectada em todos os estádios embrionários. Por outro lado, a fosfatase alcalina tornou-se detectável somente um dia e meio antes da eclosão. Isto faz acreditar que o aparecimento tardio dessa enzima tem uma correlação com o início da atividade do trato digestivo. Estudos sobre as atividades da fosfatase ácida e alcalina no desenvolvimento embrionário de vários insetos têm fornecido evidências para diferentes papéis metabólicos desses dois tipos de enzima.

A sugestão de que a resistência de um cultivar de *Vigna unguiculata* (TVu 2027) seria devida à concentração elevada de inibidores de tripsina nessas sementes e que esses inibidores teriam importante papel na resistência, por inibirem a atividade proteolítica do tipo tripsina detectada na larva de *Callosobruchus maculatus* nortearam o desenvolvimento da presente investigação. O objetivo do trabalho se prende a investigar a interação entre os inibidores de enzimas proteolíticas de *Vigna unguiculata* e o processo digestivo de *Callosobruchus maculatus* na tentativa de correlacionar a resistência de uma cultivar de *Vigna unguiculata*, ao ataque do gorgulho com a presença de inibidores de proteases da semente.

2 - MATERIAIS

2.1 - Insetos

Os animais 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.

Este bruquídeo é conhecido pelo nome vulgar de caruncho, gorgulho ou carneiro do feijão.

As larvas, pré-pupa, pupas e adultos de **C. maculatus** usadas no presente trabalho foram obtidas após oviposição sobre sementes de **Vigna unguiculata**.

2.2 - Cultivares de Feijão

Foram utilizadas sementes de duas cultivares (CE 31 ou pitiúba e CE 524) de **Vigna unguiculata** (L.) Walp, 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 e Feijão da EMBRAPA, Goiânia, GO. Estas sementes foram obtidas a partir de sementes fornecidas pelo International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigéria.

2.3 - Reagentes

Albumina sérica bovina Fração V 96-99% (lot. 126 c-0199) de Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

Quimiotripsina bovina - preparação cristalina adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Tripsina bovina - preparação cristalina adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Caseína - preparada segundo Hammresten, E. Merk AG, Parmstadt, Alemanha.

Amido solúvel (Art. 1252) - preparação adquirida da E. Merk, AG. Parmstadt, Alemanha.

Para-Nitrofenil fosfato, sal dissódico (hexahidratado), preparação adquirida da E. Merk, AG., Parmstadt, Alemanha.

Os demais reagentes empregados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Criação de Insetos

Indivíduos adultos de *Callosobruchus maculatus* foram mantidos sobre sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiúba, acondicionados em frascos de vidro transparentes, de boca larga, fechados com tela de aço. Os frascos foram mantidos em câmara ambiental de marca Precision Scientific, modelo 805 com temperatura e umidade controladas e fotoperíodo de 12 horas. As temperaturas foram medidas com termômetro de mercúrio, a umidade relativa com higrômetro da marca Sundo. As culturas permaneceram a $29 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $76 \pm 4\%$ de umidade. A cada geração fez-se a infestação de novas sementes.

3.2 - Determinação de Peso Fresco

O peso fresco dos insetos foi determinado utilizando-se amostras de 10 espécimes de *C. maculatus* com idades compreendidas entre 10 e 24 dias, em intervalo de 2 dias.

3.3 - Determinação da Quantidade de Massa de Feijão Ingerida

A quantidade de massa de feijão ingerida pelos insetos em desenvolvimento foi inicialmente determinada pesando-se 10 sementes de feijão com casca. Essas sementes foram acondicionadas em frascos iguais aos descritos no item 3.1. Quatro fêmeas fecundadas (48 horas de vida adulta) (SANTOS, 1971) de *C. maculatus* foram utilizadas para infestar essas

sementes. Após 24 horas de permanência nos frascos as fêmeas foram retiradas, fazendo-se a remoção do excesso de ovos, deixando-se apenas 2 ovos por semente. Num período compreendido entre 10 e 24 dias, com intervalos de 2 dias, os espécimes foram retirados por seccionamento cuidadoso dos cotilédones até que os mesmos fossem liberados. Os espécimes assim obtidos foram contados e os cotilédones com todo seu tegumento, colocados em placas de Petri, permaneciam em dessecador por 24 horas quando então fazia-se a pesagem desse material. Foi usado um mesmo recipiente para fazer todas as pesagens e o feijão utilizado no experimento permaneceu também em dessecador. A massa de feijão ingerida foi determinada dividindo-se a diferença de peso do feijão antes e depois de infestado pelo número de insetos obtidos e expressa em miligrama de feijão ingerida por 10 espécimes.

3.4 - Obtenção de Larvas, Pré-pupas, Pupas e Adultos de C. maculatus para Preparação de Extratos

Larvas, pré-pupas e pupas (10 a 14, 15 a 16, 18 a 22 dias respectivamente após oviposição) foram obtidos por retirada do tegumento e posterior seccionamento cuidadoso dos cotilédones até que as mesmas fossem liberadas.

Insetos adultos (24 dias da oviposição) utilizados na preparação dos extratos tinham até 24 horas de emergência da semente. O material assim obtido era lavado com água destilada e rapidamente enxugado com papel de filtro. Em seguida preparava-se os extratos a serem utilizados para determinação das diversas atividades.

3.5 - Preparação de Azo-caseína

A preparação de azo-caseína foi feita segundo o método desenvolvido por GOAD (1963) com algumas modificações feitas por MAIA (1982).

3.6 - Preparação das Soluções Utilizadas como Substrato

Os substratos caseína e azo-caseína foram preparados de acordo com os métodos estabelecidos por KUNITZ (1947) e GOAD (1963) respectivamente.

Caseína 1%

As soluções de caseína 1% foram preparadas, suspendendo-se 1g de caseína em 100,0 ml de tampão fosfato 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 100,0 ml. A solução era mantida em congelador (-19°C) (KUNITZ, 1947).

Azo-caseína 1% pH 5,0

Um grama de azo-caseína é suspenso em 100,0 ml de tampão Universal pH 5,0 (LONG, 1961). 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 100,0 ml. A solução é mantida em congelador.

Azo-caseína 1,5% pH 8,0

Dissolve-se 1,5g de azo-caseína em 100,0 ml de tampão Universal pH 8,0 (LONG, 1961). Aquece-se e deixa-se em ebulição por 15 minutos. Deixa-se esfriar e ajusta-se o pH para 8,0. Completa-se o volume para 100,0 ml com água destilada. Esta solução é mantida em congelador.

Amido 1%

Na preparação da solução de amido a 1% dissolve-se 1g de amido em 100,0 ml de tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,4 c/ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mM. Aquece-se até ebulição por aproximadamente 1 minuto, deixa-se em repouso à temperatura ambiente, durante 24 horas e, em seguida centrifuga-se a 2.500xg por 10 minutos sendo o sobrenadante utilizado como substrato (PODOLER e APPLEBAUM, 1970).

Para-nitrofenil fosfato 4 mM (NPP)

As soluções de paranitrofenil fosfato (NPP) 4mM foram preparadas dissolvendo-se 148,46 mg de NPP em 100,0 ml de tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. A solução é mantida em congelador (-19°C) (TERRA et al., 1979)

3.7 - Determinação de proteínas

A concentração de proteína nos diversos extratos foi determinada pelo método do microbiureto (GOA, 1953), ligeiramente modificado, usando-se albumina sérica bovina como pa-

drão. A volumes crescentes da preparação a ser analisada, adicionou-se NaOH 4% até um volume final de 1,0 ml, em seguida a essa solução adicionou-se 3,0 ml de NaOH 4% e 0,2 ml do reagente do microbiureto. Após 15 minutos a densidade ótica determinada a 330 nm em um espectrofotômetro Beckman modelo DU. Foram feitas provas em branco para todos os tubos nos quais o reagente do microbiureto não foi adicionado. A leitura da densidade ótica dessas provas em branco era subtraída da densidade ótica da solução contendo o extrato e à qual o reagente do microbiureto havia sido adicionado. Essa modificação permite eliminar a interferência de substâncias que absorvem em 300 nm quando tratadas por álcali.

3.8 - Determinação de Atividades Enzimáticas e Inibidores

Na determinação das atividades proteásicas alcalina e ácida utilizou-se soluções de azocaseína. Na determinação da atividade amilásica foram utilizadas soluções de amido e para a atividade fosfatásica ácida utilizou-se soluções de para-nitrofenil fosfato. A atividade inibitória contra tripsina e quimiotripsina foi avaliada utilizando-se soluções de caseína.

3.8.1 - Atividade Azo-caseinásica Alcalina

As condições de ensaio da atividade azo-caseinásica alcalina foram estabelecidas em extratos de pré-pupas. Os extratos de pré-pupas foram obtidos usando-se como meio de extração glicerina 10% sendo os animais triturados em almofariz com esta solução. O homogenado, preparado na proporção de 10 espécimes/ml, após 30 minutos de contato, sob agitação, em câmara fria, foi centrifugado durante 30 minutos, 2500xg, a temperatura ambiente. O precipitado foi descartado

e o sobrenadante, depois de filtrado em papel qualitativo, foi utilizado para determinação das condições de ensaio dessa atividade. Para estudo do comportamento da atividade azocaseinásica alcalina nas outras fases de desenvolvimento de *C. maculatus* estudadas, os extratos foram obtidos de maneira idêntica à descrita acima.

3.8.1.1 - Concentração do Substrato e dos Extratos

Os ensaios de atividade foram feitos incubando-se por 30 minutos a 37°C, 1,0 ml de substrato (azo-caseína 1,5% a pH 8,0), 1,0 ml de tampão Universal pH 8,0 e 1,0 ml de extrato de pré-pupa. A reação foi parada com 1,0 ml de TCA 20%. Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel de filtro qualitativo e 1,0 ml do filtrado foi alcalinizado com 1,0 ml de NaOH 2 N. A atividade enzimática foi medida pela absorbância em 440 nm dos peptídeos diazotizados (GOAD, 1963) em espectrofotômetro Spekol.

Na determinação da concentração ótima de substrato, o meio de reação encerrava 0,5 ml de extrato de pré-pupa, 0,5 ml de glicerina a 10% e 2,0 ml de substrato a 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0%.

A concentração ótima de extrato foi determinada usando-se 1,0 ml de substrato a 1,5%, 0,2 a 1,0 ml de extrato e 0,8 a 0,2 ml da solução de extração e 1,0 ml de tampão Universal pH 8,0.

Com a finalidade de corrigir a atividade autodigestiva do extrato, foram normalmente usados controles onde o extrato e o substrato foram incubados separadamente e o substrato adicionado ao extrato após adição de TCA 20%.

3.8.1.2 - Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade azo-caseinásica alcalina foi estabelecido, utilizando-se o substrato a 1,5% preparado com tampão Universal (LONG, 1961) nos intervalos de pH que variaram de 6,0 a 10,0. Os ensaios foram feitos incubando-se 1,0 ml do substrato a 1,5%, 1,0 ml de extrato (10 espécimes/ml) e 1,0 ml de tampão Universal nos diversos valores de pH, por 30 minutos a 37°C, sendo a reação parada com 1,0 ml TCA 20%.

