WALTER RIBEIRO TERRA

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA HEMOLINFA E DO CASULO COLETIVO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA*

Tese de Doutoramento apresentada ao
Departamento de Bioquímica, Instituto
de Química, Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO
1 9 7 2

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração desta tese houve sempre a colaboração de inúmeras pessoas e Instituições a quem expresso o meu mais profundo agradecimento. Entre elas gostaria de salientar:

— O Prof. Dr. Francisco J.S. Lara, orientador desta tese, que não poupou esforços em criar tôdas as condições necessárias para o desenvolvimento dêste trabalho, assim como, pelo contínuo estímulo a mim proporcionado.

— O Sr. Antônio G. de Bianchi com quem dividi o entusiasmo e as frustações da maior parte dêste trabalho.

— O Sr. Ângelo G. Gambarini com quem realizei os estágios iniciais dêste trabalho.

— A srta. Yolanda Tavares e Sra. Walkyria H. Lara, ambas do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração em campos de sua especialidade.

— O Dr. Gerhard Malnic, Dra. Rebeca C. de Angelis e Sra. Ilza C. M. Terra, todos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e Dr. Herval P. Ribeiro do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela presteza com que me emprestaram equipamentos de sua responsabilidade.

— Os meus colegas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Dr. Fernando Galembeck, Jane Balsamo, Júlia M. Alves, Manuel T. Pueyo, Marila Cordeiro, Nelson Marques, Dr. Rogério Meneghini, Roberto V. Santelli, que colaboraram em algumas das fases experimentais ou contribuíram com valiosas críticas e sugestões.

— A Dra. Eline S. Prado em cujo curso de pós-graduação em química de proteínas aprendi várias técnicas que se tornaram úteis durante a realização dêste trabalho.

— A Dra. Carminda da C. Landim que através de seu curso de Morfologia de Insetos muito contribuiu para uma boa interpretação de muitos resultados por mim obtidos.

— O Dr. Gilberto B. Domont do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro que me introduziu nas técnicas de cromatografia de aminoácidos.

— A sra. Mirian D. Marques que além de ter colaborado em uma das fases experimentais, forneceu numerosas informações não publicadas de seu trabalho.

— A srta. Hiromi Tamaki e Sr. José Coelho sem cuja assistência técnica teria sido muito difícil a realização desta tese.

— A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que através de uma bôlsa de Iniciação Científica e duas bôlsas de Doutoramento me possibilitou ingressar na vida científica.

— A srta. Yvone de Abreu responsável pela eficiente datilografia desta tese.

ÍNDICE

Pág.

Lista de Abreviaturas empregadas 1

INTRODUÇÃO 2

1. Considerações iniciais 2
2. Contrôle hormonal do desenvolvimento dos insetos.... 6
3. Origem das proteínas do inseto adulto 9
4. Sêdas e casulos 14
5. Finalidades dêste trabalho 16

MÉTODOS 20

1. Cultura de Rhynchosciara 20
2. Determinação da idade fisiológica larval 20
3. Coleta de hemolinfa 23
4. Determinação do volume ocupado pelos hemocitos na hemolinfa 23
5. Métodos de estudo da coagulação e escurecimento da hemolinfa 24
6. Determinação da osmolaridade, densidade, volume e pêso-sêco da hemolinfa 24
7. Determinação de pO_2, pCO_2, pH e HCO_3^- na hemolinfa 25
8. Determinações químicas na hemolinfa 25
9. Cromatografia de troca iônica dos compostos ninhidrina-positivos ácidos-solúveis na hemolinfa 29
10. Preparação dos pigmentos da hemolinfa 30
11. Identificação dos carotenóides 31
12. Preparação do casulo I, II e III e determinação da massa produzida por indivíduo 32
13. Determinação da solubilidade do casulo 32
14. Determinações químicas do casulo 33
15. Cromatografia em papel de carboidratos do casulo ... 35
16. Cromatografia de troca iônica de aminoácidos da fração insolúvel do casulo 36

Pág.

17. Determinação de pêso-sêco e metais nos tubos de Malpighi 37
18. Determinação de glicogênio e pêso-sêco do corpo gorduroso 37

REAGENTES 38

RESULTADOS 39

A. Química da hemolinfa de larvas de R. americana 39

1. Resultados gerais 39
2. Cromatografia dos compostos ninhidrina-positivos solúveis em ácido 40
3. Apresentação dos resultados das análises químicas. 48
4. Pigmentos 50

B. Química do casulo coletivo de R. americana 58

1. Apresentação geral dos resultados 58
2. Solubilidade, conteúdo de cinzas e metais 59
3. Carboidratos 61
4. Compostos nitrogenados 65
5. Produção e composição do casulo em função do tempo 68

C. Aspectos químicos e fisiológicos durante o 4º estádio de R. americana 72

1. Massa corpórea e volume de hemolinfa 72
2. Determinações químicas na hemolinfa 76
3. Pêso-sêco e glicogênio no corpo gorduroso 81
4. Pêso-sêco e metais nos túbulos de Malpighi 82

DISCUSSÃO 85

A. Química da hemolinfa 85

1. Extensão da análise realizada 85
2. Componentes orgânicos da hemolinfa 87
3. Composição molar da hemolinfa e seus componentes inorgânicos..... 93
4. Coagulação e escurecimento 99
5. Pigmentos 100

Pág.

B. Produção do casulo coletivo por larvas de *R. americana* 102

1. Química do casulo 102
2. Origem dos componentes do casulo 104
3. Mecanismos e regulação da produção do casulo ... 111

RESUMO 114

ABSTRACT 116

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

ABREVIATURAS

TCA - Ácido tricloroacético

1ºP - Primeiro período do 4º estádio de R. americana (ver Tabela I). Da mesma forma 2ºP, 3ºP, 4ºP, 5ºP e 6ºP, correspondem aos demais períodos do 4º estádio.

p.e. - Ponto de ebulição

U.V. - Luz ultravioleta

RNA - Ácido ribonucléico

DNA - Ácido desoxirribonucléico

Cf. - Confrontar com

PAS - Periodic Acid Schiff, teste para carboidratos

λ - Comprimento de onda

p.ex.- Por exemplo

p/p - Pêso por pêso

P/V - Pêso por volume

V/V - Volume por volume

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Ác. - Ácido

EC - Numeração das enzimas conforme recomendações feitas pela Enzyme Commission da International Union of Biochemistry em 1964.

INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A classe Insecta constitui o grupo com o maior número conhecido de espécies no reino animal; cêrca de 900.000 para um total descrito de 1.200.000. Sua distribuição abrange tôda a superfície do planêta, com exceção das profundezas do oceano e está representada mesmo entre os poucos animais que habitam permanentemente a região do Polo Sul. Essa enorme distribuição ecológica e a variedade de formas que assume, a torna excelente para o estudo das relações organismo-meio e certamente seria muito interessante conhecer as razões morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de seu sucesso.

A importância econômica dos insetos, pode ser avaliada quando se considera o montante de prejuízos causados por êles anualmente; sòmente nos Estados Unidos, como consequência de seus ataques a colheitas, produtos armazenados, domésticos e similares, além das doenças e desconfôrto causados no homem e nos animais: 15 biliões de dólares! (ROSS, 1965). Ainda dentro do prisma econômico, sua importância se faz sentir também na indústria da sêda natural, do mel, da cêra, etc.

O estudo dos insetos não tem sido estimulado apenas pelo seu número e sucesso biológico ou pelas possibilidades dêsse conhecimento contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de contrôle de pragas. Os insetos tem-se mostrado excelentes modelos para estudos de problemas genéticos e citogenéticos (SINNOT, DUNN & DOBZHANSKY, 1958), bioquímicos (GILMOUR, 1961), fisiológicos (WIGGLESWORTH, 1948, 1965), etc.

Todos os insetos, com exceção dos Ametabola, sofrem uma metamorfose. Esta pode ser definida, segundo WIGGLESWORTH (1965), como a mudança mais ou menos marcada de forma, que ocorre quando o inseto torna-se adulto; independente do fato dessa modificação requerer duas mudas e um estágio pupal como nos Holo

metabola, ou uma única muda final, como nos Hemimetabola.

Existem várias teorias para explicar a origem da metamorfose completa em insetos. Aquela de maior aceitação entre os especialistas é a de POYARKOFF-HINTON (Cf. NOVÁK, 1966). Segundo esta teoria a adaptação da larva e adulto a nichos ecológicos distintos os tornou muito diferentes morfológicamente. A pupa poderia ser interpretada como um meio de intercalar uma segunda muda entre a larva de último estádio e o adulto, permitindo o estabelecimento das ligações musculares imaginais em apódemas cuticulares do adulto, que são completamente diferentes daqueles da larva, em duas etapas. A primeira muda permitiria o descolamento e histólise da musculatura larval e a segunda seria necessária para a ligação dos músculos imaginais.

Segundo WIGGLESWORTH (1965, 1970) a metamorfose, do ponto de vista ontogenético, poderia ser considerada como um tipo particular de polimorfismo. Os insetos Holometabola possuiriam três sistemas genéticos distintos, enquanto que os Hemimetabola possuiriam dois sistemas, correspondentes no primeiro caso à larva, pupa e adulto e no segundo caso à ninfa e adulto. Durante a metamorfose ocorreria a inibição de um sistema genético e a indução de outro.

O fato da profunda reorganização de tecidos e órgãos que caracteriza a metamorfose de insetos estar sob contrôle hormonal (ver Ítem 2 abaixo), tem levado a se considerar êsse fenômeno um excelente modêlo para o estudo da regulação hormonal da expressão genética e seu papel na morfogênese. Isso tem inspirado um número crescente de trabalhos em bioquímica do desenvolvimento de insetos,que foram revistos recentemente por alguns autores (AGRELL, 1964; GILBERT, 1967b; WYATT, 1968).

A metamorfose nos insetos Holometabola inicia-se por ocasião da muda pupal, embora naqueles insetos que produzem um pupário ou tecem um casulo para a pupa, a metamorfose inicia-se mais precisamente com a produção dessas estruturas (WIGGLESWORTH 1965),

A respiração dos insetos durante a metamorfose segue uma curva em forma de U, indicando uma respiração mais intensa

no início e no fim do processo. Êste fenômeno foi interpretado inicialmente como refletindo sucessivamente a histólise e histogênese dos tecidos (Cf. AGRELL, 1964). Entretanto, estudos histológicos mostraram que essa interpretação não era correta, pois os dois fenômenos ocorriam simultâneamente. Estudos posteriores indicaram que a curva em U da taxa de respiração era principalmente uma consequência do contrôle das vias respiratórias pelos níveis de ADP, ATP e fosfato inorgânico celular, refletindo, portanto, as demandas energéticas do inseto. Como a pupa ou o adulto farato* possuem pequena atividade muscular, a maior ou menor demanda energética na metamorfose tem sido relacionada com a maior ou menor atividade biossintética de proteínas (WYATT, 1968).

Os resultados comentados acima indicam, portanto, que as estruturas imaginais começam a ser formadas desde o início da metamorfose e que subjacentemente à formação dessas estruturas ocorrem processos que demandam energia e que devem incluir a biossíntese de proteínas.

As estruturas imaginais diferem bastante daquelas da larva, sugerindo que deve haver uma diferença notável entre as proteínas imaginais e as larvais. A extensão em que a constituição protéica do adulto difere daquela da larva da mesma espécie tem sido estudada principalmente nas proteínas da hemolinfa, devido às facilidades de sua coleta e pela dificuldade de se trabalhar com órgãos de larvas de insetos, devido ao seu pequeno tamanho. Êsses estudos foram realizados principalmente com eletroforese de gel de poliacrilamida e mostraram que existe algumas diferenças de padrão protéico entre a larva e o adulto (ver revisão em WYATT, 1968. No caso de R. americana, consultar BIANCHI, 1972).

---

* HINTON (1946) propôs o têrmo "pharate" para designar o estádio que está fechado dentro da cutícula do estádio anterior. O têrmo "pharate" é derivado do grego "pharata" que significa "coberto por um véu". Como não existe nenhum têrmo em português para designar "pharate" será usado aqui o têrmo "farata" ou "farato", conforme o caso, que utiliza a mesma raiz grega usada por HINTON (1946). Dessa forma adulto farato corresponde ao adulto fechado dentro da cutícula pupal.

Eletroferogramas em gel de poliacrilamida de homogenatos de tecido, que devem ser mais significativos do que a hemolinfa na representação da constituição protéica do inseto, mostraram a existência de algumas diferenças entre larvas e adultos. Entretanto, devido ao número relativamente pequeno de bandas eletroforèticamente resolvidas (cêrca de 20), em relação às centenas de proteínas que devem estar presentes nas células, êsses resultados são pouco conclusivos na avaliação do grau de diferença existente entre a constituição protéica larval e imaginal.

Uma outra maneira de atacar o problema é isolar proteínas homólogas de diversos estágios do desenvolvimento do inseto e compará-las quìmicamente. Poucos estudos foram realizados nêsse sentido para se ter uma idéia clara a respeito (ver revisão em WYATT, 1968). A questão da origem das proteínas do adulto, isto é, se elas originam-se integralmente por síntese "de novo" a partir de aminoácidos livres ou se parte das proteínas larvais são conservadas intactas no adulto, está ìntimamente relacionada ao problema da extensão em que as proteínas do inseto adulto diferem daquelas larvais. O problema encontra-se ainda relativamente pouco estudado e os resultados obtidos até o presente, embora conflitantes, sugerem que as proteínas imaginais poderiam originar-se em parte por síntese "de novo" e em parte a partir de proteínas larvais que se conservariam intactas no adulto (ver ìtem 3, a seguir).

Abaixo será mostrado que a produção do casulo em R. americana* representa um modêlo interessante para o estudo da origem das proteínas do adulto durante a metamorfose e quais objetivos dentro dêsse estudo se pretende atingir especìficamente com esta tese. Antes disso, porém, será conveniente um comentário breve a respeito dos conhecimentos atuais sôbre o contrôle hormonal do desenvolvimento dos insetos, origem das proteínas do inseto adulto e sôbre a química de casulos e sêdas naturais.

---

* Rhynchosciara americana Wiedemann, 1821 (Diptera Nematocera Sciaridae), foi redescrita por NONATO & PAVAN (1951) como angelae e essa denominação foi usada em numerosas publicações até ser demonstrada sua sinonímia com americana por BREUER (1969).

2. CONTROLE HORMONAL DO DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS

O estudo da regulação hormonal do desenvolvimento pós-embrionário dos insetos foi iniciado há mais de 50 anos. Os esforços conjugados de numerosos pesquisadores, permitiram estabelecer na década de 50 um modêlo, hoje clássico, dessa regulação. Posteriormente êste modêlo foi ampliado para todos os insetos e enriquecido de detalhes porém sem nenhuma alteração substancial. As pesquisas básicas que levaram à proposição dêsse modêlo foram revistas minuciosamente por vários autores (p. ex.,GILBERT, 1964; SCHNEIDERMAN & GILBERT, 1964; WIGGLESWORTH, 1964;NOVÁK,1966; HERMAN, 1968; WIGGLESWORTH, 1970) e não serão apreciadas aqui. O modêlo clássico da regulação hormonal dos insetos pode ser resumido como segue abaixo.

As células neurossecretoras localizadas no "pars intercerebralis" secretam o "hormônio cerebral", que se acumula nas "corpora cardiaca", de onde se difunde para a hemolinfa, estimulando as glândulas protoráxicas a secretar a ecdisona (hormônio da muda). Sob influência dêste hormônio o processo de muda se inicia. O nível de hormônio juvenil, que é produzido nas "corpora allata", determina o tipo de muda. A presença de um título elevado de hormônio juvenil e ecdisona resulta em muda larva-larva; um decréscimo no título de hormônio juvenil leva à muda larva-pupa em Holometabola e as mudas para adulto ocorrem quando ecdisona está presente, mas o hormônio juvenil ausente.

Depois de estabelecido o modêlo descrito acima, grande esfôrço foi realizado na identificação química dos três hormônios envolvidos. Graças aos trabalhos de vários pesquisadores, entre os quais se destacou KARLSON, a ecdisona foi cristalizada, identificada como sendo um esteróide e essa identificação foi confirmada por síntese. Estas descobertas foram amplamente revistas por KARLSON & SEKERIS (1966). Mais tarde foi identificado nas preparações de ecdisona um componente presente em menores quantidades, com atividade similar à ecdisona, ao qual se denominou inicialmente de β-ecdisona e que, após a determinação de sua estrutura, verificou-se tratar-se da 20-hidroxi-ecdisona. Esta substância foi demonstrada ser idêntica ao composto denominado ecdisterona e ao hormônio da muda de crustáceos, a crustecdisona(WIGGLESWORTH,1970).

A identificação do hormônio juvenil de extratos de Hyalophora cecropia como um derivado terpenóide foi realizada por RÖLLER et alii (1967) e sua confirmação por síntese por DAHM, TROST & RÖLLER (1967).

A natureza química do hormônio cerebral ainda está mal definida, embora resultados recentes indicam tratar-se de um peptídeo ou proteína de baixo pêso-molecular e que talvez seja formado por várias espécies de proteínas ou polipeptídeos (Cf. WIGGLESWORTH, 1970).

Além dos três hormônios mencionados acima são conhecidos numerosos outros, mas como não estão diretamente envolvidos no contrôle do desenvolvimento e metamorfose, não serão discutidos aqui. Os conhecimentos existentes sôbre êsses hormônios foram revistos por: GILMOUR (1965), NOVÁK (1966), WIGGLESWORTH, (1970), LAW & REGNIER (1971).

O modo de ação dos hormônios morfogenéticos dos insetos tem sido muito estudado. Entre êles o melhor estudado é aquêle da ecdisona e nêsse sentido merecem uma ênfase especial os estudos realizados em glândulas salivares de Diptera. Estas glândulas, possuem cromossomos politênicos que apresentam um padrão de "puffs" (expansões globulares dos cromossomos politênicos) que são típicos do estágio de desenvolvimento do inseto, assim como, do tecido em que se encontram (Cf. BREUER & PAVAN, 1955; BEERMAN, 1956). Êsses "puffs" cromossômicos parecem representar gens em atividade (BEERMAN, 1963) e alguns "puffs" podem ser induzidos especìficamente por injeção de ecdisona em larvas de Chironomus (CLEVER & KARLSON, 1960). Essa indução de "puffs" cromossômicos pela ecdisona parece ocorrer mesmo nas condições normais de desenvolvimento larval. Isso foi demonstrado pelo fato de larvas de Drosophila divididas em dois compartimentos por uma ligadura apresentar um padrão de "puffs" da época de formação do pupário, sòmente nos cromossomos de células das glândulas salivares presentes no mesmo compartimento que contém as glândulas protoráxicas. Por outro lado implantes de glândulas salivares de pré-pupas de Drosophila em larvas de último estádio revertem a um padrão de "puffs" correspondente à época do início da formação do pupário (BECKER, 1962). Mais recentemente AMABIS &

CABRAL (1970) mostraram, em experimentos similares aos de BECKER (1962), que os "puffs" da glândula salivar de R. americana também devem estar sob contrôles hormonal.

KARLSON e colaboradores conseguiram, em uma série de trabalhos, mostrar que ecdisona injetada em larvas de Calliphora erythrocephala dirige-se ao núcleo das células epidérmicas, onde induz a síntese preferencial de RNAs mensageiros para a síntese de dopa descarboxilase (EC 4.1.26), enzima chave para o início do processo de esclerotização na formação do pupário e, baseando-se nêsses resultados e nos discutidos anteriormente, propuseram um modêlo para o mecanismo de ação da ecdisona (ver revisão em KARLSON & SEKERIS,1966). Êste modêlo consiste em assumir um mecanismo de regulação das células de insetos similar ao proposto por JACOB & MONOD para bactérias e o papel da ecdisona seria combinar-se com repressores específicos, liberando secções específicas do DNA para transcrição. Êsse modêlo apresenta várias dificuldades, entre elas a não indução de síntese de dopa descarboxilase (EC 4.1.26) na pupa de Calliphora, quando há elevação do título de ecdisona, o que torna mais provável admitir que a ação da ecdisona sôbre o material genético seja mais complexa que a proposta por KARLSON & SEKERIS (1966), dependendo do tecido e do seu estágio de desenvolvimento (ver discussão mais ampla em WIGGLESWORTH, 1970).

O hormônio juvenil parece agir sôbre o metabolismo de ácidos nucléicos, embora não exista ainda informação precisa sôbre o seu mecanismo (SLÁMA, 1971).

Os estudos de endocrinologia de insetos descritos acima, além de terem permitido o estabelecimento de um excelente modêlo para estudo da regulação hormonal da expressão genética,que é o desenvolvimento dos insetos, estão fadados a criarem as bases de uma revolucionária tecnologia de combate aos insetos daninhos. Esta tecnologia está assentada no fato do hormônio juvenil impedir o desenvolvimento da pupa em adulto. Assim, pupas de insetos submetidas ao contato, ou mesmo vapores do hormônio juvenil, acabam morrendo por não serem capazes de se desenvolverem até adultos ou, caso se desenvolvam, originam adultos estéreis (SLÁMA, 1971).

Intensas pesquisas estão sendo realizadas atualmente no sentido de se conseguir uma síntese química econômica de análogos do hormônio juvenil, químicamente estáveis e altamente ativos, e assim criar uma nova geração de inseticidas que não tenham efeitos tóxicos sôbre as plantas e animais, incluíndo o homem, mas que sejam altamente eficazes contra os insetos (SLÁMA 1971; CRUICKSHANK e PALMERE, 1971). Os análogos do hormônio juvenil possuem, entretanto, uma desvantagem em relação aos inseticidas porque, enquanto êstes matam os insetos em poucas horas, os análogos do hormônio juvenil simplesmente impedem a reprodução da praga. Em compensação, os análogos do hormônio juvenil agem em pequeníssimas quantidades, o que permitirá uma poluição ambiental bem menor do que ocorre com os inseticidas atuais, além do fato de alguns análogos do hormônio juvenil terem ação seletiva contra determinados insetos daninhos (SLÁMA, 1971). Recentemente uma firma industrial foi constituída com o exclusivo propósito de desenvolver essa nova geração de inseticidas que ela denominou "Entocon" (Cf. boletins técnicos da Zoecon Corporation 975 California Avenue, Palo Alto, Califórnia 94304).

3. ORIGEM DAS PROTEÍNAS DO INSETO ADULTO

A origem das proteínas do inseto adulto é um dos problemas bioquímicos mais fundamentais da metamorfose dêstes organismos. A maneira mais simples de considerar o problema (levando em conta o fato de que a pupa e o adulto farato são sistemas fechados que trocam apenas gases com o meio ambiente), é admitir que as proteínas larvais são hidrolizadas paulatinamente durante a histólise dos tecidos larvais, desde o início do estágio pupal, e que concomitantemente as proteínas do adulto são sintetizadas "de novo" a partir de aminoácidos livres nos tecidos imaginais em desenvolvimento. Visto assim, esquemàticamente a solução do problema se resumiria na demonstração de como é feita a repressão paulatina dos sistema genéticos responsáveis pela síntese das proteínas larvais e a indução daquêles sistemas envolvidos na síntese das proteínas imaginais, assim como, do mecanismo de contrôle da hidrólise das proteínas larvais. Existem, entretanto, algumas evidências a indicar que o processo poderia ser

mais complexo, envolvendo a utilização de proteínas larvais na formação das proteínas do adulto sem hidrólise prévia.

As considerações acima mencionadas passaram a serem feitas com base experimental ao se verificar o papel das proteínas da hemolinfa na vitelogênese. Êste estudo iniciou-se quando TELFER (1954) mostrou que uma proteína de hemolinfa é tomada pelos ovócitos em desenvolvimento e usada diretamente na constituição do vitelo em Hyalophora (Lepidoptera). Resultados similares foram obtidos por numerosos autores em diferentes ordens de insetos, mostrando que o fenômeno é geral em insetos (Coleoptera: De LOOF e WILDE, 1970. Dictyoptera: ADIYODI, 1967; NIELSEN e MILLS, 1968. Orthoptera: HILL, 1962. Diptera: STRANGWAYS-DIXON, 1962; ORR, 1954a, b). O contrôle hormonal dêsse processo foi estudado principalmente em Orthoptera, onde as células neurossecretoras do protocérebro estão implicadas no estímulo à síntese de proteínas da hemolinfa pelo corpo gorduroso, enquanto que a "corpora allata" estimula a tomada pinocitótica dessas proteínas pelos ovócitos em desenvolvimento (TELFER, 1965). Estudos realizados em outras ordens de insetos mostraram, entretanto, que pode haver variações no mecanismo proposto em Orthoptera, havendo uma alteração na importância relativa das células neurossecretoras e "corpora allata" na vitelogênese, conforme o inseto estudado (WIGGLESWORTH, 1970).

As proteínas da hemolinfa, além de serem utilizadas na constituição do vitelo, são tomadas por um processo pinocitótico para vários outros órgãos, no início da pupação (LOUGHTON e WEST 1965; LOCKE e COLLINS, 1966, 1967; TOBE e LOUGHTON, 1969; CHIPPENDALE e KILBY, 1969) onde forneceriam aminoácidos para a síntese "de novo" de proteínas imaginais (LOCKE e COLLINS, 1966, 1967) e/ou transportariam nutrientes essenciais que lhes estão conjugados como: carboidratos, lipídeos ou cromóforos (LOUGHTON e WEST, 1965). Alguns resultados sugerem que a tomada pelos tecidos, pelo menos no caso do corpo gorduroso em Lepidoptera, seria estimulada pela ecdisona (COLLINS, 1969).

Os trabalhos referidos acima sôbre metabolismo de proteínas durante a metamorfose dão uma idéia apenas qualitativa dos fenômenos envolvidos. Um estudo quantitativo dêsse metabolismo foi realizado por BOYD e MITCHELL (1966). Êstes autores

injetaram proteínas da hemolinfa prèviamente marcadas em larvas de Drosophila melanogaster e verificaram que o seu "turnover" era bastante elevado, o que os levou a propor que as proteínas da hemolinfa seriam intermediários importantes pelos quais passaria a maior parte do "turnover" protéico total do inseto em metamorfose. Uma situação completamente diferente foi encontrada em Phormia regina por CHEN e LEVENBOOK (1966). Êstes autores injetaram proteínas marcadas da hemolinfa em larvas, pupas e adultos de Phormia regina e verificaram que a velocidade de degradação das proteínas era sempre baixa e demonstraram também que a injeção de proteínas da hemolinfa marcadas em larvas maduras de Phormia regina pouco antes de puparem levava à recuperação de 3/4 da radioatividade total em proteínas nos tecidos do adulto. A partir dêsse resultado propuseram que as proteínas da hemolinfa passavam para os tecidos e eram em seguida usadas intactas na formação das estruturas do adulto. Essa proposição foi criticada por WYATT (1968) que argumentou que não é necessário admitir a transformação direta de proteínas da hemolinfa (ou outras proteínas larvais) em proteínas do adulto para explicar os resultados obtidos, bastando admitir que as proteínas tomadas pelos tecidos seriam ali degradadas e os aminoácidos resultantes permaneceriam dentro dos tecidos, onde seriam ràpidamente utilizados na ressíntese protéica.

DINAMARCA e LEVENBOOK (1966) medindo a incorporação de alanina e lisina durante a metamorfose de Phormia regina, estimaram a síntese protéica "de novo" durante a sua metamorfose em apenas 2% do total das proteínas do adulto. Embora êsse cálculo esteja baseado na hipótese simplificativa de que o "pool" de áminoácidos é homogêneo em todo o inseto,os autores sugeriram, de forma similar a CHEN e LEVENBOOK (1966), que uma parte das proteínas larvais seria conservada intacta no adulto sem degradação e ressíntese.

Devido às dificuldades envolvidas no estudo do metabolismo de proteínas durante a metamorfose, como pode-se avaliar dos trabalhos comentados acima, seria interessante o uso de técnicas mais refinadas, envolvendo o isolamento de proteínas específicas de tecidos individuais e o seu acompanhamento durante a metamorfose. Dentro dêsse prisma são muito interessantes os estudos relacionados com a califorina.

Califorina é uma proteína isolada de Calliphora erythrocephala, sintetisada pelo corpo gorduroso larval, armazenada principalmente na hemolinfa e que corresponde a 60, 40 e 10% das proteínas extraíveis de insetos com 4 dias após a eclosão, 2 dias após a formação do pupário e 3 dias após a emergência do adulto, respectivamente, indicando que deve ser uma proteína de armazenamento usada na formação dos tecidos imaginais (MUNN, FEINSTEIN e GREVILLE, 1967; MUNN, PRICE e GREVILLE, 1969; MUNN e GREVILLE, 1969).

A presença de califorina foi pesquisada em outros insetos, utilizando-se técnicas imunológicas e os resultados indicam a ocorrência de reações de identidade completa ou parcial em 4 gêneros de outros Diptera Cyclorrhapha, de identidade parcial em 4 gêneros de Brachycera, apenas uma reação de identidade parcial em 3 gêneros de Nematocera e nenhuma reação em insetos de ordem diferente de Diptera, embora ocorressem partículas semelhantes (ao microscópio eletrônico) à califorina em várias espécies de insetos, especialmente Lepidoptera (MUNN e GREVILLE, 1969). Êsses resultados sugerem a ocorrência generalizada de proteínas do tipo da califorina, que seriam armazenadas principalmente na hemolinfa e mais tarde seriam tomadas pelos tecidos no início da pupação (como discutido acima) e, após hidrólise, forneceriam os precursores para a síntese das proteínas do adulto. Essas proteínas poderiam então ser vistas como uma grande reserva de aminoácidos, que ocorreriam na forma de proteínas e não livres, para evitar aumentar a osmolaridade do animal.

Embora os estudos com a califorina indiquem claramente a existência em vários insetos de proteínas larvais com função de simples reserva aminoácidos, não excluem a possibilidade da ocorrência de proteínas larvais que permaneçam intactas no adulto, como comentado anteriormente.

A utilização de proteínas larvais específicas, sem hidrólise prévia, é demonstrada nos dois trabalhos que serão comentados a seguir.

LAUFER e NAKASE (1965) na base de estudos imunoquímicos e radioautográficos propuseram que a maioria das proteínas

da secreção da glândula salivar de Chironomus tentans não são ali sintetizadas, mas são sequestradas da hemolinfa. Êsses resultados foram confirmados e a evidência a seu favor extendida pelo estudo das proteínas da hemolinfa e glândula por eletroforese de disco em gel de poliacrilamida, por estudos imunológicos da secreção salivar e por experimentos de incorporação de aminoácidos marcados realizados por DOYLE e LAUFER (1969).

Os resultados evidenciam que o processo de secreção salivar em Chironomus envolve o sequestro de proteínas da hemolinfa de forma similar àquela que ocorre durante a vitelogênese. Duas diferenças importantes devem ser, entretanto, assinaladas. A primeira delas é que o sequestro de proteínas da hemolinfa na formação da secreção salivar tem que ser específico, afim de assegurar que as propriedades químicas e físicas dessa secreção sejam as mesmas, enquanto que na vitelogênese isso não é tão necessário, porque o papel das proteínas sequestradas parece ser o de compor uma reserva de aminoácidos para o desenvolvimento do futuro embrião (geralmente uma proteína é tomada específicamente, enquanto que as outras são tomadas com menor especificidade, Cf. TELFER, 1965). A outra diferença notável é que a secreção é produzida e utilizada na confecção do casulo em que vive a larva do Chironomus enquanto, êle ainda está se alimentando (SÉGUY, 1951; IMMS, 1957), não há necessidade, portanto, dêle lançar mão de suas reservas, como ocorre na vitelogênese que se realiza na vida pupal ou no imago recém emergido.

Essa mesma diferença entre a formação da secreção em Chironomus e a vitelogênese é também um obstáculo na consideração dessa formação como um modêlo da produção das proteínas imaginais porque, diferentemente destas, a secreção é formada enquanto as larvas estão se alimentando e em um ambiente hormonal muito distinto daquele em que se inicia a formação das proteínas imaginais.

4. SÊDAS E CASULOS

As sêdas, definidas como um material fibroso secretado por certas espécies de Insecta e Arachnida (SEIFTER e GALLOP, 1966), apresentam vários tipos estruturais conhecidos. Segundo RUDALL (1962) é possível distinguir pelo menos 3 tipos principais de sêdas. Existem sêdas que são constituídas principalmente por fibroína (comum em Lepidoptera), colágeno (ocorrem em Hymenoptera) ou quitina (observado em Dictyoptera). Os estudos dêsse último tipo foram realizados apenas com difração de raios-X, mas revelam a existência de um componente protéico associado à quitina que deve-se asemelhar à proteína cuticular (RUDALL, 1962).

Um quarto e um quinto tipo de sêda foram reconhecidos mais tarde em Neuroptera cujos componentes principais são: um composto do tipo cuticulina e uma poliglicina, respectivamente (RUDALL e KENCHINGTON, 1971).

As sêdas melhor estudadas são aquelas constituídas principalmente de β-fibroína e produzidas por Lepidoptera. Análises de aminoácidos realizadas em fibroínas de 74 Arthropoda, principalmente Lepidoptera, mostraram que o conteúdo molar de aminoácidos pequenos (alanina, glicina e serina) varia entre 46,2 e 94,6% do total (LUCAS, SHAW e SMITH, 1958, 1960) o que explica uma série de características típicas de difração de raios-X que apresentam, e sua conformação β com cadeias polipeptídicas antiparalelas.

Além da conformação β, outras conformações foram reconhecidas nas fibroínas, usando difração de raios-X: conformação α, observada em Hymenoptera e "cross-β" em alguns Hymenoptera e em Arachnocampa luminosa (Diptera). O primeiro tipo de conformação referido permitiu a demonstração de outro caso de transição de conformação α para β por estiramento, além da queratina e o segundo forneceu o primeiro caso conhecido de transformação "cross-β" para β-paralela (RUDALL e KENCHINGTON, 1971).

Análises de aminoácidos realizadas nas sêdas com constituição diferente das β-fibroínas já referidas, permitiram uma melhor compreensão das sêdas tipo colágeno, poliglicina, fibroína,

"cross-β" e α-fibroína. As sêdas do tipo colágeno se caracterizam por um alto conteúdo de glicina, prolina e pela ocorrência de hidroxilisina; aquelas de tipo poliglicina apresentam cêrca de 66% dos aminoácidos como glicina; α-fibroínas mostram um conteúdo de glicina baixo e um alto conteúdo de aminoácidos ácidos em relação às β-fibroínas e por fim, as sêdas do tipo "cross-β" caracterizam-se por um alto conteúdo de serina que chega a 43% do total (LUCAS e RUDALL, 1968).

Os estudos sôbre as proteínas da sêda tiveram e têm importante papel no conhecimento da conformação de proteínas, além da contribuição ao conhecimento dos produtos naturais de insetos. Os trabalhos de MEYER e MARK (1928) em fibroína da sêda estabeleceram o conceito de cadeias polipeptídicas completamente extendidas, além de fortalecer a visão das proteínas como cadeias longas de α-aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Os trabalhos de MARSH,PAULING e COREY (1955a, b) com o mesmo material foram importantes, no estabelecimento do conceito da fôlha pregueada em estrutura protéica. A sêda rara de Chrysopa permitiu a demonstração da existência da conformação protéica "Cross β" e da transição "Cross β" ——>β-paralela (PARKER e RUDALL, 1957). Por fim a sêda de Nematus ribesii, permitiu a demonstração de proteínas com conformação de colágeno sem apresentar, entretanto, hidroxiprolina na molécula (LUCAS e RUDALL, 1968; RUDALL e KENCHINGTON, 1971).

Os resultados acima referidos levaram RUDALL (1962)a afirmar que as proteínas da sêda representam modêlos biológicos, convenientes para o estudo dos mecanismos evolucionários envolvidos nas transições de conformação de proteínas, além de ilustrar tipos intermediários de proteínas estruturais entre o colágeno e o grupo das proteínas fibrosas afins formado pela queratina, miosina, epidermina e fibrinogênio.

Os componentes não protéicos da sêda foram pouco estudados, como pode-se ver pelo fato das hexosaminas só terem sido determinadas na sêda de Bombyx mori, que é a sêda mais estudada, em 1965 (SMITH e CLARK, 1965).

Além da sêda, os casulos de insetos podem conter também sais, geralmente originados dos túbulos de Malpighi. Êsses

sais podem ser de oxalato de cálcio(OHNISHI et alii, 1968) ou carbonato de cálcio (CLARK, 1958; WIGGLESWORTH, 1965).

5. FINALIDADES DÊSTE TRABALHO

O estudo da origem das proteínas imaginais seria muito facilitada se fôsse conhecida alguma estrutura do adulto formada por um pequeno número de proteínas, porém presentes em massa suficiente, para poderem ser isoladas, caracterizadas e ter a sua origem traçada com segurança ao longo da metamorfose. No desconhecimento de uma estrutura imaginal com as características descritas, seria talvez proveitosa a utilização de um modêlo.

Um modêlo adequado parece ser a produção do casulo por R. americana. Êsse casulo possui uma massa considerável, deve possuir um número pequeno de proteínas e é feito depois que a larva parou de comer. Como a glândula salivar da larva não possui um reservatório para acúmulo de secreção, com a qual é feita pelo menos em parte o casulo, essa tem de ser sintetizada a partir das reservas do animal, Portanto, esta síntese dá-se de forma análoga àquela que ocorre durante a metamorfose, quando o animal sintetiza tôdas as proteínas imaginais a partir de reservas (não importa de que origem), porque nesta ocasião o inseto é um sistema fechado. A produção das proteínas da secreção, ainda de forma análoga àquela na metamorfose, deve ser específica a fim de manter inalteradas as propriedades físicas, químicas e biológicas do casulo.

Um outro aspecto importante do modêlo em questão é a produção do casulo ter início no fim do estágio larval, no começo da metamorfose, em ambiente hormonal similar àquele em que tem início a produção das proteínas imaginais (ver ítem 1,acima). Êste aspecto é muito importante porque, considerando-se a metamorfose um tipo particular de polimorfismo (ver ítem 1), onde os sistemas genéticos da larva, pupa e adulto seriam ativados um após o outro pelo ambiente hormonal interno do animal, se houvesse uma diferença muito grande entre a cronologia da produção do casulo e do início da formação das proteínas imaginais,o que não acontece neste caso, isso poderia corresponder também a um ambi-

ente hormonal muito distinto e, provàvelmente, implicaria em processos radicalmente diferentes.

A produção do casulo em R. americana é feita de forma sincrônica e coordenada por larvas oriundas de uma mesma postura e sujeitas às mesmas condições ambientais, o que garante a possibilidade de se estudar larvas em diferentes estágios do desenvolvimento, apresentando um mínimo de variações individuais. Além do mais, a correlação de resultados é facilitada pela existência de um método de datar fisiològicamente as larvas, após o início da produção do casulo, baseado nos "puffs" cromossômicos das glândulas salivares (GUARACIABA e TOLEDO, 1967) que foi ligeiramente reformulado nesta tese (ver Métodos). Como êsses "puffs" são regulados por hormônios, assim como todo o desenvolvimento larval, conforme foi comentado no ítem 2 acima, o referido método de datação é extremamente adequado. E' importante acrescentar ainda o fato de que todos os estudos bioquímicos do desenvolvimento de R. americana são facilitados, em relação aos demais insetos Holometabola, com exceção de Lepidoptera, devido ao tamanho de sua larva, que permite com relativa facilidade o estudo de órgãos isolados por dissecção. A dificuldade de se estudar órgãos isolados em larvas da maioria dos Holometabola é a responsável pela incidência maior dêsses estudos em Lepidoptera, que possuem larvas maiores que as encontradas nas demais ordens de insetos (Cf. WYATT, 1968).

Em vista de tôdas as características comentadas acima, a produção do casulo por R. americana representa, provàvelmente, um modêlo mais promissor para o estudo da formação das proteínas imaginais do que a formação da secreção salivar em Chironomus e a vitelogênese referidos no ítem 3, acima.

A intenção básica dêste trabalho é contribuir para o estudo da origem das proteínas do inseto adulto, utilizando como modêlo a produção do casulo coletivo por larvas de R. americana. Entretanto, devido à carência quase abosluta de dados fisiológicos e bioquímicos fundamentais em R. americana durante essa produção, êste trabalho orientou-se mais específicamente para a obtenção dêstes dados. Com êsse objetivo, dois tópicos principais foram selecionados para estudo:

a) a composição química da hemolinfa ao longo do desenvolvimento larval;

b) composição química do casulo coletivo e suas alterações durante a sua produção.

Ênfase foi dada ao estudo da hemolinfa por várias razões:

a) a hemolinfa corresponde a porção considerável do animal (37% do seu pêso-úmido, 26% de seu pêso-sêco) e é fácil de se obter;

b) a hemolinfa deve refletir as principais alterações bioquímicas dos tecidos, porque os insetos possuem um sistema de circulação aberto, em que o único fluído corpóreo é a hemolinfa e sòmente através da qual muitos órgãos podem trocar compostos entre si;

c) a participação da hemolinfa em muitos eventos bioquímicos no final da vida larval já foi documentada em vários insetos (WYATT, 1961; WYATT, 1968; ver também ítem 3), o que abre a possibilidade dela participar na produção do casulo de R. americana.

O estudo químico da hemolinfa foi feito com mais detalhe em larvas no fim da vida larval, pouco antes de iniciarem a produção do casulo (idade de 45-48 dias, quando mantidas a 20°C) porque nessa ocasião o volume de hemolinfa é maior.

O conhecimento da composição do casulo orienta a pesquisa sôbre a origem de seus componentes e eventualmente sôbre o mecanismo e regulação de sua síntese. Além disso, devido ao fato do casulo ser constituído pelo menos em parte por sêda, sua composição química apresenta um elevado interêsse, conforme foi chamado a atenção no ítem 4 acima. Êste interêsse ainda é mais acentuado porque êsse tipo de produto natural foi muito pouco estudado em Diptera, se fôr excluído o trabalho de GROSSBACH (1969), realizado com a secreção salivar de duas espécies de Camptochironomus. Nêste caso a secreção é responsável pela pro-

dução de um fio, semelhante à sêda, que prende partículas de vários materiais, formando um tubo no interior do qual permanece a larva dêsse animal, não se constituindo, portanto, em um casulo verdadeiro, em contraste com o que ocorre em R.americana, porque o tubo não é constituído inteiramente de secreções do animal (SÉGUY, 1951; IMMS, 1957).

MÉTODOS

1. Cultura de Rhynchosciara

Rhynchosciara americana (Diptera Nematocera Sciaridae) foi cultivada nas condições prèviamente descritas por LARA, TAMAKI e PAVAN (1965). Só foram utilizadas larvas de um mesmo sexo em tôdas as determinações para simplificar a interpretação dos resultados. O sexo utilizado foi sempre o feminino devido ao seu tamanho maior.

2. Determinação da idade fisiológica larval

O presente trabalho procura entre outras coisas o correlacionamento de eventos fisiológicos com alterações químicas em alguns tecidos. Torna-se imperioso então a utilização de métodos adequados para a comparação de resultados obtidos em larvas oriundas de grupos de postura diferentes. Embora a comparação por idade cronológica seja a mais fácil de ser realizada, não é a mais adequada, mesmo em animais submetidos a idênticas condições de cultura. Pequenas diferenças na velocidade de desenvolvimento em grupos da mesma idade cronológica são frequentemente observadas. De maneira geral essas pequenas diferenças não são de importância, entretanto, em alguns casos, nos quais se incluem muitos daquêles descritos nesse trabalho, essas diferenças podem levar a resultados de interpretação difícil.

Um método de datação fisiológica para R. americana foi desenvolvido por GUARACIABA e TOLEDO (1967) para o 4º estádio, o qual corresponde a 70% da vida larval e onde ocorrem os principais e mais visíveis eventos larvais. Abaixo será apresentado o ciclo vital de R. americana afim de facilitar as discussões posteriores e uma tabela das subdivisões do 4º estádio segundo GUARACIABA e TOLEDO (1967) com modificações baseadas em observações feitas durante a realização desta tese. A notação aqui apresentada será empregada em tôda a extensão dêste trabalho.

As fêmeas de R. americana põem de 1500 a 2000 ovos que eclodem cêrca de 13 dias após a postura, a 20°C. As mudas larvais ocorrem aos 7, 13 e 21 dias após a eclosão, enquanto que a muda pupal e a emergência do adulto se dão aos 64 e 70 dias respectivamente. A postura das fêmeas fecundadas inicia-se aos 75 dias. A Tabela I descreve os principais eventos fisiológicos do 4º estádio e a nomenclatura usada para a sua datação. De maneira geral, os eventos fisiológicos descritos (mudança de côr, início da produção de casulo, etc.) oscilam em tôrno da cronologia apresentada nessa tabela de cêrca de 1 a 2 dias. Essa cronologia corresponde a animais se desenvolvendo a 20°C.

Algumas observações quanto à terminologia empregada devem ser feitas, em relação à tabela I. O têrmo "apólise" usado aqui corresponde ao descolamento das células epidérmicas do exoesqueleto antigo, como propôsto por JENKIN e HINTON (1966). Muda será entendida aqui como o processo pelo qual o inseto se despe da cutícula antiga.

Pupa farata corresponde à pupa fechada no interior da cutícula do último estádio larval, como foi comentado no rodapé da introdução (p. 3). A pupa farata é formada, portanto, após a última apólise larval e é chamada também, muitas vêzes, pelo têrmo menos preciso de pré-pupa.

A expressão larva madura que será usada frequentemente nesta tese, refere-se, à larva que atingiu o seu máximo desenvolvimento, isto é, uma larva que está no fim do 2º período (cêrca de 45-48 dias de idade).

GUARACIABA e TOLEDO (1967) reportaram a existência de uma muda entre o 5º período e a muda pupal. Entretanto, nenhuma muda verdadeira parece ocorrer nesse intervalo de tempo; os autores devem estar chamando de muda à última apólise larval referida acima.

Outras informações sôbre a biologia de R. americana podem ser encontradas em DREYFUS et alii (1951) e GUARACIABA e TOLEDO (1967).

TABELA I

Subdivisão do 4º estádio de R. americana

Idade Cronológica aproximada (dias)	Eventos Fisiológicos ou Aparência da larva	Correspondente ao início do período
21	3ª muda larval, larvas claras	1º
32	Larvas começam a se tornarem avermelhadas	2º
49	Larvas iniciam a tecer o casulo	3º
54	Início da formação do "puff" B-2 da glândula salivar. Casulo consistente	4º
57	Máximo desenvolvimento do "puff" B-2 larvas quietas, em posição curva	5º
58	Máximo desenvolvimento do "puff" C-3. Larvas curvas, mas já envolvidas por células individuais do casulo	6º
59	Última apólise larval. Túbulos de Malpighi livres de $CaCO_3$	Pré-Pupal (pupa farata)
61-64	Muda pupal	

3. Coleta de hemolinfa

As larvas eram lavadas com água, dispostas sôbre gêlo picado para ficarem imóveis, sêcas em papel de filtro e em seguida picadas na porção terminal do abdome com um estilete. A hemolinfa era recolhida em tubos de centrífuga mantidos em gêlo. Após centrifugação a 3.200g a $4^{o}C$, para sedimentar hemocitos e fragmentos tissulares, a hemolinfa sobrenadante era usada nas determinações químicas.

Para a determinação de compostos ninhidrina-positivos, a hemolinfa era recolhida sôbre cristais de feniltiouréia colocados nos tubos de centrífuga a fim de inibir a atividade da tirosinase (EC 1.10.3.1) endógena (LEVENBOOK, 1966). Nas determinações de metais, o estilete usado para picar a larva era de vidro e tôda a vidraria usada era prèviamente lavada extensivamente com H_2SO_4, HCl e água bidestilada e deionizada.

4. Determinação do volume ocupado pelos hemocitos na hemolinfa

Hemolinfa coletada com todo o cuidado para evitar contaminação com fragmentos tissulares e sem ser centrifugada foi aspirada para capilares de 25 µl ("disposable micropipettes", DRUMOND Microcaps), conservando-se cêrca de 4 mm de altura não preenchidos. Por êsse lado, os capilares foram selados em lâmpada a álcool e em seguida, centrifugados envolvidos por algodão, em cabeças de centrífuga com tubos basculantes. Foram usadas rotações correspondentes a 1500g ou 3200g com resultados idênticos. A medida da altura do capilar ocupado pela hemolinfa e a altura da calota ocupada pelos hemocitos, realizada sob uma lupa esteroscópica, permitia calcular o volume de hemolinfa no capilar e o volume de hemocitos correspondente a essa hemolinfa. Êsses dois resultados permitiram calcular fàcilmente o volume porcentual ocupado pelos hemocitos na hemolinfa.