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 2 N. A hidrólise enzimática foi medida pela absorbância em 440 nm dos produtos colorados formados. Foram feitas provas em branco sendo que nestes casos, a adição de TCA precedeu à de azo-caseína.

3.8.1.3 - Efeito do Tempo de Reação

O tempo de reação foi estabelecido, fazendo-se ensaios de atividade enzimática na temperatura de 37°C (temperatura ótima para tripsina), nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os ensaios foram feitos incubando-se 1,0 ml de substrato a 1,5%, pH 8,0, com 1,0 ml de extrato e 1,0 ml de tampão Universal, pH 8,0. Foram mantidas as demais condições descritas na secção 3.8.1.1

3.8.1.4 - Unidade de Atividade

Para os cálculos de atividade azo-caseinásica alcalina foi definida a seguinte unidade: 1 unidade de atividade é a quantidade de enzima que produz uma absorbância a

440 nm de 0,100 U.D.O. por 1,0 ml de extrato, por 30 minutos de reação 37°C e pH 8,0.

3.8.2 - Atividade azo-caseinásica ácida

Na determinação da atividade azo-caseinásica ácida o extrato foi obtido de maneira semelhante à descrita no item 3.8.1 sendo que, a concentração do extrato foi de 4 espécimes/ml. Para o estudo dessa atividade foram usadas as condições estabelecidas por COELHO (1980), exceto no uso do tampão que foi acetato 0,3 M, pH 5,0. Para os cálculos de unidade de atividade azo-caseinásica ácida utilizou-se a definição dada por COELHO (1980).

3.8.3 - Atividade amilásica

Para a determinação da atividade amilásica o extrato foi preparado segundo PODOLER e APPLEBAUM (1970) com algumas modificações. Para cada determinação, espécimes de *C. maculatus* foram homogeneizados em gral com tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,4 contendo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mM e feito 40% (V/V) com etanol, na proporção de 20 espécimes/ml. O homogenato foi centrifugado a 20.800xg por 20 minutos a 4°C sendo o precipitado desprezado. A atividade amilásica foi determinada no sobrenadante diluído 100% com a solução extratora. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 1,0 ml do substrato a 1,0 ml do extrato, a temperatura de incubação foi de 37°C e o tempo de reação de 10 minutos. A reação foi parada pela adição de 1,0 ml do reagente de iodo acidificado. Para cada reação preparou-se uma prova em branco do ensaio, constituída de substrato e reagente de iodo acidificado. Este reagente é preparado a partir de uma solução estoque de iodo, preparada dissolvendo-se 6,0g de iodeto de potássio e 600mg

de iodo, em água destilada e completando-se o volume para 100,0 ml com água destilada. A solução reagente de iodo acidificado é preparada momentos antes da reação enzimática tomando-se 1,0 ml de solução estoque de iodo e levando-se o volume para 100,0 ml com HCl 0,05 N. Após a parada da reação todos os tubos tiveram seus volumes completados para 7,0 ml com água destilada. Determinou-se a atividade amilásica medindo-se a absorbância em 620 nm em um espectrofotômetro Spekol, contra uma prova em branco constituída de 1,0 ml do reagente de iodo acidificado e 6,0 ml de água destilada. Dos valores de absorbância da prova em branco subtraíram-se os valores obtidos para as amostras. Estas diferenças de absorbância foram transformadas em unidades de atividade (UA) sendo uma UA correspondente a uma diferença de absorbância de 0,001 a 620 nm. Os valores em UA foram multiplicados pelo fator de diluição e pelos volumes dos extratos, sendo este produto dividido pelo número de espécimes utilizados na preparação dos extratos. A atividade amilásica total foi expressa em UA por 10 espécimes.

3.8.4 - Atividade fosfatásica ácida

O extrato utilizado para determinação da atividade fosfatásica ácida foi preparado segundo TERRA *et al.* (1979), com algumas modificações. Para cada determinação foram homogeneizadas em almofariz espécimes de *C. maculatus* com água bidestilada na proporção 10:1 (espécimes/meio da extração) durante meia hora. O homogenato foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, sendo o precipitado desprezado. Determinou-se a atividade desta enzima pela capacidade de promover a hidrólise do para-nitrofenilfosfato. A reação enzimática foi feita utilizando-se o método descrito por TERRA *et al.* (1979), a um volume de 0,2 ml de extrato (10 espécimes/ml em água bidestilada) adicionou-se 0,2 ml de tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. A solução assim obtida foi incubada com 0,2ml de uma

solução de para-nitrofenilfosfato 4 mM, pH 5,0. Após 30 minutos de incubação a reação foi parada pela adição de 3,0 ml de uma solução contendo bicarbonato de sódio 0,25 M, carbonato de sódio 0,25 M e SDS a 1%, procedendo-se imediatamente a leitura da densidade ótica a 420 nm, em um espectrofotômetro Spekol. Foram feitas provas em branco sendo que nestes casos a adição de substrato foi feita após a parada da reação.

Para os cálculos da atividade fosfatásica ácida definiu-se uma unidade de atividade (UA) como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de substrato por minuto a 420 nm, pH 5,0 e temperatura de 37°C. A atividade fosfatásica ácida foi expressa em UA por minuto por 10 espécimes de *C. maculatus*.

3.8.5 - Atividades inibitórias

A extração de inibidores de enzimas proteolíticas presentes em espécimes de *C. maculatus* foi feita inicialmente a partir de pupas homogeneizadas em almofariz. Glicerina 10% foi utilizada como extraente na proporção final de 10 pupas/ml. A extração foi feita em câmara fria por 30 minutos, sob agitação, após o que o material foi centrifugado a 2.500xg, por 30 minutos, sendo o precipitado descartado. O sobrenadante foi tratado com TCA 5% na proporção de 1:1 (V/V), à temperatura ambiente por meia hora. Após esse tempo de contato centrifugou-se o material a 2.500xg por 30 minutos desprezando-se o resíduo e o sobrenadante, depois de ter sido neutralizado com NaOH 1 N, foi utilizado para determinação de inibidores.

As atividades inibitórias em pupas foram avaliadas pelo método caseinolítico de KUNITZ (1947) comparando-se amostras contendo quantidades crescentes de inibidores em presença de uma quantidade fixa de enzima, com amostras contendo somente tripsina ou quimiotripsina. Foram feitas provas em

branco para as enzimas e as concentrações extremas de inibidores. Correções para concentrações intermediárias das provas em branco de inibidores foram obtidas por interpolação. As atividades foram expressas em unidades de inibidor (UI) definidas por XAVIER FILHO (1974). Devido ao fato da atividade anti-tríptica ter sido fraca e de COELHO (1980) ter detectado atividade anti-quimiotríptica em pupa de *C. maculatus* escolheu-se para estudo a atividade anti-quimiotríptica, a qual foi feita durante o desenvolvimento do inseto.

3.9 - Ação da (IB) sobre algumas Atividades Enzimáticas de *C. maculatus*

3.9.1 - Ação do IB sobre azo-caseinase ácida

O efeito do inibidor bruto de sementes de *V. unguiculata* cultivar seridó, preparado de acordo com o método estabelecido por VENTURA e XAVIER FILHO (1966), sobre a atividade azo-caseinásica ácida presente em extratos de pupas foi estudado medindo-se a atividade residual da enzima após incubação de extratos de pupas com IB nas condições de ensaio usadas para azo-caseinase ácida. Alíquotas de 1,0 ml de uma solução de Inibidor Bruto, contendo de 0,001 a 1,0mg/ml em água destilada, foram postas em tubos de ensaio contendo 1,0 ml de extrato de pupa e 1,0 ml de tampão acetato 0,3 M pH 5,0 e deixados em contato por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo a mistura contida nos tubos foi posta em banho a 50°C à qual foi adicionado 4,0 ml de azo-caseína 1%. A reação foi preparada depois de 30 minutos com 1,0 ml de TCA 20% (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 contra azo-caseinase ácida foi avaliada por diferença entre a leitura dos tubos contendo somente a enzima e

a leitura dos tubos contendo enzima mais IB. Foram feitas provas em branco para a enzima e para as concentrações de inibidor bruto usadas.

3.9.2 - Ação de IB sobre azo-caseinase alcalina de *C. maculatus*

A ação do inibidor bruto sobre a atividade azo-caseinásica alcalina de pré-pupa foi investigada de modo semelhante ao descrito no item anterior. As condições estabelecidas para a determinação de azo-caseinase alcalina foram utilizadas neste caso.

3.9.3 - Ação de IB sobre Amilase de *C. maculatus*

A ação do inibidor bruto sobre a atividade amilásica presente em extrato de pré-pupa foi estudada medindo-se a atividade residual da amilase após incubação de extrato de pré-pupas com IB nas condições de ensaio estabelecidas para hidrólise de amido. Tubos de ensaio contendo 1,0 ml de extrato de pré-pupa e 1,0 ml de tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,4 contendo $\text{Ce}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mM foram levados a um banho de 37°C juntamente com uma solução estoque de 1,0mg/ml de IB. Após 10 minutos de equilíbrio térmico adicionou-se 1,0 ml de IB nesses tubos de ensaio e após os tempos de 0,5, 15, 30 e 60 minutos em contato com a solução de IB adicionou-se 1,0ml da solução de amido a 1%. O tempo de reação foi de 10 minutos quando então a reação foi parada pela adição de 1,0 ml do reagente de iodo acidificado. Provas em branco foram feitas para todos os tubos além de uma prova em branco do ensaio constituída de substrato e reagente de iodo acidificado. A atividade residual da amilase de pré-pupa foi determinada medindo-se a diferença de absorbância em 620 nm.

3.10 - Resistência de Sementes ao C. maculatus

Dez sementes de um cultivar de **Vigna unguiculata** com alto teor de inibidores de tripsina e suscetível ao gorgulho (CE 524) e dez sementes de um cultivar resistente (TVu 2027) foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, com 6,5cm de altura e 5,0cm de diâmetro. Cinco fêmeas fecundadas (48 horas de vidas adulta) foram introduzidas no frasco e este fechado com tampa contendo um orifício central de 3,0cm de diâmetro com tela de aço. Após 24 horas de permanência no frasco as fêmeas foram retiradas. A emergência de insetos foi verificada diariamente após um período de 24 dias. O frasco durante o período do experimento, permaneceu em câmara ambiental para criação dos insetos. (item 3.1)

4 - RESULTADOS

4.1 - Determinação de peso fresco

Na FIGURA 1 estão representados os resultados obtidos nas determinações de peso fresco das diversas fases de desenvolvimento do gorgulho estudadas. Observa-se que o peso aumenta até o 18º dia, início da fase de pupa, começando a diminuir a partir do 20º dia até atingir o ímago.

4.2 - Quantidade de massa ingerida

A quantidade de massa de feijão ingerida pelo gorgulho ao longo de seu desenvolvimento está representada na FIGURA 2. Verifica-se um grande consumo de massa de feijão no período compreendido entre o 4º instar larval e o estágio de pré-pupa, apresentando um máximo a 16 dias. A partir de então o animal deixa de ingerir massa de feijão até atingir a fase adulta.