5. Métodos de estudo da coagulação e escurecimento da hemolinfa

Cinco capilares de 15 µl ("disposable micropipettes", DRUMMOND Microcaps) foram preenchidos com hemolinfa total e cinco outros preenchidos com hemolinfa centrifugada de larvas de 2º P, 45 dias de idade. Após 1, 2, 5, 10 e 15 horas, os capilares eram observados quanto à côr, presença de sedimentos e fluidez. Paralelamente eram feitas observações similares em um tubo de ensaio com cêrca de 0,5 ml de hemolinfa total.

6. Determinação da osmolaridade, densidade, volume e pêso-sêco da hemolinfa

As determinações de osmolaridade foram tôdas realizadas utilizando-se o método crioscópico em um Fiske Osmometer, gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Malnic.

A densidade foi sempre determinada pesando-se "disposable micropipettes" (Drummond Microcaps) de 15 µl com e sem hemolinfa. Os desvios observados entre as determinações foram inferiores a 1%.

Os volumes de hemolinfa foram todos determinados pelo método de exanguinação (RICHARDSON, BURDETTE e EAGLESON, 1931). O método de diluição de corante (PRICE, 1961) foi também, tentado, produzindo-se nos casos favoráveis (larvas jovens), resultados muito semelhantes aos de exanguinação como pode ser visto em resultados (Tabela XVII). Êsse método foi entretanto abandonado porque em larvas maduras os resultados variavam muito dependendo do intervalo de tempo entre a injeção e a coleta de hemolinfa. Essa variabilidade deve ser consequência de excreção do corante pelos túbulos de Malpighi, como demonstrado em Schistocerca gregaria por LEE (1961). Como nenhuma excreção de corante foi observada em larvas jovens isso parece sugerir que a eliminação de corante varia com a idade e que portanto, seria necessário determinar cuidadosamente os tempos máximos a serem usados entre injeção de corante e coleta de hemolinfa para cada idade. Em vista disso preferiu-se utilizar sòmente o método de exanguinação.

A massa de sólidos da hemolinfa foi obtida aquecendo-se amostras de hemolinfa centrifugada a 80°C até atingir pêso constante.

7. Determinação de pO_2, pCO_2, pH e HCO_3^- na hemolinfa

Amostras de hemolinfa foram colhidas picando-se as larvas, limpas como descrito anteriormente, sob uma espêssa camada de óleo de parafina. Essas amostras foram em seguida utilizadas para a determinação anaeróbica de pO_2, pCO_2 e pH em um "pH/Gas Analyser Model 113" da "Instrumentation Laboratory Inc., Boston, Massachusetts", cedido pelo Dr. Herval P. Ribeiro. Tôdas essas determinações foram realizadas com o aparelho termoestatisado a 37°C.

As concentrações de HCO_3^- foram calculadas a partir das determinações de pH e pCO_2 usando a equação abaixo, assumindo-se que as constantes a e pK são idênticas na hemolinfa e plasma sanguíneo humano. Neste os valores de a e pK são 0,0310 e 6,10 respectivamente, a 37°C, quando HCO_3^- é medido em milimoles por litro e pCO_2 em milímetros de mercúrio (DAVENPORT, 1958).

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{a(pCO_2)}$$

O pH de hemolinfa coletada como descrito acima foi medido a 25°C, em condições anaeróbicas, usando um microeletrodo de vidro de um "Metrohm Herisau pH Meter", gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Malnic.

8. Determinações químicas na hemolinfa

Aminoácidos e peptídeos livres serão discutidos separadamente no ítem 9.

α-amino-N total-ácido solúvel. Amostras de 80 μl de hemolinfa foram adicionadas a 0,72 ml de NaCl 0,1M e centrifugada a 4500g por 10 minutos, para a remoção de hemocitos. Juntou-se 0,5ml de $HClO_4$ 1N a 0,5ml do sobrenadante acima. Centrifugou-se 10 minutos a 11500g e lavou-se duas vêzes o sedimento com 0,5 ml de $HClO_4$ 0,5N. Os sobrenadantes reunidos foram diluídos convenientemente e usados para a determinação de α-amino N total-ácido solúvel pelo método de ROSEN (1957). A padronização foi feita com DL-leucina.

Carboidrato e trealose. Alíquotas de 0,15 ml de hemolinfa centrifugada eram reunidas com 1 ml de etanol 60% v/v, deixados a 75°C por 10 minutos e após atingir a temperatura ambiente eram centrifugadas. Após recolher o sobrenadante, o sedimento era novamente aquecido com etanol 60% v/v e centrifugado como acima. Essa operação era repetida mais uma vez. Os sobrenadantes reunidos eram diluídos convenientemente com etanol 60% v/v e alíquotas dêsses eram usadas, depois de evaporadas em estufa a 60°C para a determinação de carboidratos com reagente de antrona segundo MOKRASCH (1954). A massa de carboidratos era calculada como glicose.

O extrato alcoólico preparado acima foi usado também para o isolamento químico e determinação quantitativa de trealose de acôrdo com a metodologia de WYATT e KALF (1957).

Cloreto. Tôdas as determinações foram feitas com hemolinfa centrifugada total usando a técnica de SHALES e SHALES (1941).

Cinzas. Essas foram determinadas por incineração de amostras de 1 ml de hemolinfa centrifugada em cápsulas de platina, em mufla a 560°C, até produzir cinzas brancas.

Citrato. Foi determinado em amostras de hemolinfa centrifugada e desproteinizadas de acôrdo com ETTINGER, GOLDBAUM e SMITH Jr. (1952).

Fósforo total, inorgânico, ácido solúvel, lipídico e protéico. O método empregado para a determinação de fósforo total, inorgânico, lipídico e ácido solúvel foi aquêle descrito por CHEN, TORIBARA e WARNER (1956). As amostras para a determinação de fósforo protéico foram preparadas por duas técnicas diferentes: uma envolvendo precipitação das proteínas por TCA e outra por sulfato de amônio. A primeira preparação consistia em tomar alíquotas de 0,2 ml de hemolinfa centrifugada e adicionar 0,8 ml de TCA 10% P/V. Após a centrifugação e desprêzo do sobrenadante, o sedimento era lavado com 1 ml de TCA 5% P/V e o sobrenadante novamente desprezado. O sedimento era então suspenso em 1,5 ml de etanol-éter (3:1, v/v), aquecido à ebulição, centrifu-

gado e o sobrenadante desprezado. O último passo era repetido 3 vêzes. O sedimento era em seguida lavado com 1,5 ml de acetona e depois incinerado e usado para a determinação de fósforo pela técnica referida acima.

A determinação de fósforo protéico, envolvendo precipitação das proteínas com sulfato de amônio foi realizada tomando-alíquotas de 0,2 ml de hemolinfa centrifugada e lhes adicionando 0,6 ml de sulfato de amônio saturado (à temperatura ambiente, 23°C). Após a centrifugação e abandono do sobrenadante, o sedimento foi lavado com 1,0 ml de sulfato de amônio 75% saturado. Após nova centrifugação e desprêzo do sobrenadante, o sedimento foi suspenso em 3,8 ml de etanol-éter (3:1, v/v), aquecido até a ebulição, centrifugado e o sobrenadante, descartado. O último passo foi repetido uma vez e o sobrenadante final, após incineração, foi usado para a determinação de fósforo.

O conteúdo do fósforo protéico determinado após a preparação das proteínas por qualquer das duas técnicas descritas acima, é o mesmo.

Glicogênio. Amostras de 0,4 ml de hemolinfa centrifugada eram desproteinizadas com 0,1 ml de $HClO_4$ 2,5N. O sedimento obtido por centrifugação era lavado com 0,5 ml de $HClO_4$ 0,5N e todos os sobrenadantes reunidos. A êstes juntava-se 2,5 ml de etanol absoluto e incubava-se a preparação a 37°C por 15 minutos. Em seguida, o material era centrifugado e o sobrenadante desprezado. O sedimento era então lavado duas vêzes com 0,5 ml de etanol 80%, evaporado em estufa a 60°C e usado para as determinações de carboidratos pela reação de antrona segundo MOKRASCH (1954). A massa de glicogênio era calculada como glicose. E' possível que a fração assim isolada e determinada contenha substâncias antrona-positivas diferentes do verdadeiro glicogênio (BALMAIN,BIGGERS e CLARINGBOLD, 1956).

Lipídeos. Êstes foram isolados quantitativamente de amostras centrifugadas de hemolinfa pela técnica de FOLCH, LEE e SLOANE-STANLEY (1957) e determinados gravimètricamente, após evaporação do solvente da extração por pressão reduzida, à temperatura ambiente, até se obter pêso-constante.

Metais. A matéria orgânica de amostras de hemolinfa centrifugada com as precauções já descritas, era destruída e o material remanescente, após diluições convenientes em água bidestilada e deionizada era usado para as determinações de metais por espectroscopia de absorção atômica. Para essa finalidade foi empregado um "Atomic Spectrometer" da "Perkin-Elmer" operado pela srta Yolanda Tavares.

As determinações de sódio e potássio, entretanto, foram realizadas sem destruição prévia da matéria orgânica, por espectroscopia de chamas, em um "Flame Photometer Evans" da "Electroselenium Ltd.", gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Malnic.

Três técnicas distintas foram utilizadas para a destruição da matéria orgânica. A primeira delas consistia em incinerar a hemolinfa em cápsula de platina ou porcelana (os resultados foram idênticos) em uma mufla a 560°C até a formação de cinzas brancas. Outra técnica consistia em destruir a matéria orgânica da mesma forma que a descrita por CHEN, TORIBARA e WARNER (1956) antes de determinar fósforo total. Por fim outra técnica utilizada consistia em aplicar a hemolinfa em quadrados de papel Whatman nº1 de cêrca de 4cm de lado e colocar o sistema em um frasco de combustão de Schöniger para a sua destruição por radiação infravermelha.

Como os resultados obtidos com as três técnicas de destruição foram idênticos passou-se a utilizar a técnica que fôsse mais conveniente na ocasião.

Proteínas. Estas foram determinadas utilizando-se o procedimento de LOWRY et alii (1951). Afim de se eliminar interferências de compostos não protéicos, a absorbância de cada amostra foi corrigida pela absorbância do sobrenadante de uma duplicata desproteinizada com $HClO_4$, em concentração final de 0,5N; ambas absorbâncias medidas após a reação colorimétrica. Os títulos de proteína foram calculados tendo albumina cristalina de sôro bovino como padrão.

9. Cromatografia de troca iônica dos compostos ninhidrina-positivos ácido-solúveis da hemolinfa

A preparação das amostras de hemolinfa, coletadas como descrito antes, para a identificação e quantificação dos compostos ninhidrina-positivos ácido solúveis, tanto hidrolizadas quanto não hidrolizadas, foi feita segundo LEVENBOOK e DINAMARCA(1966)

A cromatografia foi realizada em um "Beckman Aminoacid Analyser, Model 120C", gentilmente cedido pela Dra. Rebeca C. de Angelis, utilizando o procedimento para fluídos fisiológicos fornecido junto com o equipamento da Beckman e que consiste em uma pequena modificação do método de SPACKMAN, STEIN e MOORE(1958).

A identificação de cada pico nos cromatogramas foi feita baseando-se em seu tempo relativo de eluição, sua razão de absorbância 440/570 mμ (ZACHARIUS e TALLEY, 1962) e em seu comportamento na hidrólise. O tempo relativo de eluição dos compostos permitia a sua identificação por comparação com cromatogramas realizados com uma amostra de 17 aminoácidos, cromatogràficamente puros adquiridos de "Mann Research Laboratories", ou/e com cromatogramas publicados (SPACKMAN, STEIN e MOORE, 1958; ZACHARIUS e TALLEY, 1962; HAMILTON, 1963). Para a observação do comportamento dos compostos na hidrólise, amostras eram hidrolizadas (ver acima) e cromatogramas obtidos com essas eram comparados com aquêles de amostras não hidrolizadas. Na identificação de vários picos não foi possível utilizar todos êsses critérios. Nesses casos, a identificação foi considerada apenas tentativa.

Os resultados quantitativos foram obtidos por integração da área sob os picos dos cromatogramas e utilizando constantes de côr para cada aminoácido, conforme determinado nos cromatogramas padrões. No caso de compostos que não estavam presentes na mistura padrão, usou-se a constante de côr média, corrigida por fatôres fornecidos pela "Beckman Instruments Inc." adequados para cada modêlo de equipamento e correspondentes a cada composto. No caso de peptídeos usou-se a constante de côr média. Essa constante média é obtida tomando-se a média de tôdas as constantes de côr para os aminoácidos comuns exceto: histidina, lisina, arginina, prolina e cisteína.

As concentrações de serina, treonina, tirosina e prolina nas amostras hidrolizadas foram elevadas de 15, 5, 6 e 5% respectivamente para compensar as perdas durante a hidrólise ácida. As correções foram calculadas para o tempo de hidrólise de 18 horas utilizado aqui, a partir dos resultados de HIRS, STEIN e MOORE (1954).

10. Preparação dos pigmentos da hemolinfa

Um volume de hemolinfa centrifugado era reunido a 19 volumes de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v, ambos redestilados) bem agitados e filtrados em papel de filtro quantitativo, pré-lavado com clorofórmio-metanol. Ao filtrado adicionou-se 0,2 volumes de água deionizada e após agitação o material foi centrifugado a 11500g por 10 minutos. A fase superior aquosa continha um pigmento de côr limão, enquanto que a fase lipídica apresentava uma côr alaranjada. A fase aquosa após ser evaporada à pressão reduzida e ao abrigo da luz, teve o seu resíduo dissolvido em metanol 90% (v/v) e lavado por agitação com igual volume de éter de petróleo (p.e. 30-50°C) duas vêzes. Depois disso o pigmento côr de limão teve o seu solvente novamente evaporado e foi conservado no vácuo e ao abrigo da luz até a sua utilização. Essa preparação é chamada daqui para diante de pigmento limão.

A fase lipídica foi evaporada à pressão reduzida e ao abrigo da luz e em seguida, seu resíduo foi dissolvido em éter de petróleo (p.e. 30-50°C). Essa dissolução foi imediata e completa o que indicava, juntamente com a côr alaranjada, que se tratava de carotenóides. O material dissolvido em éter de petróleo, após duas lavagens por agitação com igual volume de água deionizada, foi recolhido, evaporado e conservado no vácuo, ao abrigo da luz até a sua utilização. Essa preparação é denominada daqui para diante de carotenóides da hemolinfa.

A saponificação dos carotenóides da hemolinfa foi realizada essencialmente como recomendado por KARRER e JUCKER(1950). A amostra foi dissolvida em 2 ml de KOH 12% em metanol,transferido para tubo de ensaio, ao qual,juntou-se alguns cristais de pirogalol e deixou-se 25 minutos a 75°C,após fechar o tubo com aldogão. Esfriou-se o tubo em gêlo e adicionou-se 6ml de água deio

nizada e 4 ml de éter de petróleo (p.e. 30°-50°C). Depois de agitar bem, a fase do éter de petróleo foi recuperada, lavada por agitações com água e usada em seguida ou conservada no vácuo, ao abrigo da luz, após evaporação do solvente.

11. Identificação dos carotenóides

A identificação dos carotenóides da hemolinfa foi tentada utilizando-se: partição em duas fases, cromatografia de adsorção em hidroxiapatita e um teste qualitativo para astaxantina.

Partição. A separação dos carotenóides da hemolinfa em carotenóides epifásicos e hipofásicos foi feita por partição entre éter de petróleo (p.e.30°-50°C) e metanol 90% v/v (Cf.KARRER e JUCKER,1950). Com essa finalidade, a amostra dissolvida em éter de petróleo (p.e. 30°-50°C) foi juntada a igual volume de metanol 90% v/v, agitada e deixada a repousar.

Cromatografia. A montagem da coluna de hidroxiapatita foi feita como se segue. Uma coluna de vidro de 1,2 cm de diâmetro foi preenchida inferiormente com algodão formando uma camada de 2 cm de altura. Êste algodão foi prèviamente lavado com acetona e éter de petróleo. Após fechar a extremidade inferior, adicionou-se uma suspensão de hidroxiapatita em éter de petróleo, suficiente para produzir uma coluna de sedimento de 8,0 cm de altura. Seguiu-se a adição de uma suspensão de Na_2SO_4 em éter de petróleo, para produzir um sedimento de 1,0 cm de altura.

As amostras de carotenóides saponificadas ou não eram dissolvidas em éter de petróleo (p.e. 30°-50°C) e aplicadas na coluna. A separação dos carotenóides ao longo da coluna de hidroxiapatita era feita com éter de petróleo (p.e. 30°-50°C), enquanto que a sua eluição para fora da coluna era realizada com solventes aplicados na seguinte ordem: éter de petróleo (p.e.30° -50°C), acetona 7% em éter de petróleo e acetona.

Teste qualitativo para astaxantina. O teste foi realizado como descrito por GOODWIN e SRISUKH (1949). O t-butóxido de potássio usado no teste foi preparado segundo JOHNSON e SCHNEIDER (1963).

12. Preparação do casulo I, II e III e determinação da massa produzida por indivíduo

Diferentes grupos de larvas maduras limpas em número conhecido foram colocadas em recipientes forrados com um papel de filtro mantido sempre úmido. Os grupos após iniciar a produção de casulo tinham as suas larvas removidas em tempos adequados, o pêso-sêco do casulo produzido até a ocasião era determinado e a partir do número de larvas presentes era calculada a produção por larva. Para facilitar o estudo, o período de produção do casulo foi dividido em 3 fases. A primeira fase corresponde à produção do casulo do início até o começo do 4º período do 4º estádio; a segunda, do começo do 4º período até 5º período e a terceira fase do 5º período até a muda pupal. O casulo produzido do início até o fim da primeira fase foi denominado de casulo I; do início até o fim da segunda fase, de casulo II; e do início até o fim da terceira fase, de casulo III. Evidentemente, pela nomenclatura usada o casulo III corresponde ao casulo terminado, enquanto que os demais correspondem ao casulo em fases anteriores de produção.

13. Determinação da solubilidade do casulo

Amostras sêcas e trituradas de casulo pesando cêrca de 100 mg foram colocadas em tubos de centrífuga prèviamente levados a pêso-constante. Essas amostras eram lavadas 3 vêzes com 5 ml de água deionizada cada vez. A recuperação do material insolúvel foi sempre realizada por centrifugação a 11500g. O material remanescente após as lavagens foi pesado depois de ter sido sêco a pêso-constante em estufa a 100°C. A diferença de pêso observada em relação às amostras antes de serem lavadas, foi considerada como a massa de material hidrossolúvel.

Amostras de cêrca de 100 mg de casulo, lavadas com água como descrito acima, foram colocadas em tubos de centrífuga prèviamente levados a pêso-constante. Adicionou-se em cada tubo 5ml de ácido acético 10% (v/v), agitando com bastão até a efervescência observada desaparecer. Após centrifugação a 11500 g, o sedimento foi lavado duas vêzes com 1 ml de ácido acético 10% e uma vez com 1 ml de água. O sedimento remanescente das lavagens foi

sêco a pêso constante e pesado. A diferença do último pêso e o inicial foi assumido como massa de material hidroinsolúvel e ácido acético solúvel. O sedimento remanescente no final foi denominado fração insolúvel do casulo.

14. Determinações químicas do casulo

Aminoácidos da fração insolúvel serão discutidos no ítem 16.

α-amino-N total insolúvel. Amostras sêcas de cêrca de 50 mg da fração insolúvel, preparadas como descrito acima foram hidrolizadas em 100 ml de NaOH 5N a 100°C por 8 horas. Alíquotas diluídas do hidrolizado eram acertadas para pH 6,0 com ácido acético glacial e o conteúdo de α-amino N foi determinado pela técnica de ROSEN (1957), usando como padrão DL-leucina.

Carboidratos insolúveis e purificação de melanoidinas. Amostras sêcas de cêrca de 10 mg da fração insolúvel do casulo foram hidrolizadas em balões volumétricos de 10 ml, com cêrca de 2 ml de HCl 3N, a 100°C, durante vários períodos de tempo. Terminada a hidrólise, as amostras eram acertadas para 10 ml com água e filtradas em lã de vidro. Êsses filtrados foram utilizados para a determinação de hexosaminas, ácidos urônicos, açúcares neutros e para a purificação e isolamento de melanoidinas.

As hexosaminas foram determinadas nos filtrados usando uma modificação do método de ELSON-MORGAN, após purificação em Dowex-50, como descrito por BOAS (1953). Foi utilizado como padrão galactosamina HCl purificada em Dowex-50 como as amostras.

Os açúcares neutros foram determinados nos filtrados dos hidrolizados pela reação de fenol-H_2SO_4, segundo a técnica de DUBOIS et alii (1956). Tôdas as determinações foram realizadas na presença e ausência de fenol. O valor aceito para cada amostra foi a diferença entre as duas determinações. Êsse cuidado foi tomado para eliminar as interferências devido à produção inespecífica de côr resultante do aquecimento com H_2SO_4. Glicose foi utilizada como padrão nessas determinações. Deve-se notar que o

método de fenol-H_2SO_4 é empregável para açúcares neutros e ácidos urônicos. Entretanto, como no presente material o conteúdo de ácidos urônicos é insignificante em relação ao conteúdo de carboidratos total medido com fenol-H_2SO_4 (ver Resultados), a presente determinação pode ser considerada uma determinação de açúcares neutros.

Os ácidos urônicos foram determinados nos filtrados dos hidrolizados após reação com carbazol, segundo GALAMBOS (1967) utilizando ácido glicurônico como padrão.

O isolamento de melanoidinas dos filtrados dos hidrolizados foi conseguido como se segue. Amostras dos filtrados foram aplicados em uma coluna de Dowex-50 preparada como descrito por BOAS (1953) e eluídas com 10 ml de água, seguido de 5 ml de HCl 2N. Nessas condições os carboidratos ácidos e neutros, aminoácidos e hexosaminas são liberados da coluna, enquanto que o pigmento ainda fica retido. Êsse foi então eluído com NaOH 2N. Após neutralização o eluato foi submetido à reação de ELSON-MORGAN na modificação proposta por BOAS (1953) e seu espectro de absorção realizado. A absorbância em cada comprimento de onda foi corrigida pela absorbância do pigmento purificado e na mesma diluição que aquêle medido após a reação de ELSON-MORGAN.

Carboidratos solúveis. Foram determinados segundo DUBOIS et alii (1956) usando o mesmo cuidado para eliminar interferências descrito acima.

Carbonato. Foi identificado no casulo como descrito em seguida. Cêrca de 50 mg de casulo foi colocado em um sistema fechado, 2 ml de H_2SO_4 0,1N foram adicionados e o frasco aquecido em banho-maria. O gás liberado foi recolhido em solução saturada de $Ca(OH)_2$. Afim de evitar qualquer dúvida quanto à identidade do precipitado branco formado na solução de $Ca(OH)_2$, cêrca de 50 mg de casulo foi prèviamente tratada com H_2O_2 100 volumes e em seguida o procedimento acima foi repetido.

Cinzas. Foram determinadas após o aquecimento em cadinho de porcelana a 800°C, em mufla, até produzir cinzas brancas. Foram usadas amostras de casulo sêco (determinação de cinzas to-

tais) e de casulo após lavagens em água e ácido como descrito no ítem 13 (determinação de cinzas insolúveis).

Lipídeos. Foram determinados como descrito para hemolinfa.

Metais. Foram determinados como descrito para hemolinfa, com exceção de K^+ que foi determinado como os outros metais, isto é, por espectroscopia de absorção atômica, após destruição da matéria orgânica.

Nitrogênio-total da fração insolúvel do casulo foi determinado segundo o método de Kjeldahl, como recomendado por ALBANESE e ORTO (1963).

Proteínas solúveis. Foram determinadas como descrito por LOWRY et alii (1951), usando albumina cristalina de sôro bovina como padrão.

15. Cromatografia em papel de carboidratos do casulo

Amostras de cêrca de 7 mg de casulo lavado em água e ácido (ver ítem 3) foram hidrolizados em 1 ml de HCl 3N por 2 horas a 100°C. Os hidrolizados filtrados em lã de vidro foram aplicados diretamente no papel de cromatografia.

O sistema de cromatografia usado foi sempre o descendente em cuba pré-saturada com o solvente a ser empregado para desenvolver o cromatograma. Foram usados dois tipos de sistemas solventes: um dêles consistia em butanol-etanol-água (10:1:2, v/v/v) com um tempo corrido de 92-94 horas e o outro em butanol piridina-água (3:1:1, v/v/v) com uma corrida de 27-29 horas. O papel para cromatografia usado foi Whatman nº 1 e em apenas um caso foi usado papel Whatman 3MM que produziu resultados idênticos.