4.3 - Determinação de proteínas em *C. maculatus*

A FIGURA 3 sugere que, nas condições dos experimentos, há acúmulo de proteínas nas primeiras fases de desenvolvimento de *C. maculatus* ou seja entre as fases de larva e pré-pupa. Após uma rápida mobilização ocorrida entre o 16º e 18º dia observa-se um pequeno acúmulo no início do estágio da fase de pupa. A partir de então parece haver mobilização ou insolubilização de proteínas até atingir a fase adulta.

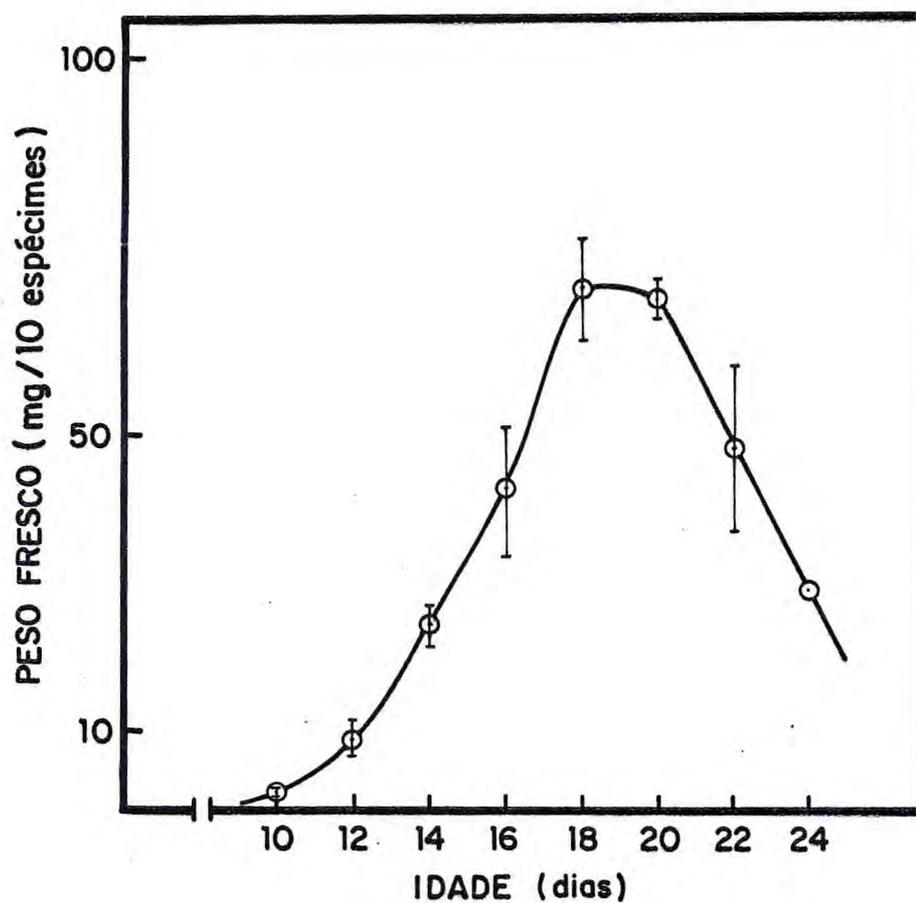


FIGURA 1 - Peso fresco durante o desenvolvimento. Os valores grafados representam a média de um mínimo de 4 a um máximo de 8 determinações cujo coeficiente de variação se encontra na faixa compreendida entre os valores de 3,49 a 22,94.

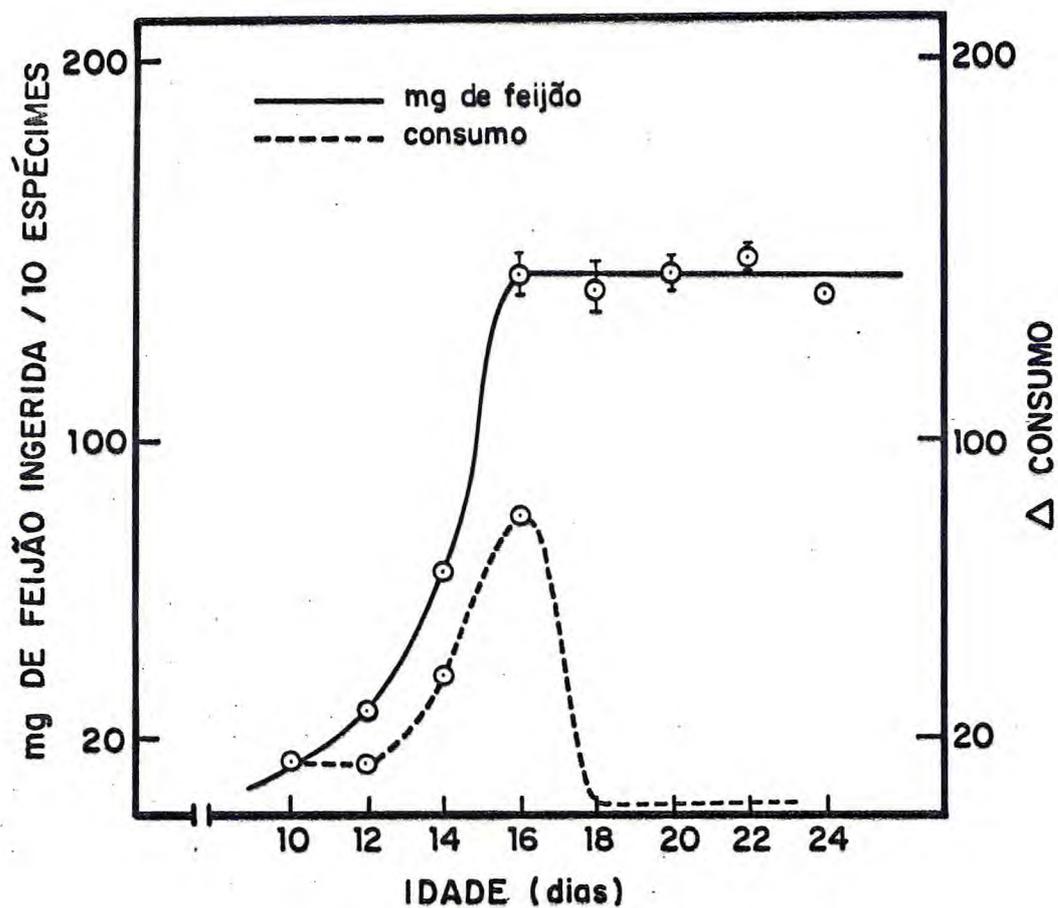


FIGURA 2 - Massa de feijão ingerida pelo *C. maculatus* durante o seu desenvolvimento. Os valores grafados representam a média de um mínimo de 3 e um máximo de 5 determinações com coeficientes de variação compreendidos entre os valores 1,53 e 9,35.

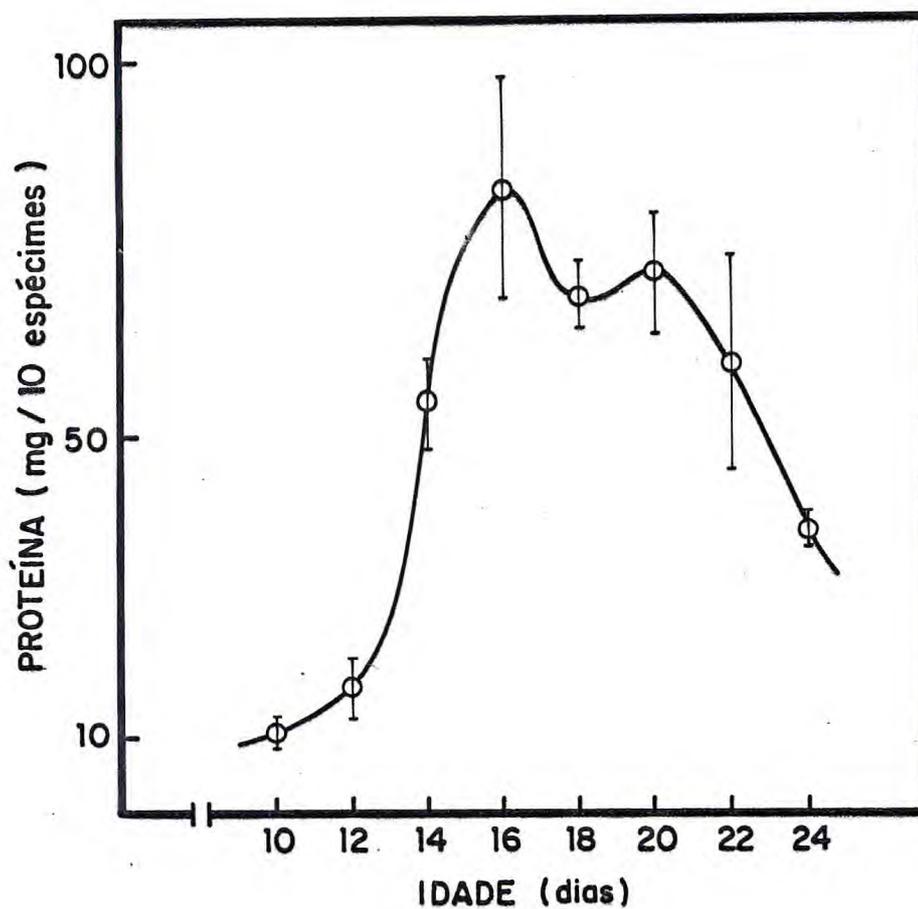


FIGURA 3 - Massa de proteínas presente em *C. maculatus* durante o seu desenvolvimento. Os pontos grafados representam a média de um mínimo de 3 e um máximo de 5 determinações. Os valores para os coeficientes de variação estão entre 5,14 e 20,69.

4.4 - Atividade azo-caseinásica alcalina

4.4.1 - Condições de ensaio

As condições ótimas de ensaio para a atividade azo-caseinásica alcalina, foram estabelecidas usando-se como fonte de enzima extratos de pré-pupa. A escolha dessa fase de desenvolvimento do *C. maculatus* deve-se ao fato de que, em ensaios preliminares, as atividades embora presentes em fases anteriores e posteriores a escolhida se mostram em quantidades inferiores àquelas de pré-pupa.

Verificou-se que para extratos de pré-pupas com 10 espécimes/ml, a concentração de 1,5% para azocaseína (FIGURA 4) é suficiente para saturar a enzima.

Quando a concentração do substrato foi mantida em 1,8% e se fez variar o volume do extrato (0,2 ml a 1,0 ml), observou-se que a atividade azocaseinásica alcalina aumentou linearmente em função de quantidades crescentes de enzima (FIGURA 5).

O efeito do pH na velocidade da reação foi determinado no intervalo de 6,0 a 10,0 mantendo-se a concentração de 1,5% de substrato e usando-se 1,0 ml do extrato. Os dados obtidos (FIGURA 6) não exibem um máximo característico na região alcalina.

Foram feitas determinações variando-se o tempo de incubação verificando-se então que após 30 minutos de ensaio a atividade deixa de ser linearmente dependente do tempo (FIGURA 7).

A temperatura usada nos ensaios foi de 37°C temperatura ótima para a ação de tripsina.