A revelação dos cromatogramas foi realizada usando uma ligeira modificação do sistema de nitrato de prata introduzido por PARTRIDGE e WESTALL (1948). Foi usado também um sistema de

revelação específico para hexosaminas, baseando-se em uma modificação do método de ELSON-MORGAN desenvolvido por PARTRIDGE e WESTALL (1948).

A identificação dos carboidratos foi realizada correndo amostras de carboidratos conhecidos no mesmo cromatograma e comparando-se as migrações. A comparação da migração de um composto em cromatogramas diferentes foi feita pelo seu RG, definido pela razão entre sua migração e a da glicose no mesmo cromatograma.

16. Cromatografia na troca iônica de aminoácidos da fração insolúvel do casulo

Amostras de 6-9 mg da fração insolúvel do casulo sêcas e finamente pulverizadas, foram pesadas em ampolas. Adicionou-se 2 ml de HCl 6N em cada ampola. Estas foram seladas à vácuo (110 mm Hg) e 3 delas aquecidas a 105°C por 22 horas, enquanto que 3 outras por 70 horas. Então o conteúdo das ampolas e as lavagens dessas foram filtrados em lã de vidro. Os filtrados foram recolhidos, liofilizados e depois dissolvidos em 4,0 ml de tampão citrato de sódio pH 2,20 (0,2N em sódio). Alíquotas de 0,25 ml dêsses foram aplicados em um "Beckman Aminoacid Analyser Model 120C", gentilmente cedido pela Dra. Rebeca C. de Angelis, e as cromatografias foram realizadas usando o procedimento de 2 horas para hidrolizados protéicos, descritos em boletins técnicos fornecidos juntamente com o equipamento.

A identificação e quantificação de cada pico presente nos cromatogramas foi feita como descrito no ítem 9 acima. Os títulos dos aminoácidos instáveis em ácido foram extrapolados para tempo zero de hidrólise, como descrito por HIRS, STEIN e MOORE (1954), a partir dos resultados obtidos nos dois tempos de hidrólise empregados.

17. Determinação de pêso-sêco e metais nos tubos de Malpighi

As larvas eram dissecadas em NaCl 0,1M, os túbulos de Malpighi removidos, lavados em NaCl e deixados de maneira a permitir o escorrimento da solução de lavagem. Depois disso êles eram colocados em pesa-filtros prèviamente levados a pêso-constante e sêcos até pêso-constante, em estufa a 100°C, para determinação de seu pêso-sêco ou aplicado em quadrados de papel Whatman nº 1 e usados para a determinação de metais, como descrito no ítem 8, com exceção do K, que também foi determinado por espectroscopia de absorção atômica, após destruição da matéria orgânica.

18. Determinação de glicogênio e pêso-sêco do corpo gorduroso

As larvas eram dissecadas em NaCl 0,1M, os corpos gordurosos centrais eram removidos, lavados em NaCl 0,1M e deixados de maneira a permitir o escorrimento da solução de lavagem, em tubos mantidos no gêlo. Depois disso êles eram usados para as determinações de glicogênio ou colocados em pesa-filtros e sêcos até pêso-constante em estufa a 100°C, para determinação de seu pêso-sêco.

O glicogênio do corpo gorduroso foi preparado a partir de hidrolizado alcalino do tecido de forma similar àquela descrita por BELL e YOUNG (1934). Após a sua preparação o glicogênio foi quantificado por reação com antrona, segundo MOKRASCH (1954), usando glicose como padrão. E' possível que a fração assim isolada e determinada contenha substâncias antrona-positivas diferentes do verdadeiro glicogênio (BALMAIN, BIGGERS e CLARINGBOLD, 1956).

REAGENTES

Os aminoácidos usados eram produtos cromatográficamente puros da Mann Research Laboratories.

A hidroxiapatita empregada era produto especial para cromatografia em coluna (Bio Gel HTP) fornecida pelo Bio Rad Laboratories, Richmond, California.

Éter de petróleo foi obtido por destilação fracionada (fração de p.e. 30°-$50^{o}C$) do produto técnico.

Etanol também foi obtido do produto técnico por destilação simples.

Clorofórmio, metanol e butanol eram produtos analíticos da British Drug Houses e eram redestilados antes de usar.

As resinas de troca iônica Dowex empregados foram obtidas da Sigma Chemical Company.

Todos os demais reagentes empregados foram produtos analíticos obtidos principalmente da British Drug Houses, E.Merck A. G. e J. T. Baker.

RESULTADOS

A. Química da hemolinfa de larvas de R. americana

1. Resultados Gerais

A hemolinfa de larvas maduras de R. americana é um líquido escuro, avermelhado, formado por 89% em massa de água e 11% de substâncias sólidas. Seu pH medido sem entrar em contacto com o ar é de 7,27, a 25°C ou 37°C e é similar ao determinado para outros Diptera Nematocera (Cf. BUCK, 1953).

O abaixamento do ponto de congelação observados em média é de -0,402°C, que corresponde a uma osmolaridade de 216 miliosmoles. Êsse abaixamento é pequeno em relação aos demais insetos, com exceção de larvas aquáticas de Diptera (Cf. BUCK, 1953). TOKUMARU, FERRI e WORSMANN (1968) encontraram uma osmolaridade correspondente a 320 miliosmoles para a hemolinfa de R. americana, utilizando método baseado na alteração ou não do tamanho de gotas de hemolinfa fechadas em capilares e separadas por camadas de ar de gotas de soluções de KCl de concentrações conhecidas por 24 horas. Êsses resultados são, entretanto , de valor duvidoso porque a hemolinfa possui numerosas enzimas hidrolíticas como amilases, esterases, proteases, fosfatases, etc. (FLORKIN e JEUNIAUX, 1964) e é difícil se assegurar que não tenha havido intensa hidrólise de compostos durante um período tão longo e à temperatura ambiente Além do mais, meios com osmolaridade de cêrca de 216 miliosmoles foram feitos e usados com sucesso para a incubação de glândulas salivares de R. americana (LARA e TOLEDO, citado em ARMELIN, MENEGHINI e LARA, 1969; TERRA et alii, manuscrito em preparação).

A densidade média da hemolinfa de larvas maduras é de 1,043 que é um valor elevado entre insetos (Cf. BUCK, 1953).

A hemolinfa da maioria dos insetos apresenta hemocitos em circulação que podem ocupar volumes de até 15% do volume to-

tal da hemolinfa, em certas ocasiões como na muda (BUCK, 1953). Em R. americana, o volume ocupado pelos hemocitos é de cêrca de 0,3% do volume total da hemolinfa, o que dispensa a necessidade de se corrigir os títulos dos compostos determinados no plasma (hemolinfa centrifugada) para hemolinfa total. O valor de 0,3% obtido concorda com a maioria dos determinados para hemolinfa de insetos (Cf. BUCK, 1953).

A hemolinfa de larvas de R. americana deixada em repouso por períodos de até 15 horas à temperatura ambiente, na ausência ou presença de hemocitos, não coagula e escurece muito pouco. Por outro lado, amostras de hemolinfa centrifugadas e diluídas 10 vêzes com água deionizada, mesmo mantidas no gêlo, escurecem e floculam intensamente após 2 horas, resultando em espêsso sedimento cinzento escuro. Entretanto, se uma centrifugação fôr feita logo após a diluição, resulta em sedimento amarelado, correspondente a apenas 3% das proteínas da hemolinfa.

2. Cromatografia dos compostos ninhidrina-positivos solúveis em ácido

A figura 1 mostra um cromatograma típico de uma amostra de compostos ninhidrina-positivos ácidos solúveis, não hidrolizada, de hemolinfa de larvas de R. americana do 2º período (45-48 dias de idade). Para facilitar a visualização, alguns picos foram ampliados, ficando fora da escala que é 1:4.

A identificação dos picos apresentados a seguir foi feita utilizando os critérios referidos em Métodos: 7, ácido aspártico; 8, treonina; 9, serina; 12, prolina; 13, ácido glutâmico; 14, glicina; 15, alanina; 18, valina; 19, cistationina; 20, metionina; 21, isoleucina; 22, leucina; 25, tirosina; 26, fenilalanina; 29, ornitina; 30, amônia; 32, lisina; 34, histidina; 35, triptofano; 36, arginina (Ver figura 1).

O pico nº 10 (figura 1) poderia ser identificado como asparagina e/ou glutamina porque o método utilizado não permite a resolução dos dois componentes. Entretanto, como TUNDISI et alii (1964), encontraram em um estudo qualitativo da hemolinfa de R. americana os dois compostos, utilizando cromatografia em papel, o pico foi atribuído a ambos os compostos.

Os picos nº 5, 11, 23, 31 e 33 foram atribuídos a peptídeos numerados respectivamente 1, 2, 3, 4 e 5 (ver figura 1). A identificação dêsses picos baseia-se no fato de seus tempos relativos de eluição não corresponderem a nenhum composto ninhidrina-positivo encontrável nos cromatogramas publicados referidos em Métodos e desaparecem por hidrólise.

Os picos que se seguem foram identificados tentativamente baseando-se nos seus tempos relativos de eluição: 1, fosfoserina; 2, fosfoetanolamina; 3, taurina; 4, uréia; 6, metioninas sulfóxidos; 16, ácido α-amino-adípico; 17, ácido α-amino-n-butírico; 24, glicosamina; 27, β-alanina; 28, ácido γ-amino-butírico (figura 1).

A quantificação dos picos dos cromatogramas foi realizada como descrito em Métodos e a Tabela II apresenta a média dos resultados obtidos em 3 determinações independentes. O desvio médio observados nas determinações ficou na maioria dos casos entre 5 e 15%. Variações dessa ordem e até maiores foram observadas em determinações semelhantes realizadas em outros insetos (LEVENBOOK e DINAMARCA, 1966).

O valor apresentado para o título de triptofano deve ser inferior ao que ocorre "in vivo", porque êsse aminoácido sofre destruição parcial durante as desproteinizações da hemolinfa, na preparação da amostra para análise (MOORE e STEIN,1954). Os títulos encontrados para ácido glutâmico devem estar ligeiramente superestimados e aquêles da glutamina + asparagina, subestimados, devido a hidrólise parcial das amidas, especialmente glutamina, durante a preparação e análise das amostras (MOORE e STEIN, 1954).

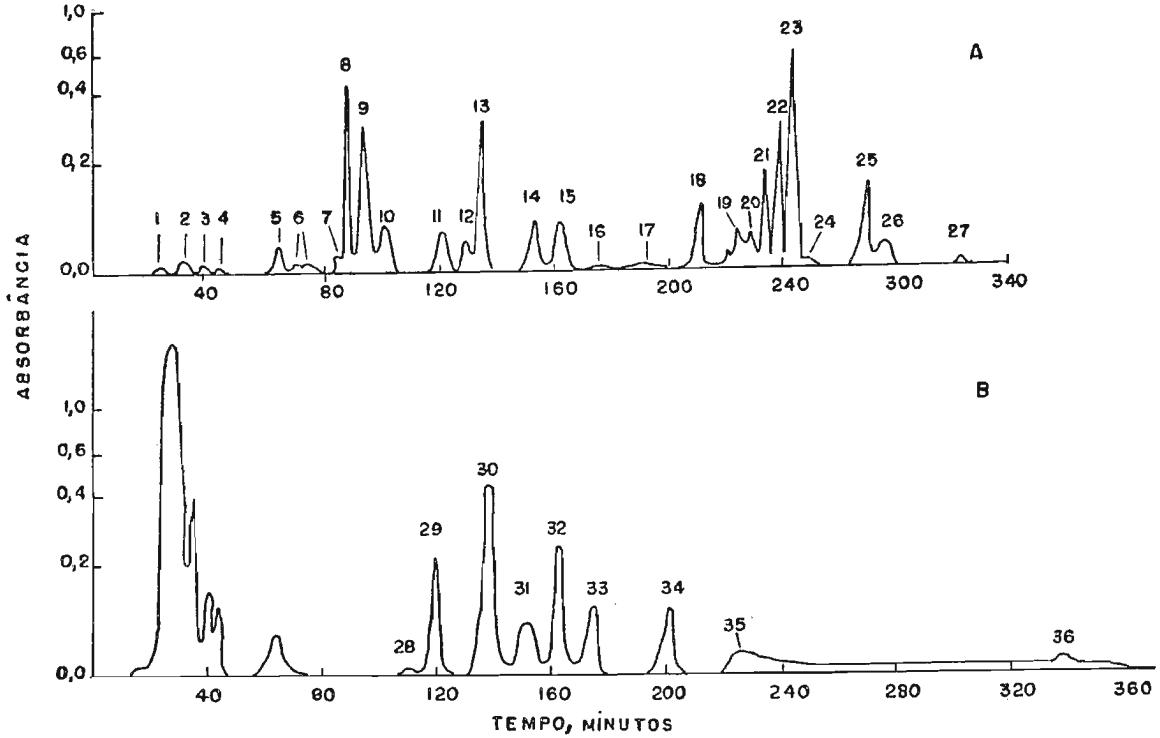

Figura 1 - Compostos ninhidrina-positivos solúveis em ácido sulfossalicílico 3% (P/V) da hemolinfa de larvas de R. americana no fim do 2º período (45-48 dias de idade). O cromatograma A corresponde à coluna de aminoácidos ácidos e neutros e o B, à coluna de aminoácidos básicos. A identificação dos picos numerados é a seguinte: 1, fosfoserina; 2, fosfoetanolamina; 3, taurina; 4, uréia; 5, peptídeo 1; 6, metioninas sulfóxidos; 7, ácido aspártico; 8, treonina; 9, serina; 10, glutamina + asparagina; 11, peptídeo 2; 12, prolina; 13, ácido glutâmico; 14, glicina; 15, alanina; 16, ácido α-aminoadípico; 17, ácido α-amino-n-butírico; 18, valina; 19, cistationina; 20, metionina; 21, isoleucina; 22, leucina; 23, peptídeo 3; 24, glicosamina; 25, tirosina; 26, fenilalanina; 27, β-alanina; 28, ácido γ-amino-butírico; 29, ornitina; 30, amônia; 31, peptídeo 4; 32; lisina; 33, peptídeo 5; 34, histidina; 35, triptofano; 36, arginina; Para maiores detalhes ver o texto.

TABELA II

Compostos ninhidrina-positivos, solúveis em ácidos, da hemolinfa de larvas de R. americana, 2º período, de 45-48 dias de idade [1]

Composto	Concentração mM	Composto	Concentração mM
Fosfoserina	0,07	Peptídeo-1	0,20
Ác. aspático	0,35	Peptídeo-2	1,18
Treonina	13,15	Peptídeo-3	9,01
Serina	5,30	Peptídeo-4	0,95
Prolina	8,05	Peptídeo-5	1,38
Ác.glutâmico	7,65	total de peptídeos	12,78
Glicina	0,96		
Alanina	2,11	Amônia	26,25
Valina	3,92	Fosfoetanolamina	1,31
Metionina	0,41	total geral	102,96
Isoleucina	0,61		
Leucina	1,78	α-amino-N total[2]	94,0
Tirosina	2,06		
Fenilalanina	0,27	Traços[3]	
Ornitina	2,42		
Lisina	4,67	Taurina	+++
Histidina	2,76	Uréia	++
Triptofano	1,40	Metioninas sulfóxidos	+++
Arginina	0,89	Ác. α-amino adípico	+++
Cistationina	0,63	Ác. α-amino-n-butírico	+++
Glutamina+asparagina	3,22	Glicosamina	++
Total de aminoácidos	62,62	β-alanina	++
		Ác. γ-amino-butírico	++

1. Para maiores detalhes, consultar o texto.
2. Determinado na fração ácido solúvel da hemolinfa como descrito em Métodos.
3. Traços são denominados os compostos que nas diluições empregadas (ver Métodos) não podem ser convenientemente estimados. Correspondem a concentrações inferiores a 0,05 mM. O sinal (+++) indica que o composto foi encontrado 3 vêzes em 3 análises e (++) indica que foi encontrado 2 vêzes em 3 análises.

A concentração dos aminoácidos é elevada, como é característico de insetos, especialmente os Endopterygota (FLORKIN e JEUNIAUX, 1964). Os aminoácidos predominantes na hemolinfa são: treonina, prolina, ácido glutâmico e serina, que juntos perfazem mais do que 50% da concentração total de aminoácidos livres da hemolinfa. A ocorrência de ácido glutâmico e prolina entre os aminoácidos mais concentrados é típico de insetos Endopterygota (FLORKIN e JEUNIAUX, 1964). E' interessante assinalar a ausência, até mesmo de traços, de cisteína ou cistina e citrulina. Cisteína, entretanto, também não foi detectado em vários outros Diptera como: Gastrophilus intestinalis (LEVENBOOK, 1950a), Phormia regina (LEVENBOOK, 1966). E' notável também a concentração relativamente elevada da ornitina e a ocorrência de cistationina na hemolinfa, embora esta já tenha sido identificada em outros insetos (WYATT, 1961).

Os peptídeos ocorrem em pequeno número, embora a sua concentração total seja considerável. Dois dêles são ácidos e 3 dêles, representando cêrca de 87% do total dos peptídeos, são neutros ou básicos, a julgar pelos seus tempos relativos de eluição. A concentração do peptídeo 3, que corresponde a 70% do total dos peptídeos, só é superada entre os aminoácidos pela treonina.

Vários insetos apresentam concentrações muito baixas de amônia na hemolinfa circulante, mas depois que essa é retirada da larva a sua concentração cresce ràpidamente a partir de precursores desconhecidos (WIGGLESWORTH, 1965;LEVENBOOK, 1950a). Como nenhum estudo foi feito nesse sentido em R. americana, a elevada concentração de amônia atribuída à hemolinfa nesta tese deve ser considerada com certa reserva. Outro motivo para essa reserva é o fato da concentração de amônia determinada na hemolinfa, 26,3 mM, exceder de cinco vêzes aquela concentração considerada tóxica, que é 5 mM (CRAIG, 1960).

A razoável concordância observada entre a soma dos compostos ninhidrina-positivos e a determinação direta de α-amino N, indica que nenhuma fração quantitativamente importante daqueles compostos deixou de ser analisada.

TABELA III

Aminoácidos da fração ácido solúvel da hemolinfa de R. americana, 2º período, 45-48 dias de idade, após hidrólise[1]

Aminoácido	Concentração[2] mM	Aminoácido	Concentração[2] mM
Histidina	19,87	Isoleucina	1,26
Ácido aspártico	8,72	Fenilalanina	0,84
Ácido glutâmico	10,13	Arginina	1,42
Lisina	6,73	Alanina	2,60
Prolina	9,57	Valina	4,11
Glicina	2,03	Metionina	0,56
Leucina	2,84	Tirosina	2,17
Ornitina	3,11	Treonina	13,45
Serina	5,99	Total	95,40

1. Para maiores detalhes, consultar Métodos.
2. Média de duas determinações.

A concentração dos aminoácidos presentes na fração ácido solúvel da hemolinfa (aminoácidos livres) após hidrólise ácida é de 95,40 mM (Tabela III). Isso significa que a hidrólise ácida aumenta a concentração de aminoácidos livres de 32,70 mM. Assumindo que êsse incremento é consequência da hidrólise dos peptídeos da hemolinfa, a razão entre êsse valor e o título de peptídeos na hemolinfa corresponde ao número médio de resíduos de aminoácidos presentes por peptídeo. Êsse número é 2,56 e corresponde a uma superestimativa, porque havendo outros peptídeos não identificados, êles fariam o número obtido baixar. Utilizando o número médio de resíduos de aminoácidos, por peptídeo e considerando as concentrações relativas dos vários peptídeos, é possível estimar o número de resíduos presente em vários peptídeos identificados. Assim, o peptídeo 3 que corresponde à 70% dos peptídeos deve ser um dipeptídeo, caso contrário a média de resíduos de aminoácidos seria certamente superior àquela observada. Além disso, como já foi acentuado acima, a média de 2,56 possìvelmente de

ve estar superestimada, o que reforça ainda mais a conclusão acima. Assumindo que o peptídeo 3 é um dipeptídeo, os peptídeos 2, 4 e 5 devem ter no máximo 10 resíduos, enquanto que o peptídeo 1, por ocorrer em baixa concentração, não permite nenhuma estimativa segura.

A Tabela IV,mostra a participação porcentual dos vários aminoácidos no incremento aminoacídico total, após a hidrólise ácida da porção ácido solúvel da hemolinfa. Se fôr admitido, como foi feito acima, que o referido incremento é resultante da hidrólise dos peptídeos da hemolinfa, a Tabela IV é uma boa estimativa da composição porcentual molar dos aminoácidos peptídicos.

A presença de ornitina, na Tabela IV deve ser consequência de variações amostrais, porque a ornitina é um aminoácido típicamente livre. Variações amostrais devem ser responsáveis também pela presença na Tabela de vários aminoácidos cuja participação no incremento é pequena como: tirosina, metionina, etc. A participação do ácido aspártico e glutâmico no incremento real é menor do que o indicado na Tabela, porque parte dêles se originaram da hidrólise das amidas correspondentes. Apesar de tôdas as restrições acima, a Tabela IV permite concluir que os peptídeos são compostos principalmente de histidina e ácido aspártico, e em menor grau de ácido glutâmico, lisina e outros. A ocorrência generalizada de histidina explica porque os peptídeos presentes em concentrações mais significativas são neutros ou básicos, a julgar pelos seus tempos relativos de eluição.

TABELA IV

Participação porcentual dos vários aminoácidos no incremento aminoacídico total, após hidrólise ácida*

Aminoácido	% do incremento total	Aminoácido	% do incremento total
Histidina	45,0	Isoleucina	1,7
Ácido aspártico	22,0	Fenilalanina	1,5
Ácido glutâmico	6,5	Arginina	1,4
Lisina	5,4	Alanina	1,3
Prolina	4,0	Treonina	0,8
Glicina	2,8	Valina	0,5
Leucina	2,8	Metionina	0,4
Ornitina	1,8	Tirosina	0,3
Serina	1,8	Total	100,0

* Dados calculados a partir das Tabelas II e III.

O peptídeo-3 como foi discutido acima, deve ser um dipeptídeo e, consequentemente, os aminoácidos derivados de sua hidrólise devem corresponder a cêrca de 55% dos aminoácidos totais liberados por hidrólise. Caso seus dois resíduos sejam iguais deverá ocorrer um aminoácido que perfaça aproximadamente 55% dos aminoácidos totais liberados por hidrólise, enquanto que se os dois resíduos forem diferentes, deverá haver pelo menos dois aminoácidos que correspondam a 27% dos aminoácidos totais. Uma inspeção na Tabela IV permite observar que os resultados são favoráveis à hipótese de que o peptídeo-3 seja constituído por dois resíduos de histidina ou por um resíduo de histidina e outro de ácido aspártico. O tempo relativo de eluição do peptídeo-3 (Figura 1) favorece a hipótese de que êle seja formado por um resíduo de histidina e outro de ácido aspártico.

3. Apresentação dos resultados das análises químicas

As concentrações de Ca, Na, K e Cl na hemolinfa de larvas maduras de R. americana (Tabela V) são similares às determinadas para grande número de insetos, enquanto que a concentração de Mg é muito elevada, sòmente comparável com aquelas encontradas em alguns Lepidoptera e Coleoptera (BUCK, 1953; PROSSER e BROWN, 1961). Concentrações semelhantes às apresentadas na Tabela V para Cu e Zn foram determinadas em outro Diptera : Gastrophilus intestinalis (LEVENBOOK, 1950a).

TABELA V

Composição química da hemolinfa da larva de R. americana, 2º período, 45-48 dias de idade*

Composto	mg/100 ml
Mg	110
Ca	12,9
Cu	0,49
Zn	0,81
Fe	1,60
Na	77,5
K	67,6
P-inorgânico	9,7
P-ácido-solúvel	55,4
P-lipídico	10,2
P-protéico	2,8
P-total	65,5
HCO_3^- (pH 7,270)	42,1
Cl^-	47,6
Proteína	6,9 g/100 ml
Carboidrato total	201
Trealose	140
Glicogênio	1,4
Lipídeo total	520
Ácido cítrico	391
Cinzas**	460

* Os resultados referentes a compostos ninhidrina-positivos encontram-se nas Tabelas II e III. Para maiores detalhes consultar o texto.

** Apenas uma determinação.

O conteúdo de fósforo total na hemolinfa de R. americana é elevado e a maior parte dêste está ligado a compostos orgânicos ácido-solúveis, o que é característico da classe Insecta (WYATT, 1961). Só foram identificados na fração fósforo ácido solúvel orgânico: fosfoetanolamina e fosfoserina (Tabela II). O resultado apresentado para fósforo protéico poderia estar superestimado se ocorressem ácidos nucléicos na hemolinfa. O fato da proteína obtida por precipitação com sulfato de amônio apresentar o mesmo conteúdo em fósforo que aquela precipitada por ácidos, indica que o fósforo considerado protéico não está contaminado com fósforo de ácidos nucléicos. Isso porque nas condições salinas empregadas DNA não se precipitaria e RNA presente em concentrações de pelo menos até 100 µg/ml, também não, conforme foi observado em experiência contrôle utilizando RNA citoplasmático de glândula salivar de R. americana.

O título de citrato encontrado é bastante elevado, entretanto, títulos elevados como êsse ocorrem em outros Diptera e em outros insetos, o que levou a se considerar êsse fenômeno uma característica de larvas da Classe Insecta (LEVENBOOK e HOLLIS, 1961).

Trealose é o carboidrato predominante da hemolinfa, como ocorre em grande número de insetos (WYATT, 1961; FLORKIN, e JEUNIAUX, 1964), enquanto que glicogênio ocorre em pequena concentração.

As determinações para lipídeos totais na hemolinfa de larvas de insetos (BUCK, 1953; WYATT, 1961) são da mesma ordem de grandeza do valor encontrado em R. americana.

A concentração de proteínas encontrada na hemolinfa de R. americana é superior à média determinada na hemolinfa de larvas dos demais insetos (Cf. BUCK, 1953; ENGLE e WOODS, 1960), o que já poderia ser antecipado por sua osmolaridade baixa, mas densidade e conteúdo de sólidos mais elevados que a média dos outros insetos.

As determinações de pCO_2 a 37°C deram em média (3 determinações) 15,7 mmHg. A partir dessa determinação foi calculado (ver Métodos) o valor para bicarbonato apresentado na Ta-

bela. O título para bicarbonato "in vivo" deve diferir um pouco do apresentado. Primeiro porque a dissociação do ácido carbônico e a solubilidade do CO_2 na hemolinfa foram assumidos serem iguais aos determinados no plasma humano, o que pode não ser correto. Em segundo lugar, porque a temperatura em que foi determinado pCO_2 (37°C) é diferente daquela em que o animal normalmente vive, que é 20°C. Se forem corrigidos os valores obtidos a 37°C para bicarbonato, utilizando os parâmetros fornecidos por GAMBINO (1961) para o sangue humano, o valor "in vivo" seria 46% mais elevado que aquêle determinado. Entretanto, o pH da hemolinfa parece não variar significantemente, com a temperatura (pH medidos a 25°C e 37°C são idênticos). Se fôr admitido nêsse caso que a variação da concentração de bicarbonato depende apenas da variação de pCO_2 e da solubilidade do CO_2 com a temperatura, novo cálculo permite concluir que o bicarbonato "in vivo" seria cêrca de 17% menor do que aquêle apresentado. Dessa forma, embora o valor determinado para bicarbonato deva diferir do valor presente "in vivo" aquêle deve representar uma boa estimativa dêsse.

pO_2 foi determinado a 37°C, resultando em média (3 determinações) 65,3 mmHg. Esta medida foi feita após um período de 60 segundos necessário para o aparelho entrar em equilíbrio. Êsse valor representa uma subestimativa, pois as leituras não se estabilizam, caindo contínuamente. Êsse resultado deve ser causado pela oxidação de substâncias fenólicas presentes na hemolinfa, oxidação essa que se inicia assim que a hemolinfa é retirada, resultando em um consumo de oxigênio e impedindo medidas corretas de pO_2, a não ser que se faça a determinação diretamente no interior da hemocela larval (WEINER, 1965).

4. Pigmentos

O espectro de absorção da hemolinfa total de larvas de R. americana (figura 2) mostra 3 picos de absorção: um em 270-280 mμ, outro a 310 mμ e o último a 460 mμ. O pico a 270-280 mμ deve resultar da presença de tirosina, fenilalanina e triptofano ligados a proteínas e uma pequena parcela aos mesmos aminoácidos, porém livres, conforme pode se concluir pela existência de um pico

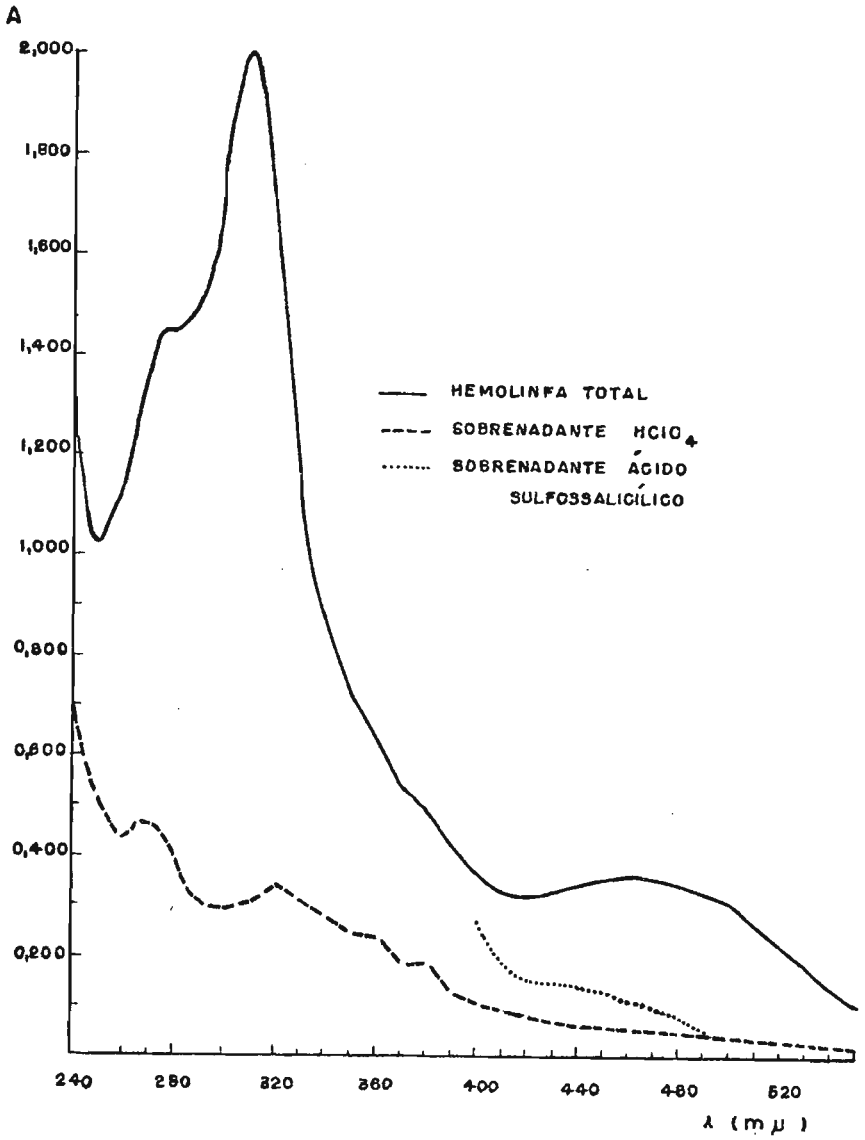

Figura 2 - Espectro de absorção da hemolinfa de larvas maduras de R. americana. O espectro da hemolinfa total foi feito após diluição de 50 vêzes em água deionizada e aquêles dos sobrenadantes de desproteinização com $HClO_4$ 0,5N ou ácido sulfossalicílico 3% (P/V) foram realizados após neutralização com NaOH e numa diluição final de 50 vêzes.

nessa mesma posição em amostras desproteinizadas com $HClO_4$ 0,5N (figura 2). O pico a 310 mμ deve estar ligado à existência de proteínas, pois êle quase desaparece após a desproteinização. O pico a 460 mμ, parece corresponder a carotenóides ligados a proteínas, conforme será mostrado abaixo. E' interessante observar ainda o fato de que o sobrenadante da desproteinização com ácido sulfossalicílico apresenta absorção nos comprimentos de onda mais curtos do espectro visível, contràriamente ao sobrenadante de $HClO_4$ (figura 2). A referida absorção confere ao sobrenadante ácido sulfossalicílico uma côr limão, enquanto que o sobrenadante $HClO_4$ é incolor.

O sobrenadante de amostras desproteinizadas com TCA 10% (p/v) ou com ácido tungístico (Van SLYKE e HAWKINS, 1928), apresenta um espectro de absorção semelhante àquele obtido após precipitação das proteínas com $HClO_4$, 0,5N, enquanto que aquelas amostras desproteinizadas com 100% de saturação em $(NH_4)_2SO_4$ ou com um volume de clorofórmio apresentam sobrenadantes cujos espectros são idênticos àqueles obtidos após precipitação com ácido sulfossalicílico 3% (P/V). Êsses resultados indicam que a maior parte dos pigmentos deve estar ligada a proteínas, pois são precipitadas por todos precipitantes de proteínas usados. Deve-se assinalar, entretanto, o fato de um pigmento de côr limão não ser precipitado por ácido sulfossalicílico 3% (ver figura 2), sulfato de amônio saturado e clorofórmio.

A figura 3 mostra o espectro de absorção do pigmento de côr limão após a sua preparação e purificação como descrito em Métodos. O seu resíduo obtido após a evaporação de seu solvente por pressão reduzida ao abrigo da luz é solúvel em: água deionizada, NaCl 0,1M, etanol 60% (V/V), KOH 5% (P/V) em metanol e NaOH 0,1N. O resíduo não é solúvel em éter de petróleo (p.e. 30°-50°C) e acetona.

O resíduo do pigmento côr de limão solubilizado em água é precipitável em $HClO_4$ 0,5N, mas mantém-se solúvel em etanol 60% após aquecimento a 75°C por 10 minutos ou após adição de um volume de clorofórmio.

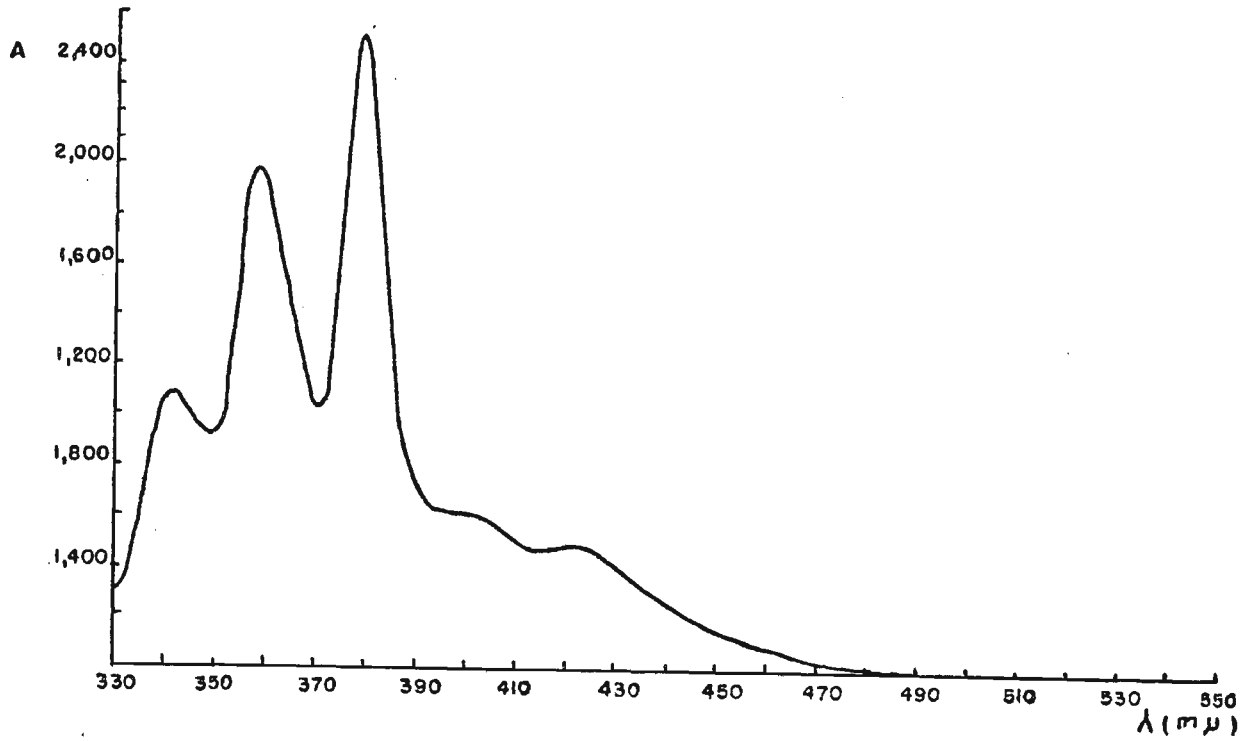

Figura 3 - Espectro de absorção do pigmento de côr limão em metanol 90% (V/V), após preparação e purificação como descrito em Métodos.

O pigmento côr de limão após solubilização em água, adição de um volume de $HClO_4$ 4N produz um sedimento que após lavagens com $HClO_4$ 0,5N dá reação positiva em testes colorimétricos para proteína (LOWRY et alii, 1951) e para carboidrato (DUBOIS et alii, 1956).

As preparações do pigmento de côr limão apresentam uma intensa fluorescência amarelo-esverdeado quando expostos a U.V. de comprimento de onda longo (315-380 mμ), enquanto que com U.V. de comprimento de onda curto (200-280 mμ), nenhuma fluorescência é observada.

A fluorescência das preparações é mantida mesmo em H_2SO_4 0,5N, NaOH 0,1N ou em meios aquosos com ditionito de sódio em quantidades supersaturantes.

O pigmento que permanece no sobrenadante após as desproteinizações da hemolinfa com ácido sulfossalicílico, 3% ou sulfato de amônio 100% saturado, depois de purificado por precipitação com $HClO_4$ 0,5N, lavagens com o mesmo ácido e dissolução em etanol 60% produz um espectro de absorção idêntico àquele do pigmento côr de limão, discutido acima. Além disso, êsse pigmento apresenta o mesmo tipo de fluorescência que o pigmento limão. Isso permite concluir que o pigmento da hemolinfa precipitável com sòmente alguns precipitantes de proteína deve ser o pigmento côr de limão.

As propriedades observadas do pigmento de côr limão sugerem que êsse seja uma cromoglicoproteína. Os resultados mais indicativos dessa hipótese são: a sua solubilidade em etanol 60% e sulfato de amônio saturado, além da reação positiva observada para proteínas e carboidratos. Os resultados indicam ainda que a molécula cromógena do pigmento deve ser muito estável e que grupos ionizáveis não devem estar comprometidos com a estrutura responsável pela fluorescência, porque essa não é alterada na presença de um redutor como ditionito de sódio e nem em meios ácidos ou básicos.

Os resultados obtidos com a partição dos carotenóides da hemolinfa entre éter de petróleo (p.e. 30°-50°C) e metanol 90% como descrito em Métodos, indicam que êsses carotenóides

são predominantemente epifásicos, embora ocorra também uma pequena concentração de pigmentos amarelados hipofásicos.

Amostras de carotenóides da hemolinfa, saponificadas ou não, separam-se em 6 bandas coloridas ao longo de uma coluna de hidroxiapatita (ver Métodos), durante eluição com éter de petróleo. A continuação da eluição com éter de petróleo permite o isolamento de duas frações distintas (Fração I e II) correspondentes às bandas 1 e 2 respectivamente (bandas numeradas segundo migração decrescente). A adição de acetona 7% em éter de petróleo elui as bandas 3 e 4 em uma única fração (Fração III), enquanto que adição de acetona elui as bandas 5 e 6 na fração IV. Êsses resultados estão sumarizados na Tabela VI, juntamente com informações sôbre as côres correspondentes a cada banda.

TABELA VI

Posição das bandas de carotenóides na coluna de hidroxiapatita, após desenvolvimento com éter de petróleo, eluentes usados e frações distintas obtidas

Nº da banda[1]	Côr da banda	Eluente	Fração recolhida
1	amarela	éter de petróleo	I
2	vermelha	éter de petróleo	II
3	amarela	acetona 7% em éter	III
4	alaranjada	acetona 7% em éter	III
5	amarela	acetona	IV
6	alaranjada	acetona	IV

1. Numeração segundo ordem decrescente de migração com éter de petróleo (p.e. 30°-50°C).

A banda 2 é bem mais intensa que tôdas as demais reunidas. A banda 1 é de intensidade intermediária, as bandas 3, 5 e 6 são muito fracas e a banda 4 é mais intensa do que as últimas, embora menos que a banda 1. Em vista dessas observações nenhuma tentativa foi feita de se isolar os pigmentos das frações III e IV.

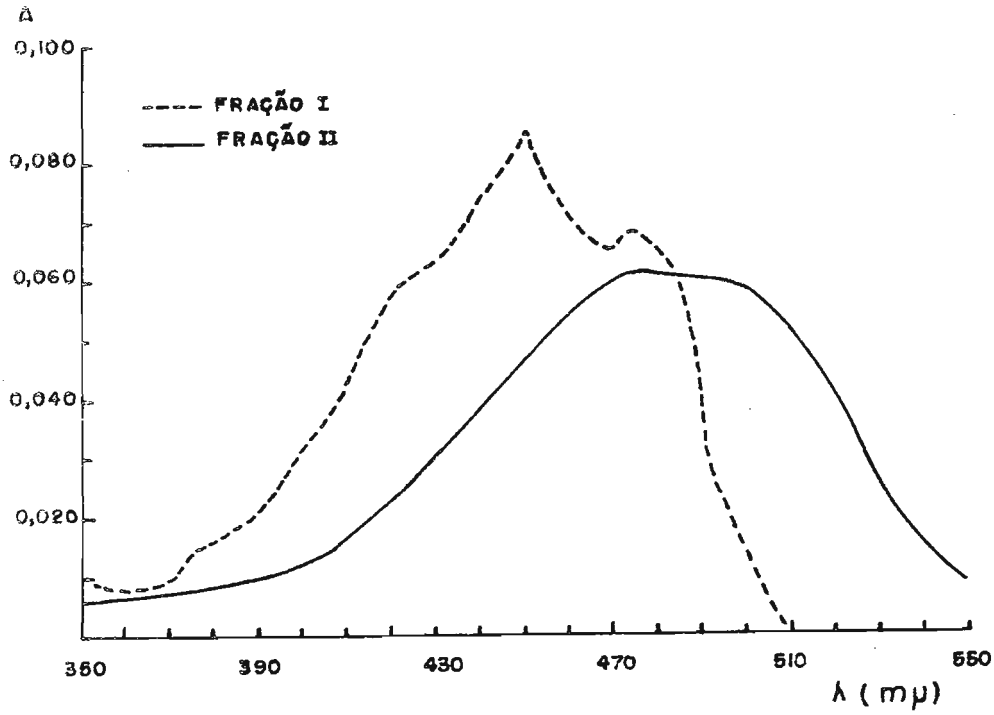

Figura 4 - Espectro de absorção das frações I e II dos carotenóides da hemolinfa, após preparação e cromatografia em hidroxiapatita, como descrito em Métodos. O espectro da fração I foi realizado em hexano e o da fração II em piridina.

A fração IV e possìvelmente também a fração III contêm xantofilas, devido a intensa adsorção de seus pigmentos constituintes à hidroxiapatita, que devem corresponder aos pigmentos hipofásicos observados na partição entre éter de petróleo e metanol 90%.

A figura 4 mostra os espectros de absorção das frações I e II, após evaporação do éter de petróleo a pressão reduzida e ao abrigo da luz e redissolução em hexano e piridina, respectivamente. A confrontação dos espectros obtidos com aquêles dos carotenóides mais conhecidos (KARRER e JUCKER,1950) permite a suposição de que o pigmento da fração I seja β-caroteno. Essa suposição é fortalecida pelo fato daquele pigmento pràticamente não ficar adsorvido na coluna, como seria de se esperar do β-caroteno. Nenhuma identidade pôde, entretanto, ser atribuída com segurança ao pigmento da fração II. E' interessante assinalar a semelhança de seu espectro com aquêle do astaceno em piridina.

Um teste qualitativo para astaxantina (ver Métodos) foi aplicado à fração II (fração predominante) de carotenóides extraídos da hemolinfa e cromatografados no mesmo dia. A experiência visava testar a afirmação de TUNDISI et alii (1964) de que a astaxantina é o pigmento predominante na hemolinfa, embora a fração II não tivesse o comportamento na coluna esperado para astaxantina e nem o seu espectro (Cf. KUHN e SÖRENSEN, 1938). O resultado foi negativo.

B. Química do casulo coletivo de R. americana

1. Apresentação geral dos resultados

A composição geral do casulo III calculada a partir das análises quantitativas apresentadas nos ítens seguintes, é mostrada na Tabela VII. Os valores apresentados são médias de 3 determinações.

TABELA VII

Composição química do casulo coletivo de R. americana[1]

Constituinte	% do casulo em pêso
Material hidrossolúvel não identificado	4,3
Carboidrato solúvel[2]	2,4
Proteína solúvel[2]	4,4
$CaCO_3$ [3]	43,5
Galactosamina insolúvel[4]	1,9
Ácidos urônicos insolúveis[4]	0,2
Açúcares neutros insolúveis[4]	8,2
Proteína insolúvel[5]	33,6
Cinzas insolúveis [6]	4,3
Lipídeos	<1,0
Total [7]	102,8

1. A composição se refere ao casulo III, isto é, ao casulo acabado. Maiores detalhes no texto.
2. Proteínas ou carboidratos determinados na lavagem com água adicionados àqueles medidos na lavagem com ácido acético.
3. Assumindo corresponder ao material hidroinsolúvel e ácido acético solúvel. A massa de proteínas e carboidratos solúvel nessas condições foi subtraída.
4. Extrapolado para tempo zero de hidrólise ácida da fração do casulo remanescente após as lavagens em água e ácido (fração insolúvel do casulo).
5. Calculado a partir dos aminoácidos de hidrolizado ácido da fração insolúvel, extrapolado para tempo zero de hidrólise.
6. Determinadas na fração insolúvel do casulo.
7. Excluído lipídeos.

A análise abrangeu a totalidade dos componentes do casulo, exceção feita naturalmente a compostos que possam estar presentes em quantidades insignificantes. A característica mais notável do casulo é o seu alto conteúdo em $CaCO_3$ e em proteínas e carboidratos insolúveis em todos solventes utilizados (ver abaixo).

2. Solubilidade, conteúdo de cinzas e metais

Apenas uma pequena parcela do casulo é hidrossolúvel (Tabela VIII). Dessa fração 2,5% correspondem a proteínas e 1,6% do pêso sêco do casulo a carboidratos, remanescendo 4,3% de material hidrossolúvel não identificado.

A massa de material solúvel em ácido acético 10% após a lavagem com água é de 46,2% do pêso-sêco do casulo. Cêrca de 0,8%, em pêso sêco do casulo, dessa fração é carboidrato e 1,9% é proteína. A massa resultante de 43,5% do pêso sêco do casulo deve corresponder a $CaCO_3$ (ver abaixo).

Após as lavagens com água e ácido acético 10% sobram 45,4% do casulo. Essa fração foi denominada fração insolúvel do casulo (ver Métodos). Êsse material permanece insolúvel nos seguintes solventes empregados, tanto a quente (37°C) quanto a temperatura ambiente (22°C): SDS 10% (P/V), uréia 6M, ácido fórmico 50% (P/V), HCl 2N, KOH 1M e $NaHCO_3$ 1M.

TABELA VIII

Solubilidade e conteúdo de cinzas do casulo III de *Rhynchosciara americana**

Determinação	% em pêso-sêco do casulo
Massa hidrossolúvel	8,4
Massa hidroinsolúvel, Ácido acético solúvel	46,2
Massa insolúvel	45,4
Cinzas totais	32,5
Cinzas insolúveis**	4,3

* Para maiores detalhes consultar Métodos. Os resultados são médias de 3 determinações.

** Determinadas na fração insolúvel do casulo.

Os resultados mostram que existe massa considerável de cinzas no casulo e que a maior parte dessas é solúvel em ácido acético 10%, enquanto que a fração insolúvel é essencialmente orgânica. As análises de metais do casulo (Tabela IX) indicam que cálcio é o metal predominante, correspondendo a 19% do pêso-sêco do casulo; consequentemente, as cinzas das lavagens em ácido acético devem ser correspondentes a compostos de cálcio.