Feita a análise dos dados acima foram estabelecidas as seguintes condições para o ensaio da atividade azocaseinásica alcalina: 1,0 ml de extrato preparado com solução de glicerina 10% na proporção 10 pupas/ml, 1,0 ml de tampão Universal pH 8,0, 1,0 ml de substrato na concentração de

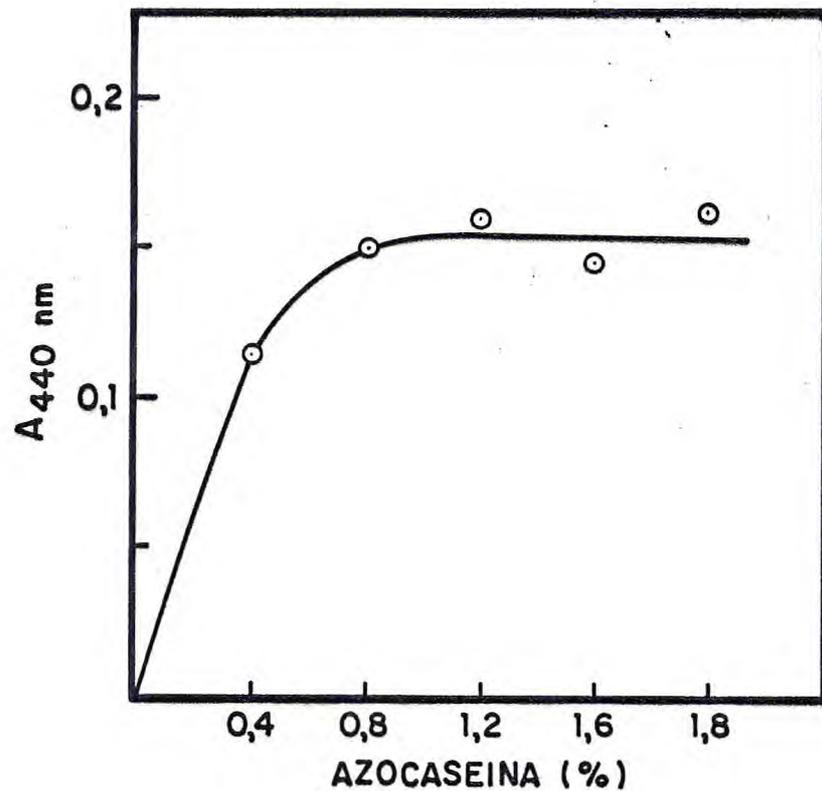


FIGURA 4 - Efeito da concentração de azocaseína sobre a atividade azocaseinásica alcalina presente em extratos de pré-pupa de *C. maculatus*.

Condições de ensaio: 2,0 ml de azocaseína 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0% em tampão universal pH 8,0; 0,5 ml de extrato de pré-pupa (10 pré-pupas/ml) 0,5 ml de glicerina 10%; temperatura 37°C; tempo de incubação 30 minutos; reação parada com 1,0 ml de TCA 20%.

A atividade foi medida pela absorbância a 440 nm, após adição de 1,0 ml de NaOH 2N a 1,0 ml do filtrado de reação.

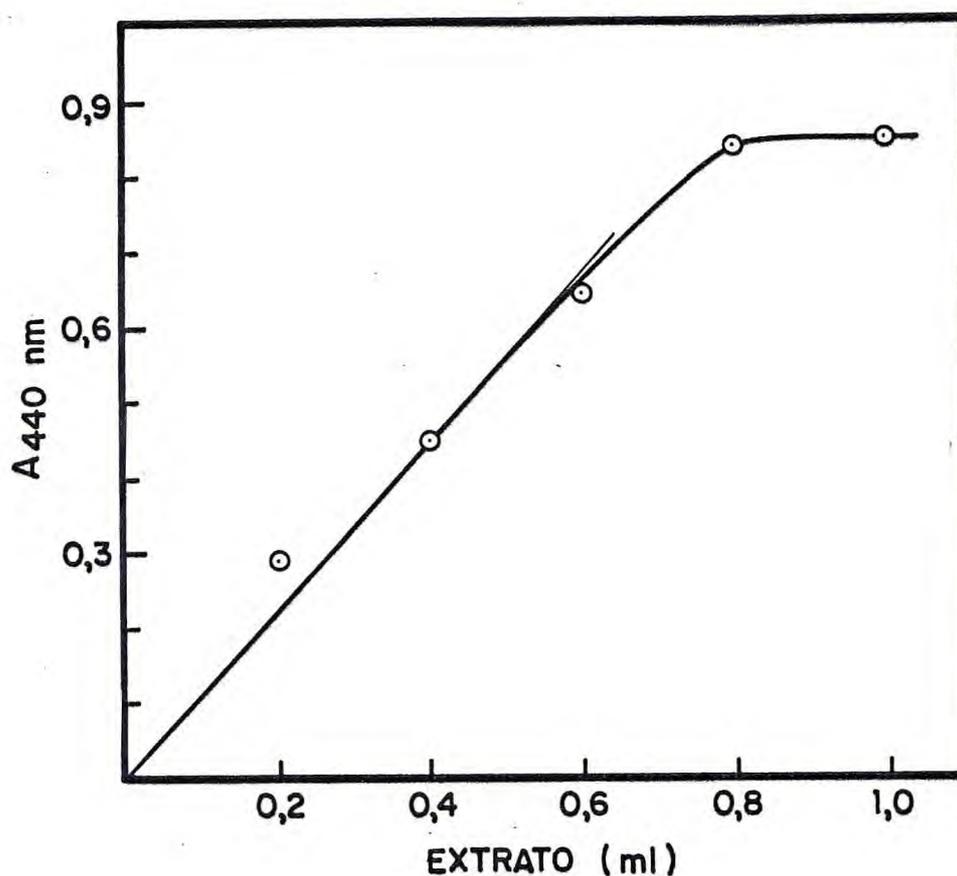


FIGURA 5 - Efeito da concentração de azocaseinase alcalina presente em extrato de pré-pupa de *C. maculatus* sobre a velocidade de reação. Condições de ensaio: tempo de reação, 30 minutos; temperatura, 37°C 1,0 ml de azocaseína 1,5%, pH 8,0 em tampão Universal, concentrações crescentes de extrato para um volume de reação de 3,0 ml; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 4.

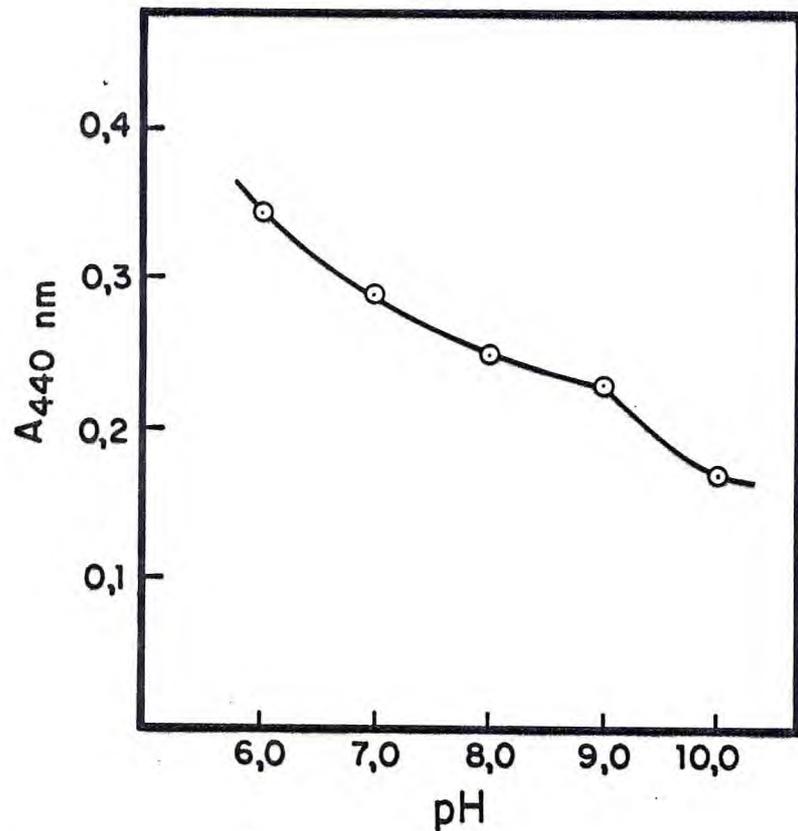


FIGURA 6 - Efeito do pH sobre a atividade azocaseinásica presente em extrato de pré-pupa de *C. maculatus*. Condições de ensaio: tempo de reação, 30 minutos; temperatura 37°C; 1,0 ml de tampão Universal e 1,0 ml de substrato 1,5%; pH variando nos valores indicados; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 4.

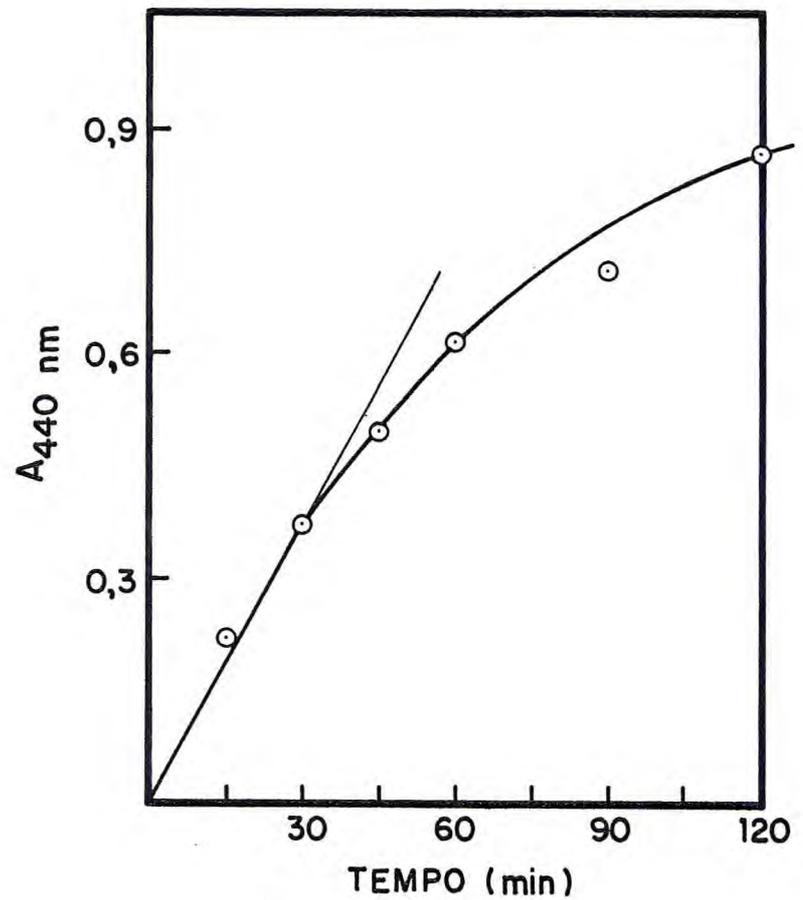


FIGURA 7 - Efeito de tempo sobre a atividade azocaseinásica alcalina presente em extratos de pré-pupa de *C. maculatus*.
Condições de ensaio: temperatura 37°C; 1,0 ml do extrato; 1,0 ml de tampão Universal pH 8,0; 1,0 ml de azocaseína 1,5%; tempo variando conforme indicado manteve-se as demais condições na FIGURA 4.