TABELA IX

Metais no casulo III de R. americana*

Metal	% do casulo (P/P)
Ca	19,0
Fe	0,108
Zn	0,024
Mg	0,002
Cu	0,002
K	0,001

* Para maiores detalhes consultar Métodos. Os resultados são médias de 3 determinações.

Um teste qualitativo para carbonatos realizado como descrito em Métodos, indicou a presença de quantidades consideráveis de carbonatos no casulo. Êsse resultado juntamente com os apresentados acima sugerem que porção hidroinsolúvel e ácido acético solúvel do casulo é carbonato de cálcio. Os cálculos apresentados a seguir mostram que a hipótese referida é bastante verossímel. Calculando todo o Ca presente no casulo como $CaCO_3$ resulta em 47,5%,que é similar à massa determinada como material hidroinsolúvel e ácido acético solúvel, após subtrair a massa de proteínas e carboidratos solúveis. Por outro lado, calculando as cinzas correspondentes a todo Ca presente no casulo resulta em 26,6%, que é bem próximo dos 28,8% presente nas lavagens do casulo, como seria de se esperar se pràticamente todo Ca estivesse na forma de $CaCO_3$.

3. Carboidratos

A hidrólise ácida do casulo é acompanhada por um amarronzeamento da solução. A curva de absorbância a 400 mμ (Figura 5) dá uma idéia da progressão de formação de um pigmento amarelo amarronzado. E' interessante observar que a maior parte do pigmento é formado nas primeiras 6 horas de hidrólise.

O pigmento amarelado (melanoidina) produzido durante a hidrólise e purificado como descrito em Métodos apresenta as seguintes propriedades: caráter altamente básico, a julgar pelo seu comportamento em Dowex-50, fluorescência azulada intensa em U.V. de comprimento de onda longo (315-380 mμ) e uma fluorescência fraca, mas também azulada em U.V. de comprimento de onda curto (200-280 mμ). Além disso o pigmento dá reação positiva com reagente de ELSON-MORGAN para hexosaminas, apresentando um espectro de absorção nessas condições com dois picos (Figura 6) As propriedades dêsse pigmento são similares aos produtos da "reação de Maillard" (Cf. ELLIS, 1959). Essa reação consiste em uma reação entre proteínas e carboidratos durante o aquecimento. Dessa forma, o incremento em melanoidinas observado durante a hidrólise do casulo (Figura 5) deve ser acompanhado de uma destruição dêsses, mais intensa no início e decrescendo depois de 6 horas. E' interessante observar que mesmo no tempo zero de hidrólise já existe uma pequena quantidade de melanoidina. E' possível que essa tenha sido formada ao se secar a amostra de casulo afim de se determinar o seu pêso-sêco antes da hidrólise. Reação de Maillard em amostras úmidas submetidas a aquecimento é fenômeno conhecido há já algum tempo (LEA, HANNAN e GREAVES, 1950; ELLIS, 1959).

A figura 5 mostra o resultado das determinações de carboidratos neutros na fração insolúvel do casulo III após vários tempos de hidrólise. A destruição dos açúcares neutros após 4 horas de hidrólise segue uma cinética de 1ª ordem. Se admitirmos que a destruição dos carboidratos segue a mesma velocidade desde o início da hidrólise, o que é bastante provável, a melhor determinação para açúcares neutros seria dada pela extrapolação gráfica da curva de cinética para tempo zero de hidrólise. Dessa forma a porcentagem em massa de açúcares neutros presentes na fração insolúvel seria de cêrca de 18%. A

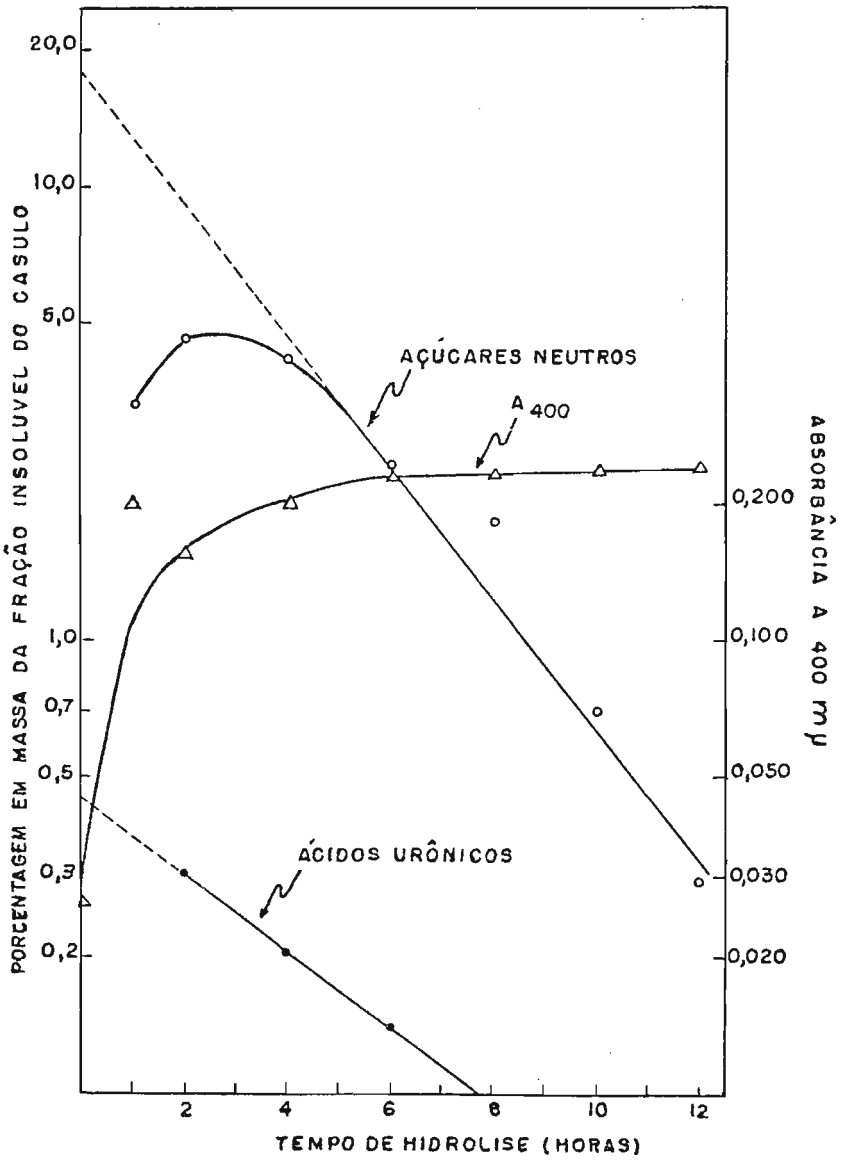

Figura 5 - Recuperação de açúcares neutros e ácidos urônicos após vários tempos de hidrólise da fração insolúvel do casulo III de R. americana e produção de melanoidinas nos mesmos tempos. Ver texto.

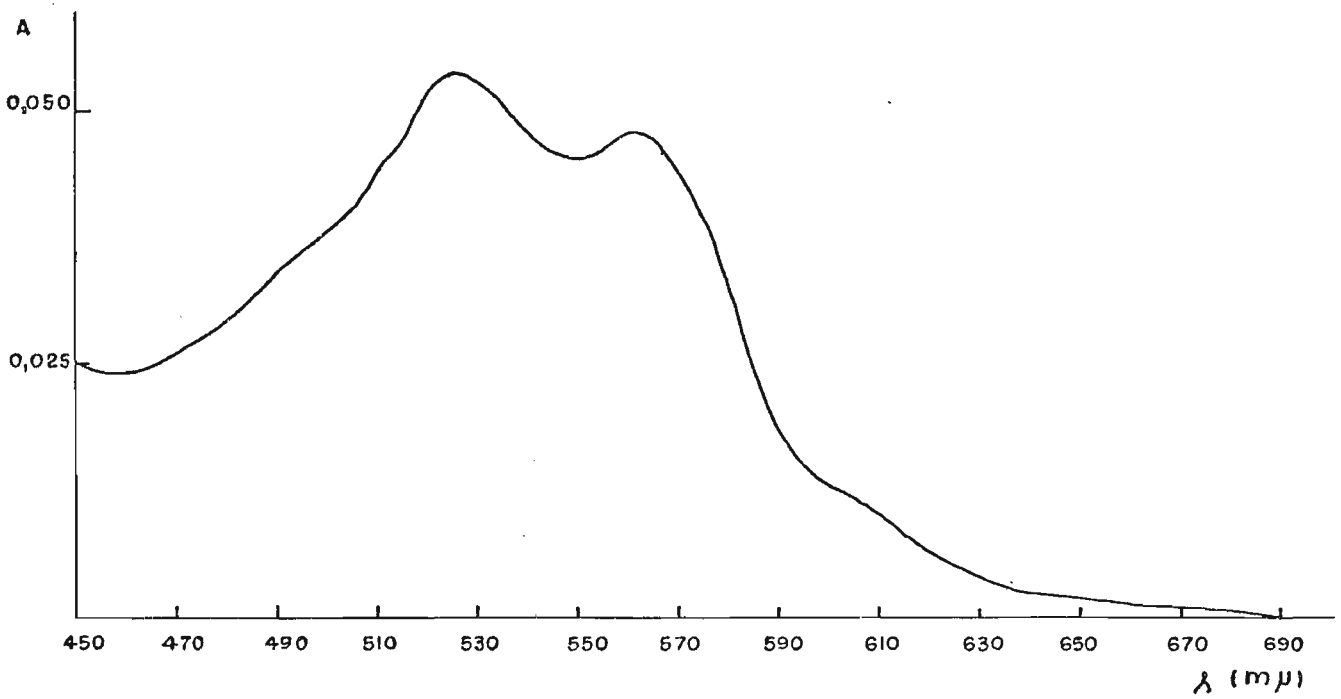

Figura 6 - Espectro de absorção do pigmento amarronzado (melanoidina) formado durante a hidrólise ácida da fração insolúvel do casulo III, após purificação em Dowex-50 e reação de Elson-Morgan. Ver detalhes em Métodos.

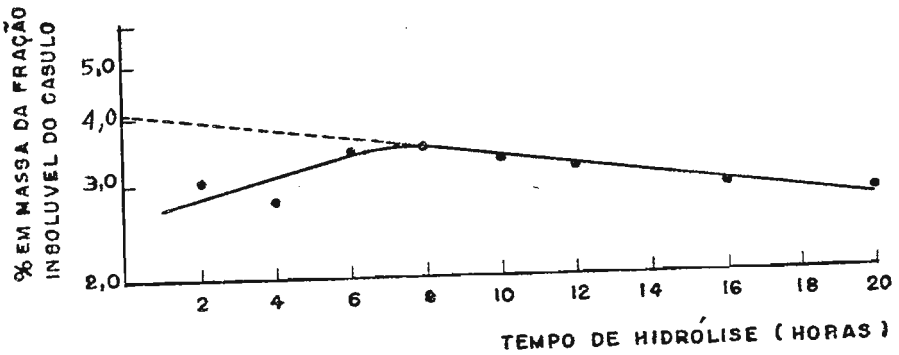

Figura 7 - Recuperação da galactosamina após vários tempos de hidrólise da fração insolúvel do casulo III de R. americana.

validade dessa extrapolação é apoiada ainda pelo fato dela estar de acôrdo com a previsão feita acima, baseando-se na formação das melanoidinas, de que a maior parte da destruição dos carboidratos deveria ocorrer antes de 6 horas de hidrólise.

O mesmo tipo de argumentação apresentado acima justifica a aceitação das extrapolações, para tempo zero de hidrólise, como a melhor determinação de ácidos urônicos (Figura 5) e galactosamina (Figura 7), que é a única hexosamina presente no casulo (ver abaixo). Os valores extrapolados para ácidos urônicos e galactosamina são, respectivamente: 0,45% e 4,1% da fração insolúvel do casulo.

Os resultados de cromatografias em papel feitas em dois sistemas solventes diferentes (2 cromatogramas em cada sistema) permitiram a identificação de glicose, galactose e galactosamina nos hidrolizados ácidos da fração insolúvel do casulo. Uma mancha pouco intensa, mas constante de todos cromatogramas e com elevada migração, não pôde ser identificada como nenhum dos carboidratos: ribose, xilose, manose, frutose, glicose, galactose, galactosamina, glicosamina, sorbose, N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina. A identificação de galactosamina como única hexosamina presente nos hidrolizados foi confirmada em 2 cromatogramas revelados com reagente de ELSON-MORGAN.

4. Compostos nitrogenados

Além de aminoácidos e galactosamina parece não ocorrer nenhum composto nitrogenado em quantidades significantes nos hidrolizados da fração insolúvel do casulo (Tabela X). O fato da soma do nitrogênio dos compostos nitrogenados identificados exceder o conteúdo de N total deve ser devido a conjugação de dois fatôres. O primeiro dêles é o fato de que o método de Kjeldahl clássico empregado, de tubo aberto, não permitir uma recuperação de N rigorosamente quantitativa, como corre com o método do tubo selado e nem tão precisa (JACOB,1965). Aliás, recuperações relativamente baixas de nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl foram também observados em cutículas de inse-

tos (HACKMAN e GOLDBERG, 1971) e em vários outros produtos naturais (STITCHER, citado em HACKMAN e GOLDBERG, 1971). Em vista disso, os valores para N-total mais exatos seriam mais elevados do que aquêles obtidos. O segundo fator a ser considerado é uma possível superestimativa do nitrogênio de aminoácidos como consequência de variações amostrais.

TABELA X

Compostos nitrogenados da fração insolúvel do casulo III de R. americana

Determinação	% em N da fração insolúvel
N de aminoácidos [1]	10,0
N de galactosamina [2]	0,3
Soma dos anteriores	10,3
N-total (Kjeldahl) [3]	8,7

1. Calculado a partir da análise de aminoácidos, após correção para tempo zero de hidrólise. Ver Métodos.

2. Calculado a partir do valor extrapolado para zero da Figura 7.

3. Média de 3 determinações realizadas como descrito em Métodos.

Ácido glutâmico, ácido aspártico, serina e treonina são os aminoácidos mais abundantes da fração insolúvel do casulo, juntos correspondendo a 42% do total de aminoácidos (Tabela XI). A composição de aminoácidos da fração insolúvel do casulo assemelha-se mais àquela do pupário de L. cuprina do que a qualquer outra apresentada na Tabela XI.

TABELA XI

Composição porcentual molar dos aminoácidos da fração insolúvel do casulo III de R. americana e de outros produtos de insetos

Aminoácido	% em moles				
	Casulo III R.americana[1]	Pupário L. cuprina[2]	Secreção Salivar C.tentans[3]	Fibroína P.cynthia[4]	Sêda tipo colágeno N.ribesii[5]
Ác.glutâmico	11,6	10,9	12,79	0,8	9,8
Ác.aspártico	10,9	9,1	6,18	3,5	5,8
Serina	10,2	8,3	9,39	5,1	11,0
Treonina	9,3	4,7	2,96	0,6	3,5
Glicina	8,1	13,1	4,51	31,4	27,5
Leucina	7,3	4,1	1,88	0,2	2,2
Alanina	6,4	8,0	10,54	47,8	13,8
Valina	6,0	6,6	2,84	0,6	3,8
Isoleucina	5,5	2,3	1,96	0,3	2,0
1/2 Cistina	4,5	1,5	12,88	-	-
Lisina	4,2	2,9	11,09	0,3	1,7
Tirosina	4,0	3,2	-	5,6	2,5
Fenilalanina	3,4	3,1	-	0,1	0,4
Prolina	3,1	7,8	2,49	0,3	9,7
Arginina	2,5	3,8	13,02	1,9	4,0
Histidina	2,0	3,9	-	1,5	0,5
Metionina	1,0	0,3	7,42	-	-
β-alanina	-	6,4	-	-	-
Hidroxilisina	-	-	-	-	1,8

1. As determinações foram realizadas em hidrolizados ácidos e corrigidas por perdas devido à hidrólise como descrito em Métodos.
2. Calculado a partir de GILBY e McKELLAR (1970).
3. Segundo GROSSBACH (1969).
4. Calculado a partir de LUCAS, SHAW e SMITH (1960).
5. Segundo LUCAS e RUDALL (1968).

5. Produção e composição do casulo em função do tempo

O pêso-sêco do casulo em distintas fases de sua produção é mostrado na TABELA XII. Conforme já foi apresentado em Métodos, o casulo III correspondente ao casulo já terminado, enquanto que o casulo II e casulo I correspondem ao casulo produzido até o início do 5º período e início do 4º período, respectivamente.

TABELA XII

Aumento do pêso-sêco do casulo ao longo do desenvolvimento*

Pêso-sêco do casulo mg/produzido/larva	Casulo
0,43	I
1,53	II
3,47	III

* Os valores determinados são médias de 3 determinações. Detalhes são encontrados em Métodos.

A alteração mais evidente que ocorre no casulo durante o desenvolvimento é um aumento porcentual da fração hidroinsolúvel-ácido acético solúvel, que foi admitida corresponder ao $CaCO_3$ (Tabela XIII). Ocorre também um grande aumento no conteúdo de Ca, como seria de se esperar na base do que já foi assumido acima e dos resultados apresentados no ítem B.2 anterior. Isso parece indicar que a deposição de $CaCO_3$ no casulo ocorre preferencialmente após o 4º período do 4º estádio.

TABELA XIII

Composição química do casulo em três etapas do desenvolvimento[1]

Determinação	Porcentagem do pêso-sêco do casulo		
	Casulo I	Casulo II	Casulo III
Material hidrossolúvel	3,0	3,1	8,4
$CaCO_3$ [2]	11,0	40,4	43,5
Ca	7,5	19,5	19,0
α-amino-N insolúvel[3]	5,18	2,49	2,46
Fração insolúvel [4]	84,2	54,5	45,4

1. Tôdas medidas, salvo indicação em contrário, são médias de três determinações. Procure Métodos para detalhes.
2. Assumido corresponder ao material hidroinsolúvel e ácido acético solúvel. A massa de proteínas e carboidratos solúvel nessas condições já foi subtraída.
3. Determinado por reação de ninhidrina após 8 horas de hidrólise alcalina da fração insolúvel do casulo. Os resultados são médias de duas determinações e nenhuma correção foi aplicada devido a destruição de aminoácidos sensíveis.
4. Material do casulo remanescente após lavagens com água e ácido conforme descrito em Métodos.

E' interessante notar também um aumento na fração hidrossolúvel do casulo III quando comparado com o II ou I. Isso pode estar relacionado com o fato do casulo III ser obtido no fim do período pré-pupal (pupa-farata), quando as larvas são de remoção difícil do casulo, sendo impossível evitar extravasamento de fluído exuvial de umas ou de hemolinfa de outras. Dessa forma, o incremento em material hidrossolúvel poderia ser derivado dos fluídos acima referidos, assim como das fezes que o animal elimina normalmente durante todo o feitio do casulo e que, consequentemente, ocorrem em maior quantidade no casulo III. Conforme já foi apresentado anteriormente, proteína é o componente majoritário da fração insolúvel do casulo III. Dessa forma as determinações de α-amino N insolúvel, permitem uma

comparação preliminar da composição da fração insolúvel nas três fases estudadas. Os resultados da Tabela XIII permitem calcular que a porcentagem de α-amino N na fração insolúvel dos casulos I, II e III é: 6,16, 4,57 e 5,40 respectivamente. Dessa forma pode-se admitir tentativamente que a composição da fração insolúvel do casulo varia um pouco com o desenvolvimento, sendo a fração do casulo I mais rica em proteínas e aquela do casulo II a mais pobre porcentualmente.

Tentar obter valores para o conteúdo de proteínas insolúveis a partir dêsses dados de α-amino N é arriscado. Entretanto, partindo dos valores de α-amino N para o casulo III, assumindo um pêso-molecular médio para o resíduo de aminoácido de 120 e considerando que a recuperação em um hidrolizado alcalino de albumina realizado e calculado como essas amostras de casulo é de 74%, obtemos um valor de cêrca de 28,6% para as proteínas insolúveis. Êsse valor concorda de forma razoável com aquêle obtido de forma mais rigorosa apresentado na Tabela VII.

A Tabela XIV mostra a massa produzida dos principais componentes do casulo nas três fases estudadas, enquanto que a Tabela XV mostra a velocidade de produção dêsses componentes, nas mesmas fases.

TABELA XIV

Produção dos componentes do casulo ao longo do desenvolvimento*

Composto	Intervalos estudados			
	3ºP——|4ºP	4ºP——|5ºP	5ºP——|pupa	Total
Proteína insolúvel	268	350	552	1170
Carboidrato insolúvel	82	106	170	358
$CaCO_3$	47	572	891	1510

* Os dados foram calculados das Tabelas XII e XIII, assumindo que a fração insolúvel dos casulos I eII tem a mesma composição que aquela do casulo III. Todos os resultados estão expressos em μg produzido/larva.

O intervalo de produção de casulo do 5º período até o dia anterior à muda pupal foi considerado, para fins de cálculo de velocidade de produção do casulo, como correspondente ao intervalo do 5º período até a última apólise larval. Essa consideração baseia-se no fato de que após essa apólise o inseto torna-se uma pupa farata, funcionando do ponto de vista fisiológico como uma pupa (HINTON, 1946), sendo então incapaz de continuar a produzir casulo. O número de dias correspondente aos intervalos: 3ºP —| 4ºP, 4ºP —| 5ºP e 5ºP —| pupa farata são: 5, 3 e 2 dias respectivamente. Às vêzes o intervalo 5ºP —| pupa farata dura 3 dias. Consequentemente as velocidades apresentadas na Tabela XV correspondentes a êsse intervalo podem estar um pouco superestimadas.

TABELA XV

Velocidade média de produção dos diferentes constituintes do casulo em três etapas de sua formação*

Composto	Intervalos estudados		
	3ºP—| 4ºP	4ºP—| 5ºP	5ºP —| pupa farata**
Proteína insolúvel	54	117	276
Carboidrato insolúvel	16	35	85
$CaCO_3$	9,4	191	446

* Dados calculados a partir da Tabela XIV. Maiores informações devem ser procuradas no texto. Todos os resultados estão expressos em µg produzidos/indivíduo/dia.

** Êsses valores podem estar um pouco superestimados. Ver texto.

Os resultados indicam que a produção de todos os componentes do casulo é mais intensa em tôrno do 5º período, especialmente entre o 5ºP e pupa farata. E' interessante assinalar o fato de que enquanto a produção de proteínas e carboidratos insolúveis é duas vêzes maior no intervalo 4ºP —| 5ºP em relação ao 3ºP —| 4ºP, a produção de $CaCO_3$ é 20 vêzes maior. Isso sugere uma independência entre os processos de produção de $CaCO_3$ e aquêles de produção de proteínas e carboidratos insolúveis. Entretanto, a velocidade de produção de $CaCO_3$, proteínas e carboidratos insolúveis é aumentada de maneira idêntica ao se passar do intervalo 4ºP —| 5ºP para 5ºP —| pupa farata.

C. Aspectos químicos e fisiológicos durante o 4º estádio de R. americana

1. Massa corpórea e volume de hemolinfa

A larva de R. americana aumenta ràpidamente de pêso até alguns dias depois da 3ª muda, isto é, até cêrca de 26 dias de idade (Figura 8). Em seguida ainda cresce logarìtmicamente até ficar madura, isto é, atingir o máximo desenvolvimento larval. A partir de então o inseto pára de comer e começa a produzir o casulo e a perder massa até a emergência do adulto (70 dias de idade). Uma inspecção na figura 8 mostra que os desvios das médias de massas medidas em larvas com menos do que 48 dias (com uma exceção) são pequenos. Êsse fato torna possível a utilização da presente curva para a estimativa da idade fisiológica de larvas, a partir da medida de sua massa. Essa estimativa é muito útil, especialmente para insetos recolhidos na natureza, porque antes dos 48 dias de idade existe apenas um marcador da idade fisiológica larval: a mudança de côr da larva, que ocorre em tôrno dos 32 dias de idade.

TOKUMARU, FERRI e WORSMANN (1968) obtiveram resultados muito discrepantes dos aqui apresentados, chegando a pesar indivíduos ainda na fase larval com 80 dias de idade, em contraste também com as observações de outros autores (Cf. GUARACIABA e TOLEDO, 1969). Essas diferenças encontradas por TOKUMARU, FERRI e WORSMANN, podem ser explicados por uma má termoestatização do ambiente de criação das larvas.