1,5% preparado em tampão Universal pH 8,0; tempo de reação de 30 minutos; temperatura 37°C; reação parada com 1,0 ml de TCA 20% perfazendo um volume total de 4,0 ml. O valor de pH 8,0 foi escolhido por analogia com o ótimo de 7,6 para ação de tripsina sobre caseína, e um pouco mais distante do pH ótimo da azocaseinase ácida, estabelecido por COELHO (1980). Isso nos dá uma maior margem de segurança para o estudo da azocaseinase alcalina que, provavelmente de maneira semelhante à tripsina, é uma enzima digestiva.

4.4.2 - Comportamento durante o desenvolvimento

Uma vez estabelecidas as condições de ensaio com pré-pupas de *C. maculatos*, foi feita a determinação do perfil de atividade azocaseinásica alcalina ao longo do desenvolvimento do inseto.

Verificou-se que a atividade azocaseinásica alcalina é evidente nas fases de larva atingindo um máximo de atividade em torno da fase de pré-pupa. A FIGURA 8 nos mostra que essa enzima é de rápida atuação e que provavelmente está envolvida em processos digestivos visto que, é também na fase de pré-pupa que o consumo de massa de feijão é máximo (FIGURA 2).

4.5 - Atividade azocaseinásica ácida

A atividade azocaseinásica ácida de *C. maculatus* é mostrada na FIGURA 9. Observa-se a presença dessa enzima em todas as fases de desenvolvimento do gorgulho estudadas, sendo que a atividade máxima ocorre na fase de pupa. O perfil de atividade dessa enzima sugere que a azocaseinase ácida é uma enzima que provavelmente está envolvida em processos de histólise.

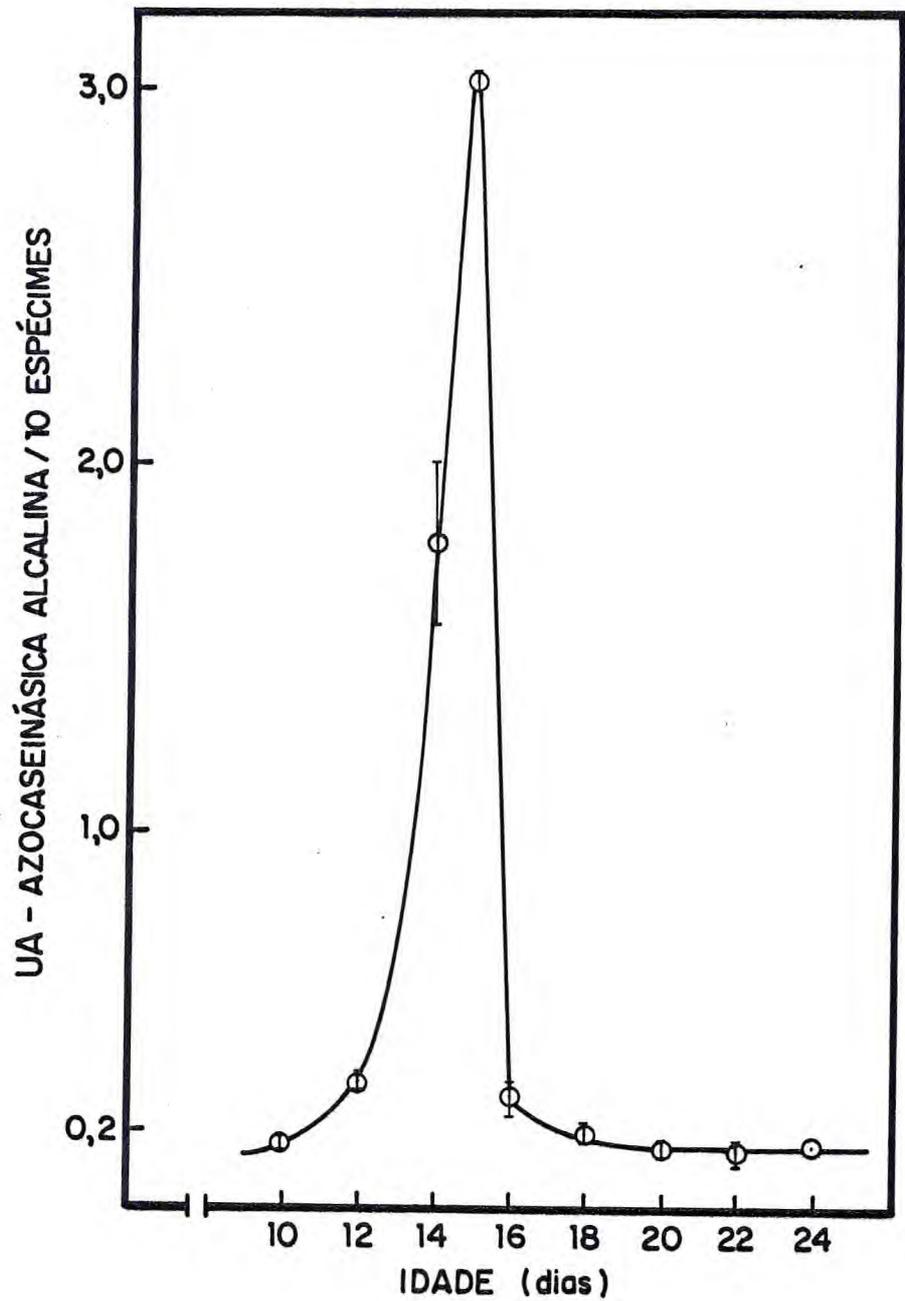


FIGURA 8 - Atividade azocaseinásica alcalina de *C. maculatus* durante o seu desenvolvimento. Os pontos grafados representam as médias de um mínimo de 3 e um máximo de 5 determinações. O coeficiente de variação das médias ficou entre os valores de 2,85 e 17,85.

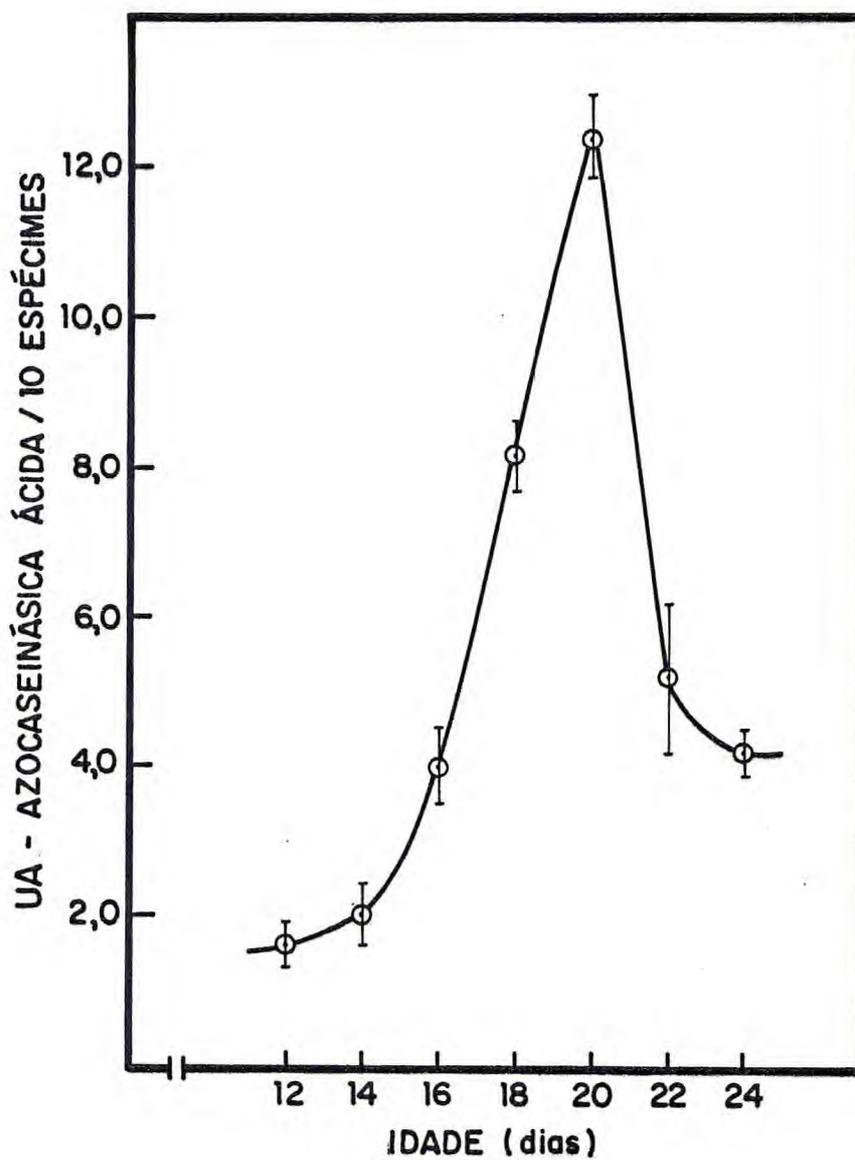


FIGURA 9 - Atividade azocaseinásica ácida de *C. maculatus* ao longo de seu desenvolvimento. Cada ponto do gráfico representam as médias de um mínimo de 3 a um máximo de 6 determinações e cujos coeficientes de variação estão entre os valores de 4,27 e 20,66.

4.6 - Atividade Amilásica

Os resultados obtidos para o estudo da atividade amilásica de **C. maculatus** ao longo de seu desenvolvimento estão representados na FIGURA 10. Como se trata de uma enzima digestiva podemos observar que seu pico de atividade foi verificado na fase em que o consumo de massa de feijão é máximo (FIGURA 2).

4.7 - Atividade Fosfatásica Ácida

O perfil obtido para a atividade fosfatásica ácida de **C. maculatus** está mostrado na FIGURA 11. Nas condições dos experimentos o gráfico nos evidencia uma atuação máxima dessa enzima na fase de pré-pupa. De maneira semelhante à azocaseinase ácida (FIGURA 9) a fosfatase ácida se encontra presente nas outras fases de desenvolvimento do gorgulho estudadas, muito embora em quantidades inferiores.

4.8 - Atividade anti-quimiotrípica

O resultado do estudo do comportamento da atividade anti-quimiotrípica de **C. maculatus** está representado na FIGURA 12. Podemos observar que essa atividade aumentou até a fase de pré-pupa coincidindo com o período em que está havendo aumento de peso fresco (FIGURA 1), máximo de consumo de massa de feijão (FIGURA 2) e máxima atividade azocaseinásica alcalina (FIGURA 8). Após uma rápida queda verificada ainda na fase de pré-pupa há novamente um aumento da atividade anti-quimiotrípica que desta feita, coincide com a atividade máxima da azocaseinase ácida (FIGURA 9), vale salientar que no dia em que a atividade anti-quimiotrípica é máxima (20°

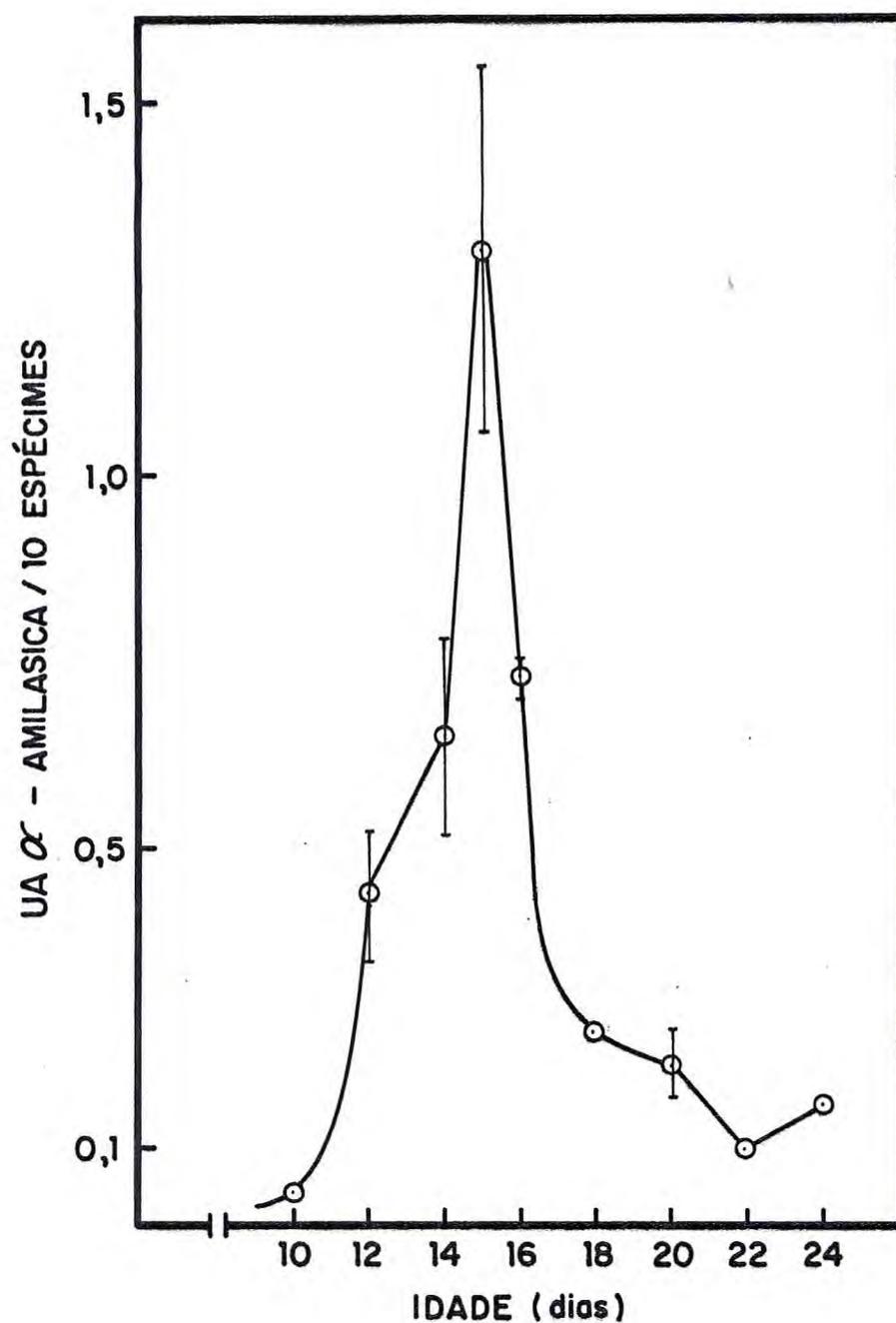


FIGURA 10 - Atividade amilásica de *C. maculatus* durante o seu desenvolvimento. Cada ponto do gráfico representa as médias de um mínimo de 2 e um máximo de 4 determinações. Os coeficientes de variação para essas determinações estão compreendidos entre

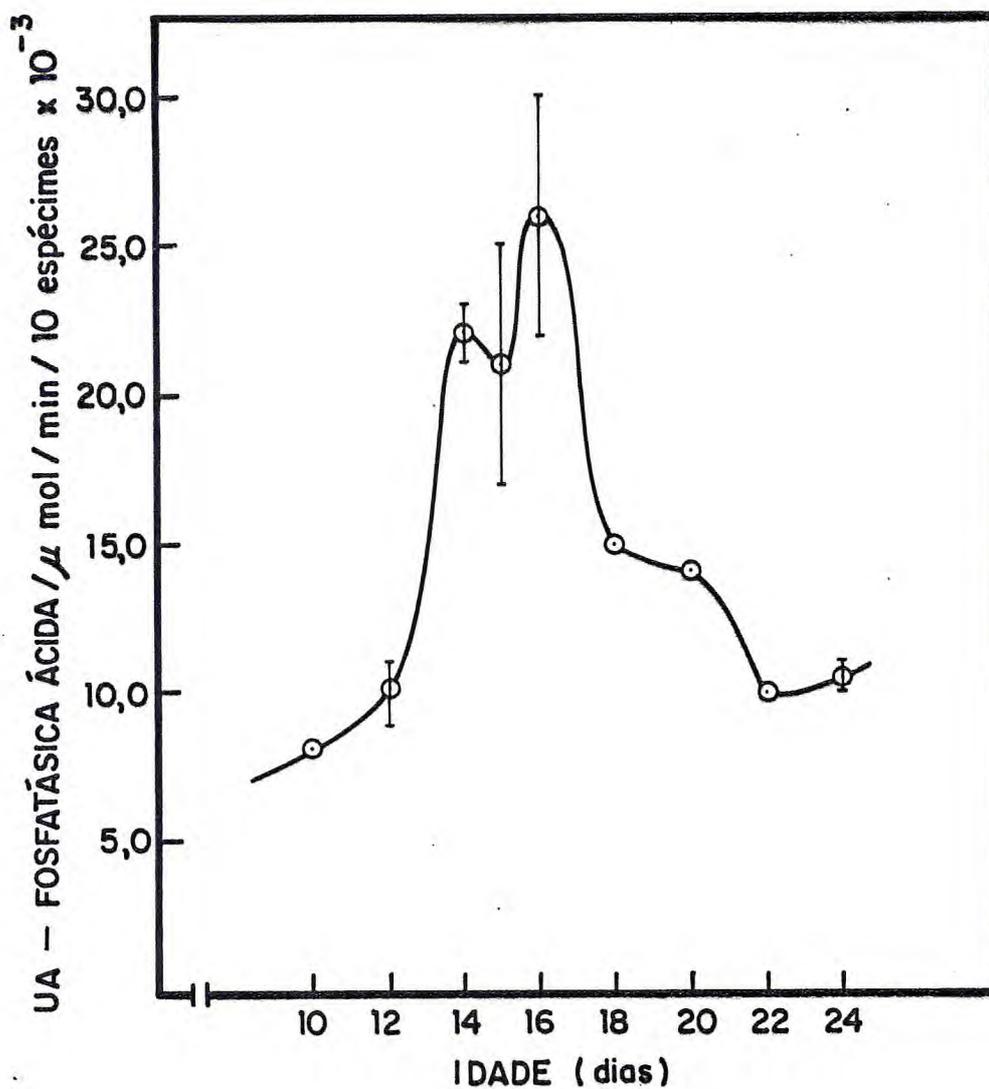


FIGURA 11 - Perfil de atividade fosfatásica ácida de *C. maculatus* ao longo de seu desenvolvimento. Os pontos utilizados para fazer o gráfico representam as médias de um mínimo de 3 e um máximo de 4 determinações. Os coeficientes de variação, estão entre os valores de 3,22 e 20,34.

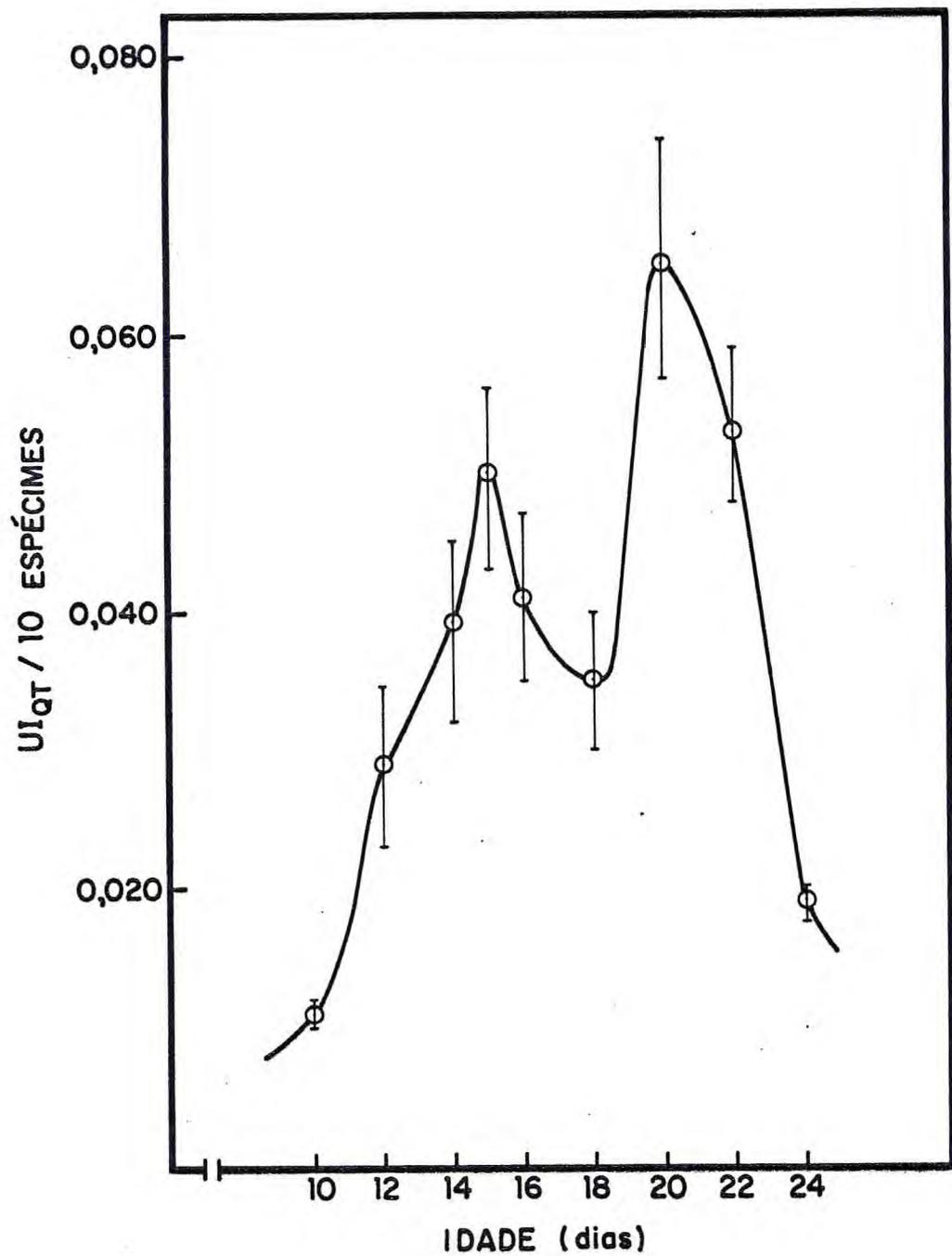


FIGURA 12 - Perfil de atividade anti-quimiotrípica ao longo de desenvolvimento de *C. maculatus*. Cada valor representado no gráfico constitui a média de um mínimo de 2 e um máximo de 4 determinações. Os coeficientes de variação obtidos estão entre os valores de 1,45 e 19,16.

dia) o gorgulho não está mais se alimentando (FIGURA 2) e seu peso fresco começa a cair (FIGURA 1).