A determinação dos volumes de hemolinfa presente nas larvas e pupas de R. americana foi sempre realizado pelo método de exanguinação (Tabela XVI). Isto justifica-se pelo fato (ver comentários em Métodos) de que os resultados obtidos por esta técnica e pela técnica de diluição de corante serem semelhantes em larvas com idades inferiores a 35 dias (Tabela XVII).

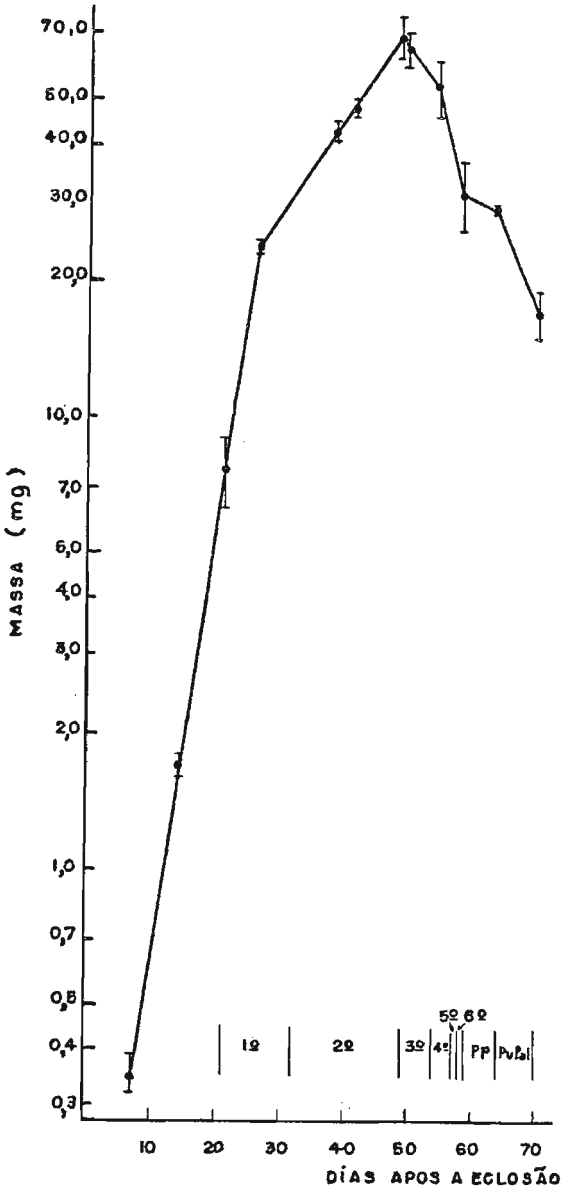

Figura 8 - Crescimento em massa de fêmeas de R. americana a 20°C. Os traços verticais representam o desvio padrão das médias indicadas, obtidas em 3 grupos independentes de insetos, após um mínimo de 5 determinações em cada. Embaixo são indicados, além da idade em dias após a eclosão, os intervalos correspondentes aos períodos do 4º estádio; 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, pré-pupal (PP), assim como do período pupal (ver detalhes em Métodos).

TABELA XVI

Volume, proteína, α-amino-N ácido solúvel e densidade na hemolinfa de R. americana durante o desenvolvimento larval*

Estádio	Período	Idade (dias)	Volume de hemolinfa µl/ larva	Massa de proteína µg/larva	α-amino N µ moles/larva	Densidade da hemolinfa g/ml
III	-	20	3,28	18	0,32	1,013
IV	1♀P	22	6,0**	32	0,53	-
	1♀P	27	9,5	54	0,91	1,023
	1♀P	30	13,6**	-	-	-
	2♀P	32	14,8	96	-	-
	2♀P	34	16,8**	151	2,02	-
	2♀P	35	17,2**	201	-	-
	2♀P	38	16,7	267	-	-
	2♀P	41	19,2	542	1,53	1,026
	2♀P	44	20,6	-	1,89	-
	2♀P	45	20,6	887	2,00	1,032
	2♀P	48	24,6	1700	2,31	1,043
	3♀P	49	17,9	1790	2,29	1,037
	4♀P	54	14,3	1890	1,30	1,058
	5♀P	57	9,4	1190	0,93	1,057
pupa	-	64	4,0	488	-	1,025

* - A metodologia empregada está descrita em Métodos.

** - Volumes estimados usando a razão $\frac{\text{volume de hemolinfa}}{\text{massa da larva}}$ (ver texto).

TABELA XVII

Volumes de hemolinfa em larvas de R. americana usando duas técnicas diferentes*

	Volume (µl/larva)	
Idade (dias)	Exanguinação	Diluição de corante
27	9,5	9,3
32	14,8	17,7

* Detalhes em Métodos.

A razão volume de hemolinfa e massa de larva é constante (0,401 ± 0,009 µl/mg) durante considerável parte do 4º estádio, isto é, de larvas com 22 dias até 42 dias de idade. Êsse fato permite a estimativa rápida do volume de hemolinfa de larvas não maduras, conhecendo sua massa.

A razão volume de hemolinfa e massa corpórea de larvas maduras é de 0,31 - 0,39 µl/mg, durante os períodos 3º, 4º e 5º ela é de 0,24 - 0,32 µl/mg e na pupa 0,11 - 0,15 µl/mg. Pode-se concluir então que o volume de hemolinfa diminui mais rápidamente do que o pêso-sêco do animal em pelo menos duas oportunidades. Isso indica que de larvas maduras para 3ºP e de 5ºP para pupa deve haver transferência de água da hemolinfa para os tecidos. Essa interpretação está de acôrdo com a hipótese levantada abaixo da hemolinfa servir como importante reservatório de água para o animal.

TABELA XVIII

Pêso-sêco e conteúdo de água das larvas de R. americana imediatamente antes do início e após o término do casulo

Determinação *	Período e idade (dias)	
	2ºP, 48	pré-pupal, 63
Pêso-sêco da larva	10,7	6,5
Água, total **	58,7	22,4
Água, hemolinfa**	22,9	3,7

* - Média de duas determinações. Resultados expressos em mg/larva.

** - Calculado a partir da diferença entre pêso-fresco e pêso-sêco da larva ou hemolinfa.

Os resultados apresentados na Tabela XVIII permitem calcular que a hemolinfa é responsável por 37% do pêso-fresco e 26% do pêso-sêco de larvas maduras, o que lhe garante uma importância, pelo menos quantitativa, na vida do inseto. Além disso, êsses resultados levam à conclusão de que a hemolinfa é importante reservatório de água para o animal, pois contém 39% da água das larvas maduras e contribui com 53% da água perdida pela larva durante a produção do casulo, isto é, entre o fim do 2º período e o período pré-pupal.

2. Determinações químicas na hemolinfa

Os resultados das determinações de proteína, carboidratos e α-amino-N ácido solúvel e densidade da hemolinfa encontram-se na Tabela XVI e Tabela XIX. Êsses mesmos resultados estão também representados na figura 9.

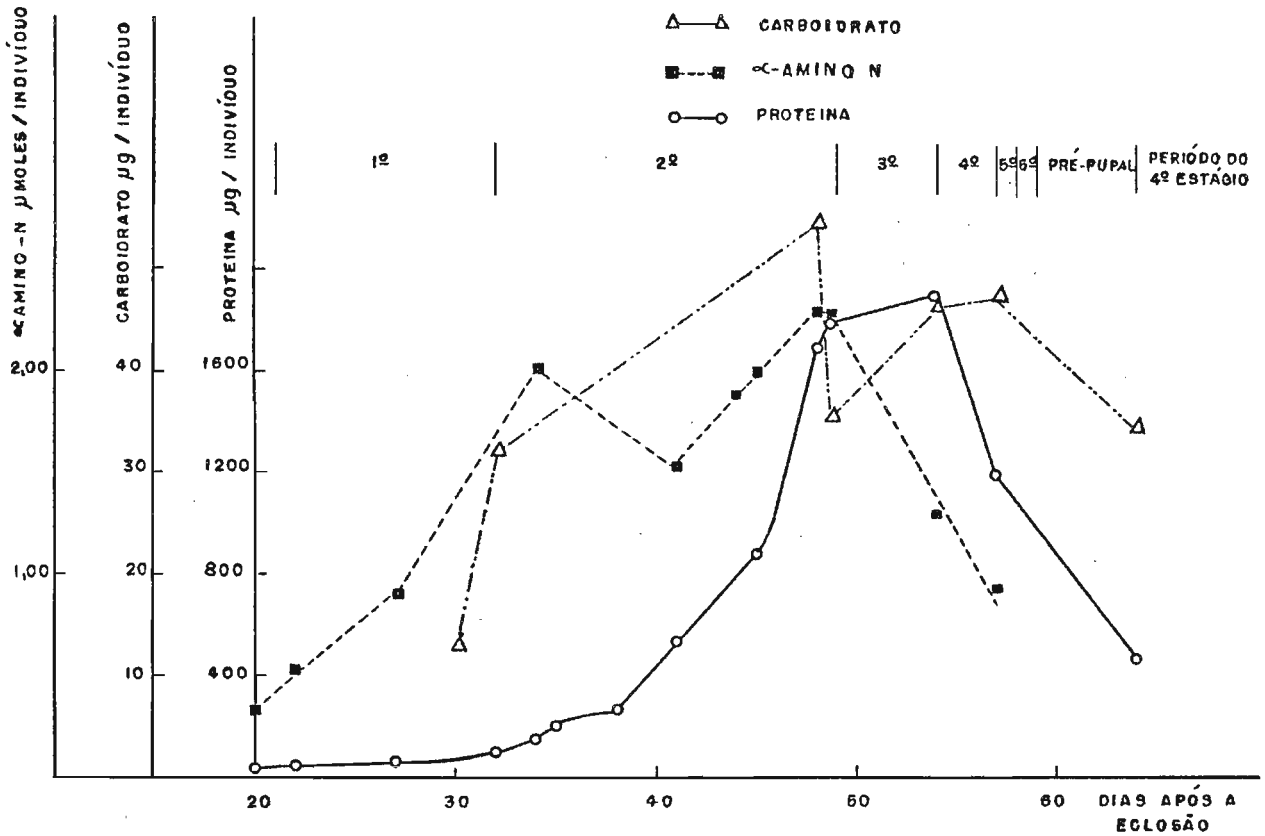

Figura 9 - Proteína, α-amino-N-ácido solúvel e carboidratos na hemolinfa de R. americana. Ver texto.

TABELA XIX

Conteúdo de carboidratos na hemolinfa durante o desenvolvimento de R. americana

Período	Idade (dias)	µg/indivíduo		
		Carboidrato	Trealose	Glicogênio
1ºP	30	13,1	11,4	0,0
2ºP	32	32,3	26,2	0,2
2ºP	48	49,4	34,4	0,3
3ºP	49	35,8	24,4	0,3
4ºP	54	46,5	28,2	0,2
5ºP	57	47,5	29,4	0,3
Pupa	64	34,6	27,6	-

Durante o 3º estádio e 4º estádio até a idade de 48 dias ocorre um acúmulo generalizado de compostos na hemolinfa, resultando em um aumento de sua densidade. Após o início da produção do casulo ocorre ainda um ligeiro aumento na massa de proteínas, seguido de uma queda grande até o fim do período estudado (pupa). Os compostos ninhidrina-positivos ácido solúveis (α-amino-N ácido solúvel) diminuem em massa desde o início da produção do casulo até a fase de pupa. Carboidrato total cai no início da produção do casulo (3ºP), em seguida retorna ao valor inicial e se mantém estável até a transformação em pupa quando cai novamente. Trealose é o carboidrato predominante na hemolinfa de R. americana durante todo o desenvolvimento larval, enquanto que glicogênio ocorre em massa insignificante.

O início da elevação do conteúdo de proteínas na hemolinfa (cêrca de 30 dias de idade), coincide com a acentuação da côr avermelhada das larvas o que marca o início do 2º período do 4º estádio.

TABELA XX

Composição de aminoácidos e peptídeos na hemolinfa de larvas de R. americana em vários períodos do 4º estádio*

Componente	μ moles.10^{-2}/larva		
	3ºP (49 dias)**	4ºP (54 dias)**	5ºP (57 dias)**
Arginina	1,38	0,86	0,75
Ácido aspártico	0,52	0,26	0,32
Treonina	24,28	12,60	8,35
Serina	7,13	2,54	0,85
Prolina	8,75	4,31	2,85
Ácido glutâmico	1,33	3,69	6,92
Glicina	2,70	2,09	1,36
Alanina	1,97	1,03	0,56
Valina	6,54	3,82	2,28
Metionina	0,38	0,22	0,17
Isoleucina	1,75	0,59	0,56
Leucina	2,68	1,13	1,04
Tirosina	5,26	3,68	3,06
Fenilalanina	0,39	0,30	1,37
Glutamina + Asparagina	5,60	5,42	2,71
Amônia	43,80	21,60	24,60
Lisina	4,09	2,56	3,44
Histidina	7,16	4,96	5,20
Triptofano	2,18	2,32	1,23
Fosfoetanolamina	0,49	0,18	0,37
Cistationina	0,30	0,57	0,57
Fosfoserina	0,24	0,12	0,15
Ornitina	4,55	2,45	1,47
Peptídeos	29,60	25,80	18,90
Total de aminoácidos	89,18	55,52	45,21
Total geral	163,07	103,10	89,08

* Os valores apresentados são médias de 3 determinações.

** Os números entre parênteses representam a idade cronológica em dias após a eclosão.

Os aminoácidos e peptídeos encontrados nos períodos 3º, 4º e 5º são os mesmos encontrados em larvas do 2º período com 45-48 dias. Nenhuma modificação qualitativa importante foi verificada.

Uma inspeção na Tabela XX permite a certificação de que a queda de α-amino N ácido solúvel observada durante a produção do casulo (figura 9) realmente correspondam a uma queda na massa de aminoácidos e peptídeos.

Os aminoácidos cuja massa mais cai entre 3ºP e 5ºP, são: treonina, prolina, serina e valina. Juntos êstes aminoácidos respondem por 70% da queda total dos aminoácidos (em moles) nesse intervalo de tempo. E' interessante notar que os referidos quatro aminoácidos, correspondem juntos a 29% em moles da protêina insolúvel do casulo III.

Os metais diminuem contínuamente em massa durante o final da vida larva, como pode ser observado na Tabela XXI.

TABELA XXI

Massa de metais na hemolinfa de R. americana em várias fases do desenvolvimento larval*

Período	Idade (dias)	µg/larva						
		Mg	Ca	Cu	Zn	Fe	Na	K
3ºP	49	6,57	3,46	0,103	-	-	12,40	9,92
4ºP	54	4,86	2,47	0,049	0,086	0,272	11,51	8,08
5ºP	57	2,90	1,63	0,036	0,057	0,152	7,45	5,20
Pré-pupal	63	1,06	0,59	0,045	0,032	0,081	-	-

* Todos os valores apresentados representam médias de três determinações.

Os resultados da Tabela XXII mostram que a despeito de alterações na composição química da hemolinfa de R. americana durante o final do desenvolvimento larval, a osmolaridade permanece contante. As variações de pH estão dentro das variações in-

dividuais, com a possível exceção daquela do 4º P, cujo pH parece realmente ser ligeiramente mais baixo que dos demais períodos.

Os valores para cloreto e amônia sofrem alterações durante o desenvolvimento.

TABELA XXII

Osmolaridade, pH, cloreto e amônia na hemolinfa de R. americana em diferentes idades*

Período	Idade (dias)	Concentração (mM) Cloreto	NH_3	Osmolaridade (m. osmoles)	pH
3ºP	49	18,3	24,5	217	7,31
4ºP	54	25,0	15,1	216	7,18
5ºP	57	23,0	26,2	209	7,28

* Todos os valores da Tabela representam médias de três determinações com exceção de pH, que corresponde a apenas uma determinação realizada a 25°C.

3. Pêso-sêco e glicogênio no corpo gorduroso

O corpo gorduroso de R. americana é formado por duas porções principais: uma central bastante volumosa e outra periférica disposta em pequenos aglomerados laterais organizados segmentarmente. Essa porção periférica apresenta massa muito pequena em relação ao corpo gorduroso central e é de dissecção difícil em larvas jovens. Devido a isso, sòmente o corpo gorduroso central foi pesquisado. Êsse aumenta em pêso-sêco durantodo o desenvolvimento da larva até essa atingir a maturidade, quando então passa a corresponder a 38% do pêso-sêco da larva (Tabela XXIII). Valores dessa magnitude são comuns em Holometabola (WIGGLESWORTH, 1965).

O conteúdo de glicogênio do corpo gorduroso é apreciável, crescendo até atingir um máximo no 4º período, quando corresponde a 18% do pêso-sêco do corpo gorduroso, declinando em seguida até pupa (Tabela XXIII).

TABELA XXIII

Pêso-sêco e glicogênio do corpo gorduroso central durante o desenvolvimento de R. americana*

Período	Idade (dias)	µg/indivíduo	
		Pêso-sêco	Glicogênio
1ºP	30	610	-
2ºP	32	1170	85
2ºP	44	2400	-
2ºP	48	4100	578
3ºP	49	4060	678
4ºP	54	4100	756
5ºP	57	3820	602
Pupal	64	3200	266

* Os resultados apresentados são médias de três determinações. Maiores informações, ver Métodos.

4. Pêso-sêco e metais nos túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi ocorrem em número de 4, desembocam dois a dois no tubo digestivo de R. americana e apresentam um conteúdo branco na sua porção proximal. Êsse conteúdo aumenta durante o desenvolvimento larval, atingindo um máximo na larva madura (2ºP, 48 dias de idade) e a partir daí começa a diminuir. Por ocasião da última apólise larval (início do período pré-pupal, cêrca de 59 dias de idade) os túbulos de Malpighi apresentam-se completamente vazios.

TABELA XXIV

Pêso-sêco dos túbulos de Malpighi antes e após a formação do casulo

Período	Idade (dias)	mg/indivíduo	
		Pêso-sêco	$CaCO_3$*
2ºP	48	1,39	1,35
Pré-pupal	53	0,09	-

* Calculado a partir do conteúdo de Ca apresentado na Tabela XXV.

A Tabela XXIV mostra o pêso-sêco dos túbulos de Malpighi repletos com o conteúdo branco na larva madura, e após o seu total esvaziamento, depois da última apólise larval. A diferença entre os dois valores permite estimar a massa do conteúdo branco: 1,30 mg/indivíduo.

O conteúdo branco dos túbulos de Malpighi torna-se efervescente em ácido acético 10%, o que sugere a presença de carbonatos. A ocorrência de carbonato de cálcio em túbulos de Malpighi já foi documentada em larvas de numerosos insetos, inclusive Diptera (CLARK, 1958).

A massa de cálcio presente nos túbulos de Malpighi é bastante grande, como pode ser vista na Tabela XXV. A partir dessa determinação de Ca pode-se estimar a massa de $CaCO_3$, presente nos túbulos de Malpighi: 1,35 mg/indivíduo. A concordância dêsse valor com a massa de conteúdo dos túbulos de Malpighi referido (Tabela XXIV), reforça a hipótese de que o conteúdo é realmente $CaCO_3$.

A massa de Ca presente no casulo III é similar àquela presente nos túbulos de Malpighi e muito superior à queda no conteúdo de Ca verificada na hemolinfa durante a produção do casulo (Tabela XXV). A semelhança entre o conteúdo de Ca no casulo III e nos túbulos de Malpighi deve ser ainda maior que a determinada experimentalmente, devido à impossibilidade de se remover os túbulos de Malpighi sem perda de uma pequena fração de seu conteúdo.

TABELA XXV

Determinação de metais nos túbulos de Malpighi em larvas maduras de R. americana e comparação com o conteúdo de metais do casulo III e com a queda dêsses verificada na hemolinfa durante a produção do casulo

Metais	µg/indivíduo		
	Hemolinfa [1]	Malpighi [2]	Casulo III [3]
Zn	-	1,30	0,83
Cu	0,058	0,17	0,056
Ca	2,61	540	660
K	-	36	0,031
Mg	5,51	76	0,056
Fe	-	5,0	3,75

1. Queda durante a produção do casulo. Calculado a partir das Tabelas V, XVI e XXI.

2. Determinado em animais do 2º período, 48 dias de idade. Maiores informações, ver Métodos.

3. Calculado a partir das Tabelas IX e XII.

DISCUSSÃO

A. Química da hemolinfa

1. Extensão da análise realizada

A Tabela XXVI apresenta uma compilação de resultados já apresentados, porém agora na forma adequada para se estimar a extensão coberta pela análise realizada da hemolinfa de larvas maduras de *R. americana*. Como se vê, a análise abrangeu cêrca de 88% do pêso-sêco da hemolinfa, o que coloca *R. americana* entre os insetos de hemolinfa melhor conhecida, próximo a *Bombyx mori* e *Hyalophora cecropia* cujas hemolinfas são conhecidas em cêrca de 96 e 92% de seu pêso-sêco, respectivamente (WYATT, 1961).

A fração não identificada da hemolinfa de *R. americana* deve corresponder, entre possíveis outros compostos, a ácidos orgânicos (ver abaixo, ítem 3) e a carboidratos ligados às proteínas. Esta última suposição está baseada no fato de que proteínas conjugadas a carboidratos ocorrem em concentrações elevadas em insetos (SIAKOTOS, 1960a). Tais carboidratos parecem ser responsáveis por parte dos componentes determinados usualmente como glicogênio (WYATT, 1961) e pela observação de TOLEDO FILHO (1969) que encontrou reação PAS positiva nas 9 bandas protéicas separadas por eletroforese em gel de agar da hemolinfa de larvas de *R. americana*.

TABELA XXVI

Composição porcentual em massa do resíduo sêco da hemolinfa de larvas maduras de R.americana*

Composto	mg/ml	% pêso-sêco
Proteína	69,00	61,5
Aminoácidos	8,22	7,3
Lipídeos	5,20	4,6
Peptídeos	4,23	3,8
Citrato	3,91	3,5
Compostos fosforilados orgânicos não identificados	2,77	2,5
Metais	2,71	2,4
Carboidratos	2,01	1,8
Cloreto	0,48	0,4
Ortofosfato	0,30	0,3
Fosfoetanolamina	0,18	0,2
Glicogênio	0,01	0,0
Total	99,02	88,3
Pêso-sêco	112,30	100,0

* Os valores apresentados foram calculados a partir das tabelas II e V. A concentração dos compostos fosforilados orgânicos não identificados foi calculada a partir de dedeterminação de P-orgânico ácido solúvel (P-ácido solúvel-P-inorgânico) da Tabela V, assumindo que êste representa 15% em pêso dos referidos compostos, seguido da subtração do título de fosfoetanolamina e fosfoserina. Ver discussão no texto.

2. Componentes orgânicos da hemolinfa

TUNDISI et alii (1964) em uma análise qualitativa dos aminoácidos livres da hemolinfa de R. americana utilizando cromatografia em papel, identificaram 15 aminoácidos e 2 peptídeos. Seus resultados estão de acôrdo com aquêles apresentados na figura 1, embora nenhuma correlação possa ser feita entre os peptídeos por êles identificados e aquêles apresentados na referida figura. O fato dos referidos autores não terem encontrado metionina, fenilalanina, triptofano, arginina, fosfoserina, cistationina além de 11 outros compostos ninhidrina-positivos, certamente se deve à menor resolução e sensibilidade de seu sistema analítico em relação ao utilizado nesta tese.

O conteúdo de aminoácidos na hemolinfa de R. americana é bastante elevado, como foi indicado em Resultados e vários dêles merecem uma discussão particular.

Cistationina acumula-se na hemolinfa de R. americana em concentrações superiores até que a metionina, enquanto que não se detecta nem mesmo traços de cisteína ou cistina (Tabela II). Isso poderia ser explicado admitindo-se que a cistationina deriva-se da metionina e que ela não é clivada em cisteína e homoserina devido a ausência da enzima apropriada, como parece ser o caso de Bombyx mori (GILMOUR, 1965). Isso indicaria que cisteína é um aminoácido essencial para R. americana como já foi demonstrado no Diptera Nematocera Aedes (GOLDBERG e De MEILLON, 1948).

Arginina é requerida na dieta de todos insetos estudados, podendo ser substituída parcialmente por citrulina, mas não por ornitina, o que levou a se propor a não ocorrência do passo ornitina ——> citrulina e consequentemente de um ciclo da ornitina completo em insetos (GILMOUR, 1961). Os resultados obtidos por INOKUCHI, HORIE e ITO (1969) usando marcadores radioativos dão uma evidência direta de que o referido passo não ocorre, pelo menos em Bombyx mori. A presença de ornitina e uréia poderia ser explicada, entretanto, pela ação da arginase sôbre a arginina exógena, porque arginase (EC 3.5.3.1) ocorre nos corpos gordurosos de vários insetos pesquisados (GILMOUR, 1965). A uréia poderia ser formada ainda a partir de ácido alantóico sob ação da

alantoicase (EC 3.5.3.4), como ocorre com o grilo Acheta domestica (GILMOUR, 1965). Nenhuma informação existe sôbre a possibilidade da ornitina se derivar do ácido glutâmico ou prolina, como ocorre em vários animais (Cf. GLIMOUR, 1965).