4.9 - Ação do IB sobre as Atividades Enzimáticas Estudadas

A TABELA I mostra que nas concentrações usadas não há inibição de azocaseinase ácida. Há, no entanto, leve inibição de azocaseinase alcalina e α -amilase pelo IB de **Vigna unguiculata** cv seridó.

4.10 - Resistência de sementes de Vigna unguiculata ao C. maculatus

A cultivar de feijão de corda CE-524 que é suscetível ao ataque do gorgulho apresentou um teor de inibidor de tripsina de 9.997 UI/g de semente, aproximadamente igual ao encontrado na cultivar TVu 2027 (9.525 UI/g de semente) que, no entanto, é resistente ao ataque do bruquídeo.

TABELA 1 - Atividade residual de azocaseinase ácida, azocaseinase alcalina e amilase após ação do IB de **Vigna unguiculata** cv. seridó.

Enzimas	mg/ml de IB				
	zero	0,001	0,01	0,1	1,0
Azocaseinase ácida	100%	99,4%	94,4%	100%	94,4%
Azocaseinase alcalina	100%	93,8%	90,1%	86,4%	85,1%
Amilase	100%	-	-	..	87,5%

5 - DISCUSSÃO

As mudanças que ocorrem durante a metamorfose são refletidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas bem como na atividade de certas enzimas (CHEN, 1966). A natureza e atividade das enzimas proteolíticas de insetos são estágio-específicas (CHEN, 1978) e suas enzimas digestivas variam de acordo com a composição do alimento (WIGGLESNORTH, 1974).

A caracterização de proteases digestivas de insetos sempre foi feita em extratos brutos ou homogenatos de tecido intestinal utilizando-se normalmente gelatina, caseína ou hemoglobina como substrato. As proteases isoladas de muitos insetos são quase sempre classificadas como semelhante à tripsina ou à quimiotripsina. Proteases ativas em pH ácido são apresentadas por poucos dos insetos estudados (LAW et al., 1979).

Dois grupos de enzimas proteolíticas foram detectados durante o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* criado sobre uma cultivar suscetível (CE 31 ou pitiúba) de *Vigna unguiculata*. Uma atividade proteolítica alcalina, provavelmente do tipo tripsina, cujas condições de ensaio foram estabelecidas no presente trabalho (FIGURAS 4, 4, 6, 7) está ligada ao 4º instar larval e ao estágio de pré-pupa (FIGURA 8).

A atividade proteolítica ácida (FIGURA 9) está temporariamente ligada às transformações que levam ao estágio de pupa e adulto sugerindo envolvimento em processos histolíticos.

Análises de proteases no desenvolvimento de pupa mostraram que essas enzimas podem estar diretamente envolvidas nos processos histolíticos. Em *Calliphora*, AGRELL (1951) encontrou somente uma leve mudança na atividade de proteinases e dipeptidases durante o desenvolvimento pupal. A correlação entre a atividade proteolítica e os eventos morfogênicos sugere que a ação enzimática está provavelmente sob o controle de pH do tecido e tem uma relação direta com a energia do

metabolismo. Em outras palavras, um abaixamento de pH ativaria a proteinase induzindo assim proteólise do tecido larval enquanto o processo reverso favoreceria a síntese de proteínas do adulto. Na mosca doméstica a atividade de uma protease ácida (pH 4,7-4,9) permaneceu alta e constante durante o período inteiro de metamorfose enquanto que uma protease alcalina (pH 8,6) tornou-se praticamente indetectável (CHEN, 1966).

A atividade proteolítica alcalina detectada durante o desenvolvimento do gorgulho apresentou um paralelismo entre o aumento de peso (FIGURA 1), o consumo de massa de feijão (FIGURA 2) e a atividade amilásica (FIGURA 10). Este paralelismo parece indicar tal como em outras espécies de insetos como *Drosophila*, *Manduca sexta*, *Culex pipens* (CHEN, 1966) e *Periplaneta americana*, *Apis mellifica*, *Lucilia sericata*, *Calliphora* (WIGGLESWORTH, 1974) a digestão em *C. maculatus* é dependente de uma atividade amilásica e uma protease alcalina. Atividade proteolítica em *Attagenus megatona* (F.), tem um pH ótimo alcalino e está confinada ao estágio larval (BAKER, 1976)

A fosfatase ácida detectada em *C. maculatus* durante o seu desenvolvimento parece estar associada às diversas fases de desenvolvimento por que passa o inseto. Esperávamos obter durante o desenvolvimento um perfil para esta enzima semelhante ao encontrado para a atividade azocaseinásica ácida o que corroboraria a hipótese de ser esta uma enzima do tipo catepsina. Embora o resultado encontrado não tenha sido o esperado não descartamos a possibilidade de que a atividade azocaseinásica ácida está como a fosfatase ácida, envolvida em processos histolíticos. Ambas as enzimas parecem estar sendo solicitadas em processos envolvidos em diferentes fases de desenvolvimento do gorgulho. Usando técnicas histoquímicas, YAO (1950) registrou que em *Drosophila*, fosfatase ácida está presente em todos os estádios mas não mostra nenhuma mudança aparente durante a embriogênese. Em *Bombix*, SHIDHARA e BHAI (1963) mostraram que a fosfatase ácida permanece muito ativa durante a metamorfose (CHEN, 1966).

No estudo do comportamento da atividade inibitória durante as diversas fases de desenvolvimento de *C. maculatus* foram realizados ensaios de atividade anti-tríptica e anti-quimiotríptica. A atividade anti-tríptica mostrou ser fraca (resultados não apresentados). Os resultados obtidos para a atividade anti-quimiotríptica (FIGURA 12) parecem indicar que, o inibidor está sendo acumulado pelo inseto antes deste atingir a fase de pré-pupa, quando então a atividade sofre uma queda e também ao entrar na fase de pupa, após a qual há um declínio na atividade anti-quimiotríptica. A interpretação do comportamento desta atividade nos parece um tanto complexa uma vez que não foi possível precisar se o inibidor é endógeno ou se está sendo incorporado pelo inseto.

Os inibidores de proteases, em sua conformação nativa, são moléculas compactas cujos centros ativos estão localizados no interior de alças formadas por pontes dissulfeto. Para que elas possam ser digeridas é necessário que as pontes dissulfeto sejam reduzidas o que provavelmente ocorre no trato digestivo das larvas, o qual parece ser fortemente reductor (LAW et al., 1979).

Os inibidores de proteases serínicas parecem desempenhar um papel de proteção das sementes contra o ataque de insetos. Esta sugestão foi dada por GATEHOUSE (1979), que mostrou ser a resistência da cultivar de feijão de corda (TVu 2027) ao ataque do gorgulho devida à alta concentração de inibidores em relação a concentração desses inibidores em cultivares suscetíveis. Verificamos no entanto, que uma cultivar do mesmo feijão (CE 524), contendo aproximadamente a mesma quantidade de inibidores que a cultivar resistente (TVu 2027) é totalmente suscetível ao ataque do gorgulho. Isto evidentemente não descarta a possibilidade de que os inibidores desempenhariam um papel de proteção, mas indica que no desenvolvimento da resistência ao ataque de insetos, fatores outros que não apenas esses inibidores também desempenhariam um papel importante. Por outro lado, experiências feitas com uma preparação rica em inibidores de tripsina e quimiotripsina mostraram que estes não foram capazes de ini-

bir significativamente as atividades proteolíticas alcalina, ácida e atividades α -amilásica de *C. maculatus* (TABELA 1). Em relação a estes fatos resta saber se a toxicidade dos inibidores para insetos é devida à inibição do sistema enzimático destes ou, alternativamente, se é devida à incapacidade do sistema enzimático desses insetos de digerirem estes inibidores.

Parece lícito sugerir aqui que as bases de resistência do cultivar de feijão de corda (TVu 2027) ao gorgulho não se deve apenas a fatores quantitativos com relação ao inibidor de tripsina mas sobretudo a fatores qualitativos com relação a diferentes agentes de inibição.

6 - CONCLUSÕES

- 1 - Foram detectadas duas atividades de enzimas proteolíticas alcalina e ácida, além de atividade α -amilásica, fosfatásica ácida e anti-quimiotríptica durante o desenvolvimento de **C. maculatus**.
- 2 - Foi verificado um paralelismo entre o consumo de massa de feijão, aumento de peso, atividade α -amilásica e atividade proteolítica alcalina.
- 3 - A digestão em **C. maculatus**, como em outras espécies de insetos, é dependente de uma atividade α -amilásica e de uma atividade proteolítica alcalina.
- 4 - A atividade proteolítica ácida parece estar associada a processos histolíticos relacionados à passagem de pupa para adulto.
- 5 - As atividades fosfatásica ácida e anti-quimiotríptica apresentam um comportamento mais complexo, parecendo estar associadas às diversas fases de desenvolvimento por que passa o inseto.
- 6 - Uma preparação rica em inibidores de tripsina e quimiotripsina não foi capaz de inibir, significativamente, as atividades proteolíticas alcalina e ácida e a atividade α -amilásica.
- 7 - Uma cultivar de feijão de corda (CE 524) contendo a mesma quantidade de inibidores de tripsina que a cultivar resistente (TVu 2027) é totalmente suscetível ao ataque do gorgulho.

- 8 - As bases da resistência da cultivar de feijão de corda (TVu 2027) parecem não ser devidas aos elevados níveis de inibidores de tripsina.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRELL, I. A contribution to the histolysis-histogenesis problem in insect metamorphosis. **Acta physiol. Scand.** **23**: 179-186, 1951. Citado em CHEN, P.S., 1966.
- BAKER, J.E. Substrate specificity in the control of digestive enzymes in larvae of the black carpet beetle. **J. Insect Physiol.** **23**:749-753, 1977.
- BAUMGARTHER, B. and CHRISPEELS, M.J. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of **Mung beans** **Plant Physiol.** **58**:1-6, 1976.
- CARVALHO, J.P. e MACHADO, M.U.M. A entomofauna dos produtos armazenados; contribuição para o estudo do **Calossobruchus maculatus** (Fabricius) (Col, Bruchidae). **B. Soc. portuguesa Ci. Naturais**, Lisboa, **11**:133-240, 1967.
- CHEN, P.S. Amino acid and protein metabolism in insect development. In **Advances in Insect Physiology**, **3**:53-132, 1966.
- CHEN, P.S. Protein synthesis in relation to cellular activation and deactivation. In **Biochemistry of Insects**, pp. 145-201, Morris Rockstein, Academic Press, New York, 1978.
- CHINO, H. Enzymatic pathways in the formation of sorbitol and glycerol in diapausing egg of the Silkworm, **Bombyx mori** II. On the phosphatases. **J. Insect Physiol.** **6**:231-240, 1961. Citado em CHEN, P.S., 1966.
- CHIPPENDALE, G.M. The functions of carbohydrates in insect life processes. In **Biochemistry of Insects**, pp. 2-54, Morris Rockstein, Academic Press, New York, 1978.
- COELHO, A.N. Relação entre o sistema proteolítico de **Callosobruchus maculatus** (Fabr.) e inibidores de enzimas proteolíticas de **Vigna sinensis** (L.) Savi. Dissertação de mestrado apresentada ao Deptº de Bioq. e Biol. Molecular da UFC, 1980.

- FAO PRODUCTION YEARBOOK - Vol. 36, 132-133, 1982.
- FERREIRA, C. and TERRA, W.R. Intracelular distribution of hidrolases in midgut caeca cells form an insect with emphasis on plasma membrane - bound enzymes. **Biochem. Physiol.** **668**:467-473, 1980.
- GALLI, Ferdinando. **Manual de Fitopatologia**, Dept^o de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba - S. Paulo. Ed. Agronômica Ceres Ltda., S. Paulo, 1980.
- GALLO, Domingos. **Manual de Entomologia**. Dept^o de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Ed. Agronômica Ceres Ltda., S. Paulo, 1970.
- GOAD, L.J. The development of amylase and protease activity in germinating wheat. PhD thesis. University of Manchester, 1963.
- GOA, J. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** **5**:218-222, 1963.
- GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., DOBIE, P., KILMINSTER, A.M. and BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in **Vigna unguiculata**. **J. Sci. Food Agric.** **30**:984-958, 1979.
- GATEHOUSE, A. Protease inhibitors and the biochemical basis of insect resistance in **Vigna unguiculata**. PhD Thesis University of Durham, England, 1979.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Secretaria de Planejamento da Presidência da República. Julho, 1984..
- INDIRA, T. Biochemical and cytochemical studies during development and ovarian growth in **Sphaerodema molestum** (Duf.). Ph.D. Thesis, Annamali University, South India, 1963. Citado em CHEN, P.S., 1966.
- JANY, K.D., HAUG, H. and ISHAY, J. Trysin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of **Vespa orientalis** and **Vespa crabro**. **Insect Biochem.** **8**:221-230, 1978.
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.S. and LIENER I.E. Insecticidal action

- of the phytohemagglutinin in black beans on a Bruchidae, beetle. **Science**, **192**:795, 1976.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin. II General properties **J. Gen. Physiol.** **30**:291-310, 1974.
- KUNZ, A.P. Resolution and properties of the proteinases in adult *Aedes aegypti* (L.), **Insect Biochem.** **8**:169-175, 1978.
- LASKOWSKI, M. Jr. and SEALOCK, R.W. Protein proteinase inhibitors - molecular aspects. **In the Enzymes.** **3**:375-437, 1971.
- LAW, J.H., DUNN, P.E. and KRAMER, K.J. Insect proteases and peptidases. **Adv. Enzymol.** **45**:389-423, 1979.
- LIENER, I. Toxic factors in edible legumes and their elimination. **Amer. J. Clin. Nutr.**, **11**:281-289, 1962.
- LONG, C. Ed. *Biochemist's. F. and F.N.* Spon Ltda. London, 1961.
- MAIA, M.G. Inibidores de tripsina em *Adenathera pavonina*, L. Dissertação de mestrado apresentada ao Dept^o de Bioq. e Biol. Molecular da UFC, 1982.
- MATILE, P. Aleurone vacuoles as lysosomes **Z. Pflanzphysiol.** **585**:365-368, 1968.
- MAYER, A.M. and SHIAN, Y. Control of seed germination. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **25**:167-193, 1974.
- PODOLER, H. and APLEBAUM, S.W. The α -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. Purification and action pattern. **Biochem. J.** **121**:317-320, 1971.
- PODOLER, H. and APLEBAUM, S.W. The α -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. Properties. **Biochem. J.** **121**:321-325, 1971.
- PUSZTAI, A. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. **Nutrition Abstracts Reviews.** **37**:1-9, 1967.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitor of plants and microorganisms. **Phytochem.** **16**:195-196, 1977.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** **24**:173-196, 1973.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical

- model for pest-induced natural plant protection. **Trends in biochem. Sci.** **3**:148-150, 1978.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors. In *Herbivores: their interection with metabolites*. (Ed. by C.A. Rosenthal and Janzen, D.H., eds.) pp. 599-618, Academic Press, New York, 1979.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors. In **Biochemistry of Plant**. **6**:351-370, Academic Press Inc., 1981.
- SANTOS, J.H.R. *Biologia geral dos Insetos*, Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 35p. 1974.
- SANTOS, J.H.R. 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. Piracicaba, 1971.
- SHIDHARA, S. and BHAI, J.V. Alkaline and acid phosphatases of the silkworm, **Bombyx mori** L. **K. Insect Physiol.** **9**: 693-701, 1963.
- SHULOV, A., PENER, M.P. KUK-MEIRI, S. and LICHTENSTEIN, N. Proteolytic enzymes in various embryonic stages of the eggs of **Locusta migratoria migratoroides** (R. and F.) **J. Insect Physiol.** **1**:279-285, 1957. Citado em CHEN, P.S.
- SOMADDER, K. and SHRIVASTAVA, M. Digestive enzymes in the gut and salivary gland of the larvae of **Chilo auricilius** Ddgn. **Experientia**, **36**:218-219, 1980.
- STEFFENS, R., FOX, F.R. and KASSELL, B. Effect of the trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae **Ostrinia nubialis** (Hubner). **J. Agric. Food. Chem.** **26**:170-174, 1978.
- TERRA, W.R., FERREIRA C. and BIANCHI A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of **Rhynchosciara** and its Physiological significance. **J. Insect. Physiol** **25**: 487-494, 1979.
- VENTURA, M.M. and XAVIER FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black - eyed pea (**Vigna sinensis**). I. Purification and partial characterization. **Ann. Acad. Brasil Sci.** **38**:553-566, 1966.

- VOGEL, R. TRAUSTSCHOLD, I. and WERLE, E. **Natural Proteinase Inhibitors**. 151pp. Academic Press, New York, 1968.
- XAVIER FILHO, J. Trypsin inhibitors during germination of **Vigna sinensis** seeds, **Physiol. Plant** 28:149-154, 1973.
- XAVIER FILHO, J. Trypsin inhibitors in sorghum grain. **J. Food Sci.**, 39:422-423, 1974.
- WEDER, J.K.P. Occurrence of proteinase inhibitors in **Mimosoideae**. **Z. Pflanzenphysiol.** 90:285-291, 1978.
- WIENDL, F.M. Alguns usos e feitos das radiações gama em **Zabrotes subfasciatus** (Boh., 1833)(Col. Bruchidae) Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 1969.
- WEIEL, J. and HAPNER, K.D. Barley proteinase inhibitors; a possible role in grasshopper control, **Phytochem.** 15:1885-1887, 1976.
- WIGGLESWORTH, V.B. **Insect Physiology**, Chapman and Hall, 166pp London, 1974.
- WHITAKER, J.R. Naturally occurring peptide and protein inhibitors of enzymes, In **Impact of toxicology on food processing**, 57-103 Ed. John C. Ayres and J.C. Kirschman Avi Publishing, Company, Inc. Westport, Connecticut.
- YAO, T. Cytochemical studies on the embryonic development of **Drosophila melanogaster**. II. Alkaline and acid phosphatases **Q. J. Micorsc. Sci.** 91:79-88, 1950. Citado em CHEN, P.S., 1966.
- BAKER, A.M.R. Protease inhibitors and the biochemical basis of insect resistance in **Vigna unguiculata**. PhD Thesis University of Durham, England, 1979.

8 - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

Arq. Biol. Tecnol. 24 (1) 1981

D30

PROTEASES DE Callosobruchus maculatus E SEUS INIBIDORES EM FEIJÃO DE CORDA

J.XAVIER-FILHO, A.L.SERRA LOPES e A.NERI COELHO

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará,
Caixa Postal, 1065 - Fortaleza, Ceará.

Dois grupos de enzimas proteolíticas foram detectados durante o desenvolvimento de Callosobruchus maculatus (gorgulho) criados sobre cultivares susceptíveis de Vigna unguiculata (feijão de corda). Uma atividade proteolítica alcalina, provavelmente do tipo tripsina, está ligada ao 3º-4º estágio larval quando é máximo o consumo de massa da semente. A atividade proteolítica ácida está temporalmente ligada às transformações que levam ao estágio de pupa sugerindo envolvimento em processos histolíticos.

Inibidores de tripsina e da atividade proteolítica ácida da larva são detectados tanto em sementes susceptíveis como em um cultivar resistente de feijão de corda. Os níveis de ambos os tipos de inibidores são bem maiores para o cultivar resistente do que para os susceptíveis.

Dados experimentais próprios e de outros sugerem que a resistência ao gorgulho possa ser devida a ação de ambos os tipos de inibidores sobre os sistemas proteolíticos digestivo e catéptico, durante o desenvolvimento.

Auxílio financeiro: CNPq

INIBIDORES DE PROTEASES E A RESISTÊNCIA DE FEIJÃO DE CORDA (Vigna unguiculata) AO GORGULHO (Callosobruchus maculatus).

J. Xavier Filho, A.L. Serra Lopes e I.A. Ainouz

Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC - C.P. 1065 - Fortaleza - Ceará

Estudando o desenvolvimento do gorgulho (Callosobruchus maculatus) sobre feijão de corda (Vigna unguiculata) verificamos um paralelismo entre o consumo de massa de feijão, o aumento de peso, a atividade α -amilásica e a atividade proteolítica alcalina. Este paralelismo nos parece indicar que, como em outras espécies de insetos, a digestão em C. maculatus é dependente de uma atividade α -amilásica e de uma protease alcalina. Uma atividade proteolítica ácida parece estar associada a processos histolíticos relacionados à passagem de pupa para adulto. Atividades fosfatásica-ácida e anti-quimiotríptica apresentam um comportamento mais complexo, parecendo estar associadas às diversas fases de desenvolvimento por que passa o inseto. A inibição do complexo proteolítico alcalino por inibidores de tripsina existentes no feijão de corda foi sugerida como sendo, em parte, responsável pela resistência de um cultivar de V. unguiculata (TVu 2027) que contém ca. de 2 vezes mais inibidores de tripsina do que as variedades susceptíveis. Verificamos, no entanto, que um cultivar do mesmo feijão (CE 524), contendo a mesma quantidade de inibidores que o cultivar resistente, é totalmente susceptível ao ataque do gorgulho. Por outro lado experiências feitas com uma preparação rica em inibidores de tripsina e quimiotripsina (IB) mostraram que esta não foi capaz de inibir, significativamente, as atividades proteolíticas alcalina, ácida e atividade α -amilásica. Sugerimos que as bases da resistência de um cultivar de feijão de corda ao gorgulho não se devem a presença de inibidores de tripsina em concentração elevada.

Auxílio financeiro CNPq, CAPES