A partir do exposto acima, pode-se admitir que o acúmulo de ornitina verificado na hemolinfa de R. americana e a ausência de traços de citrulina seja consequência da formação de ornitina a partir da arginina exógena e sua impossibilidade de poder dar origem à arginina, devido a inexistência do passo ornitina ——> citrulina. A uréia presente em traços de hemolinfa poderia ter surgido pela arginase (EC 3.5.3.1) ou, menos provàvelmente, pela alantoicase (EC 3.5.3.4), como descrito acima.

As concentrações de tirosina na hemolinfa de R. americana são bastante elevadas, chegando a 3,26 mM no 5º período, que corresponde aproximadamente ao limite de solubilidade da tirosina em água a 25°C (0,05% P/P). Entretanto, concentrações ainda mais elevadas foram encontradas na hemolinfa de larvas de outros Diptera como Calliphora augur (7,41 mM, segundo HACKMAN, 1956) e na larva inteira de Phormia regina, onde a concentração da tirosina livre é tão elevada, cêrca de 10 vêzes o limite de solubilidade da tirosina em água, que LEVENBOOK e DINAMARCA (1966) propuseram que "in vivo" a tirosina deve ocorrer no estado sólido. Essas concentrações elevadas de tirosina devem estar relacionadas com o papel dêsse aminoácido como precursor dos fenóis que intervêm na formação do pupário e/ou de nova cutícula (GILMOUR, 1965). Como Calliphora e Phormia produzem um pupário, enquanto que R. americana não o faz, seria mesmo de se esperar que as primeiras possuíssem um conteúdo maior de tirosina em relação a essa última.

Taurina é encontrada frequentemente na hemolinfa de insetos e deve-se originar a partir da descarboxilação do derivado oxidado da cisteína, o ácido cisteico, e não possui nenhuma função conhecida em insetos (GILMOUR, 1965). Recentemente vários experimentos tem sugerido a possibilidade de taurina atuar como um neurotransmissor semelhante ao ácido γ-amino butírico em mamíferos (Cf. DAVISON e KACZMAREK, 1971). E' possível que o mesmo ocorra em insetos, embora ainda não exista nenhum estudo a respeito.

O ácido α-amino-n-butírico deve originar-se da alimentação vegetal, embora possa surgir a partir da degradação da metionina (GILMOUR, 1965).

O ácido γ-amino-n-butírico, resulta da descarboxilação do ácido glutâmico, enquanto que nenhum dado existe a respeito da biossíntese da β-alanina; ambos devem ser substâncias transmissoras do sistema nervoso central em insetos (GILMOUR,1965) e β-alanina tem sido implicada também nos processos de esclerotização de cutículas (HACKMAN e GOLDBERG, 1971).

Fosfoetanolamina e possìvelmente fosfoserina também devem estar relacionados com a síntese e degradação de fosfatídeos. E' interessante notar que fosfatidiletanolamina é o fosfatídeo predominante em Diptera, como por exemplo: Phormia regina (BIEBER et alii, 1961) e Musca domestica (CRONE e BRIDGES, 1963).

A função dos aminoácidos livres presentes em tão elevadas concentrações na hemolinfa ainda não está bem esclarecida (CHEN, 1966), exceptuando-se aquela de alguns aminoácidos particulares como tirosina, como já foi comentado. Algumas funções foram, entretanto, atribuídas aos aminoácidos livres da hemolinfa e, segundo CHEN (1966), são: precursores de síntese protéica, participação em mecanismos de detoxificação, tamponamento e osmorregulação. O caso mais conhecido da utilização dos aminoácidos livres da hemolinfa como precursores de síntese protéica é na biossíntese da sêda por Bombyx (WYATT, 1961). O papel dos aminoácidos na osmorregulação parece estar relacionado com o fato dos insetos possuírem uma baixa concentração de íons inorgânicos (FLORKIN e JEUNIAUX, 1964; ver também ítem A3, abaixo). Adiante, ítem B2, será apresentada alguma evidência indireta de que os aminoácidos livres da hemolinfa de R. americana participam na síntese do seu casulo.

A ocorrência de peptídeos na hemolinfa de larvas de insetos é fenômeno generalizado (CHEN, 1966). Entre os Diptera existem, entretanto, diferenças quanto aos tipos de peptídeos presentes. Enquanto que em Drosophila os peptídeos são geralmente ácidos, de cadeia relativamente longa (Cf. MITCHELL e SIMMONS, 1962), aquêles presentes em Phormia regina são de cará-

ter básico ou neutro e predominantemente compostos de dois aminoácidos (Cf. LEVENBOOK, 1966).

Os peptídeos presentes na hemolinfa de R. americana são do tipo observado em Phormia regina, isto é, predominantemente básicos ou neutros e compostos de pequeno número de resíduos de aminoácidos.

O significado bioquímico dos peptídeos da hemolinfa não é conhecido com segurança. LEVENBOOK (1966) a partir da observação do desaparecimento dêsses peptídeos em Phormia regina por ocasião da pupação sugeriu a possibilidade dêstes funcionarem como uma reserva de aminoácidos, que seriam utilizados nos processos de histogênese na pupa. E' possível, entretanto, que êsses peptídeos tenham também funções mais específicas, como por exemplo o peptídeo sexual de Drosophila melanogaster, que é produzido nas glândulas acessórias do macho e transferido para as fêmeas na cópula, aumentando a ovoposição nessas (CHEN e BÜHLER, 1970).

As proteínas da hemolinfa são sintetizadas principalmente pelo corpo gorduroso (SHIGEMATSU, 1958; 1960; PRICE e BOSMAN, 1966), embora outros órgãos como o intestino aparentemente sejam também responsáveis pela síntese de pelo menos parte dessas proteínas (ROTH e PORTER, 1964; CHIPPENDALE, 1970).

Várias funções tem sido atribuídas às proteínas da hemolinfa. Segundo SIAKOTOS (1960a, b) as proteínas da hemolinfa transportam carboidratos e lipídeos dos sítios que os armazenam para outros em que serão utilizados. Pelo menos em alguns insetos, as proteínas da hemolinfa funcionam como fornecedoras de aminoácidos para a manutenção da osmolaridade da hemolinfa (WYATT, 1961).

De acôrdo com LEVENBOOK (1950b) as proteínas da hemolinfa são responsáveis por cêrca de 62% do poder tamponante total da hemolinfa de Gastrophilus.

A presença de numerosas enzimas entre as bandas proteicas separadas por eletroforese de amostras de hemolinfa foi demonstrada primeiramente por LAUFER (1960a, b), embora atividades enzimáticas já tivessem sido detectadas na hemolinfa por numero-

sos outros investigadores anteriores (Cf. FLORKIN e JEUNIAUX, 1964; CHEN, 1966). Mais recentemente foi detectado e purificado um complexo multienzimático da hemolinfa de maripôsas, que parece ser tomado intacto por tecidos em histólise, contribuíndo ali para a degradação do DNA (RIECHERS, MEYERS e BERRY, 1969). Entretanto, uma das funções das proteínas da hemolinfa que mais tem atraído a atenção dos pesquisadores recentemente é a de servirem como precursoras diretas ou indiretas das proteínas tissulares durante a metamorfose, para a constituição do adulto, além de contribuírem na formação do vitelo dos ovócitos em desenvolvimento, conforme já foi comentado na Introdução.

Em R. americana a função melhor estabelecida para as proteínas da hemolinfa é sua participação na produção do casulo, que será discutida em detalhe, no ítem 2B, abaixo. Os resultados de BIANCHI (1972) sugerem ainda a possibilidade de uma das proteínas da hemolinfa de R. americana participar na vitelogênese, como ocorre com grande número de insetos. Por outro lado a demonstração por TOLEDO FILHO (1969) de que as 9 bandas protéicas da hemolinfa de R. americana separáveis por eletroforese em gel de agar dão reações positivas para carboidratos poderiam indicar uma participação no transporte de carboidratos, como sugerido por SIAKOTOS (1960a, b) em Periplaneta americana.

Os lipídeos encontram-se na hemolinfa de insetos associados a proteínas, através de ligações específicas principalmente na forma de diglicerídeos (CHINO e GILBERT, 1965; GILBERT, 1967a), embora ocorra exceções onde os lipídeos são transportados principalmente como triglicerídeos (MARTIN, 1969). Os resultados desta tese não permitem concluir qual é a forma lipídica predominante na hemolinfa de R. americana, embora uma estimativa de fosfolipídeos e lipídeos neutros possa ser feita.

Os fosfatídeos são de regra responsáveis pela maior parte do P-lipídico em Diptera (GILBY, 1965) e como êles contêm aproximadamente 4% em pêso de fósforo é possível estimar a massa de fosfolipídeos presentes na hemolinfa de R. americana, simplesmente multiplicando o conteúdo de P-lipídico determinado (Tabela V) por 25. Êsse cálculo resulta em 2,55 mg de fosfolipídeos/ml de hemolinfa.

A concentração de lipídeos neutros por sua vez, pode ser calculada a partir do conteúdo lipídico total (Tabela v) e da estimativa de fosfolipídeos feita acima, resultando em 2,05 mg de lipídeos neutros/ml de hemolinfa.

Os compostos fosforilados presentes na hemolinfa de larvas maduras de R. americana são fosfolipídeos (discutidos acima), ortofosfato, fosfoproteínas e componentes da fração orgânica ácido solúvel. Nesta fração sômente dois compostos fosforilados foram identificados e quantificados nesta tese; fosfoserina e fosfoetanolamina (Tabela II). Os compostos orgânicos fosforilados ácidos solúveis não identificados podem ser, entretanto, estimados se for assumido que êles possuem um conteúdo médio de P similar ao observado em compostos dessa fração em outros insetos, isto é, 15% em pêso (WYATT, 1961). O resultado dêsse cálculo é apresentado na Tabela XXVI.

Os compostos fosforilados orgânicos e ácido solúveis são muito importantes para o tamponamento da hemolinfa de insetos (LEVENBOOK, 1950b) e para o seu balanço ânion-cátion (WYATT, LOUGHHEED e WYATT, 1956; LEVENBOOK, 1950a). A importância dêsses compostos no balanço ânion-cátion da hemolinfa de R. americana pode ser apreciada na Tabela XXVIII uma vez que fosfato ácido solúvel é um dos principais ânions da hemolinfa e é constituído principalmente de compostos orgânicos como pode ser demonstrado a partir da Tabela V.

A concentração de citrato na hemolinfa de larvas de R. americana é bastante elevada e êste ânion corresponde a cêrca de 47% de todos ânions detectados na hemolinfa dêste inseto (Tabela XXVIII). Concentrações elevadas de citrato na hemolinfa foram observadas em vários outros insetos e trabalhos realizados em Prodenia eridania indicam que o citrato é de origem endógena e que seria acumulado juntamente com outros ácidos orgânicos devido a uma desproporção entre a biossíntese e a oxidação e/ou utilização dêsses ácidos (LEVENBOOK e HOLLIS, 1961 ; LEVENBOOK, 1961).

3. Composição molar da hemolinfa e seus componentes inorgânicos

A composição molar da hemolinfa permite estimar a contribuição porcentual de cada componente para a osmolaridade total da hemolinfa. A Tabela XXVII mostra os resultados calculados para a hemolinfa de *R. americana*.

TABELA XXVII

Composição molar da hemolinfa de larvas maduras de R. americana[1]

Composto	mM	% do total
Aminoácidos	62,62	26,2
Mg	45,30	19,0
Na	33,70	14,1
Ácido cítrico	18,60	7,8
K	17,30	7,2
Cloreto	13,40	5,6
Compostos fosforilados orgânicos não identificados[2]	13,32	5,5
Peptídeos	12,78	5,4
HCO_3^-	6,90	2,9
Trealose	4,10	1,7
Carboidratos não identificados[3]	3,39	1,4
Ca	3,23	1,4
Ortofosfato	3,13	1,3
Fosfoetanolamina	1,31	0,5
Total	239,08	100,0
Osmolaridade (miliosmoles)	216	-

1. Os valores apresentados foram calculados a partir das tabelas II e V, com as exceções indicadas. Ver discussão no texto.
2. Calculado a partir da Tabela XXVI.
3. Calculado como glicose, a partir da diferença entre as concentrações de carboidrato total e trealose, apresentadas na Tabela V.

Amônia não se encontra representada na Tabela XXVII, devido à possibilidade de que o seu elevado título seja um artefato (ver Tabela II e comentários a ela referente em Resultados). Similarmente ali não se encontram os valores para Fe, Cu e Zn, por ocorrerem em concentrações muito baixas (ver Tabela V). As proteínas, embora presentes em elevada concentração, quando expressas em massa por volume, são osmòticamente de efeito desprezível, em relação aos componentes representados na Tabela XXVII e por isto também não foram ali apresentadas.

A soma das concentrações molares dos componentes da hemolinfa é maior do que a sua osmolaridade total. Essa diferença deve ser real, porque possíveis superestimativas dos compostos não determinados diretamente, como os compostos fosforilados orgânicos não identificados e os carboidratos não identificados, não seriam suficientes para corresponder à diferença observada. Além disso, se amônia ocorrer realmente na concentração determinada, ou o seu eventual precursor, a diferença entre a concentração molar total e a osmolaridade da hemolinfa seria ainda maior. A explicação mais simples para essa diferença é admitir que alguns componentes não sejam osmòticamente ativos por estarem complexados a outros. Essa possibilidade voltará a ser explorada abaixo ao se discutir o balanço ânion-cátion da hemolinfa.

A contribuição osmótica dos íons inorgânicos e aminoácidos da hemolinfa pode ser analisada com maior facilidade através da figura 10. Nesta figura A, B, e D representam os principais padrões iônicos inorgânicos nos insetos Pterygota, segundo SUTCLIFFE, conforme citado por FLORKIN e JEUNIAUX (1964). Segundo êsse mesmo autor, A representa o tipo considerado mais primitivo, caracterizado por concentração elevada de íons inorgânicos e baixa concentração de aminoácidos; D é considerado o tipo mais evoluído, apresentando elevada concentração de aminoácidos e baixa concentração de íons inorgânicos e, finalmente, B é um tipo intermediário que é usual nas ordens: Megaloptera, Neuroptera, Mecoptera, Trichoptera e Diptera. R. americana representada por C, possui um padrão bem de acôrdo com aquêle usual para Diptera (B) isto é, quase 50% da pressão osmótica é devido a cátions inorgânicos, cloreto é um ânion de importância relativamente pequena e o papel osmótico dos aminoácidos é elevado.

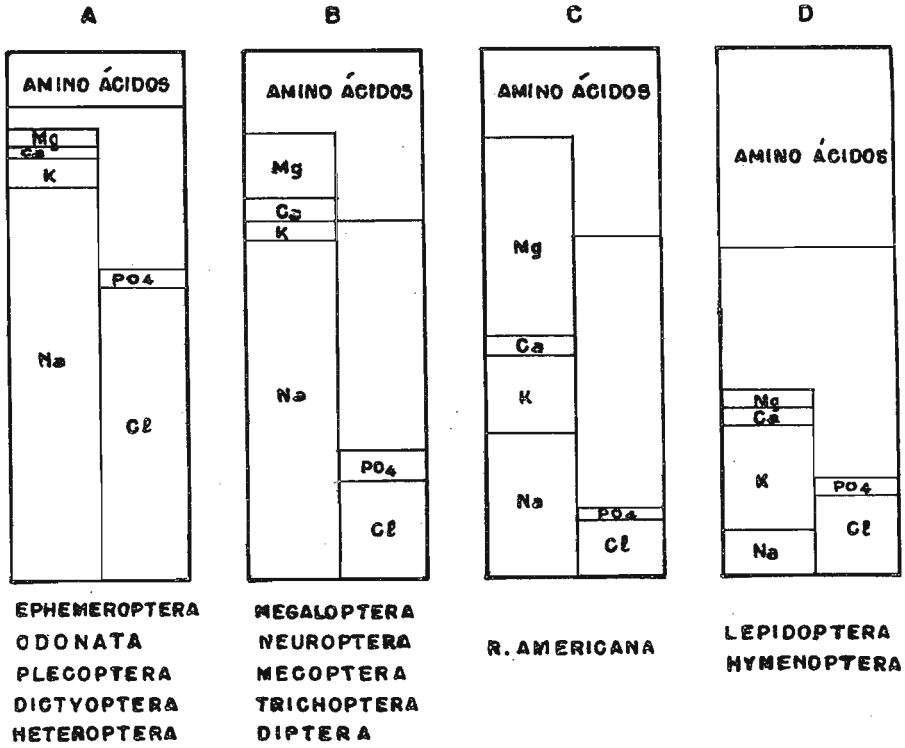

Figura 10 - Efeitos osmóticos de componentes inorgânicos ilustrados como porcentagens da concentração molar total da hemolinfa de insetos Pterygota. Cada bloco na figura é visualizado como duas seções verticais, cada uma destas correspondendo a 50% da concentração molar total. As contribuições porcentuais dos cátions são ilustrados na seção à esquerda, enquanto que os ânions à direita. Os aminoácidos são representados, na medida do possível em igual proporção em ambas seções. As áreas em branco correspondem a componentes não indicados. A, B e D estão representados de acôrdo com SUTCLIFFE segundo FLORKIN e JEUNIAUX (1964). C foi calculado a partir da Tabela XXVII.

Algumas diferenças notáveis existem, entretanto, entre R. americana e o padrão de Diptera apresentado. São elas: um nível muito elevado de Mg e K, e um nível relativamente baixo de Na. Segundo BONÉ (1944), insetos carnívoros tenderiam a ter um conteúdo elevado de Na, enquanto que os insetos fitófagos, um conteúdo elevado de K e Mg em sua hemolinfa de tal forma que a razão molar Na/K nos insetos fitófagos é menor ou próximo de 1, e nos carnívoros bem acima de 1 (cêrca de 5 a 15 de regra). Essa explicação dietética para os diferentes padrões catiônicos existentes encontra, entretanto, várias exceções, conforme ressaltado pelo próprio BONÉ. Apesar disso, essa hipótese é aplicável a numerosos insetos e é possível que o alto conteúdo de K e Mg na hemolinfa de R. americana, em relação ao padrão de Diptera apresentado (figura 10,B), seja devido aos seus hábitos fitófagos, enquanto que a maioria dos insetos utilizados para a elaboração do padrão de Diptera apresentado são carnívoros (Cf. FLORKIN e JEUNIAUX, 1964).

A razão molar Na/K na hemolinfa de larvas maduras de R. americana é de 1,95, que é relativamente próximo da unidade, como seria de se esperar para um inseto fitófago.

A elevada concentração de K presente na hemolinfa de muitos insetos parece incompatível com uma função neuromuscular normal, especialmente porque, segundo CARRINGTON e TENNEY (1959), todo K encontra-se na forma livre e fisiològicamente ativo na hemolinfa. Experimentos electrofisiológicos indicaram, entretanto, que a bainha em tôrno das fibras nervosas dos insetos atua como eficiente barreira de difusão, fazendo com que o fluído imediatamente em contacto com as fibras nervosas possua uma composição iônica diferente daquela da hemolinfa (Cf. NARAHASHI, 1963). Mais tarde foi demonstrado que essa diferente composição era mantida pela bainha não por ser esta impermeável aos íons, mas por ser capaz de manter um equilíbrio dinâmico adequado entre os íons da hemolinfa e do fluído circundante das fibras nervosas (Cf. NARAHASHI, 1963). Entretanto, mesmo a existência dessa bainha não explica a insensibilidade de certos insetos a variações iônicas extremas (GILMOUR, 1965).

A figura 10 permite observar que a maior parte dos cátions presentes na hemolinfa de R. americana devem ser neutrali-

zados por ânions orgânicos, porque a contribuição de ânions inorgânicos é muito pequena. O balanço ânion-cátion pode ser, entretanto, melhor analisado pela Tabela XXVIII.

TABELA XXVIII

Balanço ânion-cátion na hemolinfa de larvas maduras de R.americana[1]

Cátions			Ânions		
Composto	meq/l	% total	Composto	meq/l	% total
Mg^{++}	91	61	Citrato^{---}	56	47
Na^{+}	34	23	Fosfato ácido solúvel[2]	27	23
K^{+}	17	11	Proteinato[3]	16	13
Ca++	6	4	Cloreto^{-}	13	11
Fe^{++}	1	1	HCO_3^{-}	7	6
Total	149	100	Total	119	100

1. Os valores apresentados foram calculados a partir da Tabela XXVII e arredondados para o número inteiro mais próximo.

2. Calculado assumindo uma dissociação primária de 100% e uma secundária de 50%.

3. Estimado assumindo que a carga líquida por mol das proteínas da hemolinfa fôsse igual à albumina plasmática bovina no pH da hemolinfa e que seu pêso molecular fôsse idêntico ao desta. Nos cálculos foram utilizados os dados revistos por FOSTER (1960), para albumina bovina plasmática.

As estimativas de fosfato e proteinato devem ser consideradas apenas aproximativas. Amônia, que no pH da hemolinfa estaria na forma de NH_4^{+}, não foi incluída na Tabela pelas mesmas razões que não o foi na Tabela XXVII, isto é, pela possibilidade da alta concentração encontrada ser um artefato. A Tabela XXVIII mostra claramente que o principal ânion é constituído por ácidos orgânicos,principalmente citrato. E' interessante notar que

há um excesso de cátions em relação ao de ânions,que poderia ser explicado pela ocorrência de cátions ligados a proteínas ou aminoácidos e pela ocorrência de compostos ácidos não determinados. Os aminoácidos poderiam contribuir muito pouco no valor do pH da hemolinfa :essa contribuição seria para os cátions, não para os ânions. A demonstração de que 15-20% do cálcio e magnésio da hemolinfa estão ligados a proteínas em Telea polyphemus (CARRINGTON e TENNEY, 1959) favorece à idéia de que o desbalanço iônico observado é devido principalmente a uma fração dos cátions que não estaria livre.

Se fôr admitido que a diferença observada entre cátions e ânions da Tabela XXVIII corresponde a cátions que não estão livres, seria possível explicar também a discrepância entre a concentração molar total estimada da hemolinfa e sua determinação direta, apresentada na Tabela XXVII.

A osmolaridade da hemolinfa permanece constante durante a produção do casulo, embora haja uma queda generalizada em massa por indivíduo dos componentes da hemolinfa (Tabela XXII). Essa constância parece ser consequência da pequena variação, que é ainda mùtuamente compensada, da concentração molar dos componentes que juntos perfazem cêrca de 80% da osmolaridade total da hemolinfa (Tabela XXIX). Deve-se notar, entretanto, que os metais sofrem uma redução, não balanceada pelo aumento de outros componentes da hemolinfa, entre o 2ºP e 3ºP sem haver uma queda correspondente na osmolaridade da hemolinfa. Êste resultado está de acôrdo com a hipótese levantada acima de que parte dos cátions não está na forma livre, mas ligada a outras moléculas e seria explicado se o decréscimo no conteúdo de metais ocorrer devido à perda dos cátions ligados.

TABELA XXIX

Osmolaridade e concentração milimolar dos componentes osmòticamente mais ativos da hemolinfa de larvas de R. americana durante o desenvolvimento*

Período	Idade (dias)	mM				miliosmoles
		Metais	Aminoácidos	Peptídeos	Cloreto	Osmolaridade
2º P	48	100,0	62,6	12,8	13,4	216
3º P	49	64,3	56,1	16,5	18,3	217
4º P	54	68,3	38,8	18,0	25,0	216
5º P	57	66,2	48,1	20,1	23,0	209

* Valores reproduzidos ou calculados das Tabelas II, V, XX, XXI e XXII.

4. Coagulação e escurecimento

A hemolinfa de larvas de R. americana não coagula espontâneamente. Êsse comportamento é semelhante ao padrão IV de reações observadas na hemolinfa após a sua retirada do inseto descrito por GRÉGOIRE (1951). Êsse padrão é comum em Hemiptera Heteroptera, alguns Coleoptera, alguns Hymenoptera e em Diptera adultos, embora as poucas larvas de Diptera estudadas apresentam outro padrão, envolvendo coagulação da hemolinfa (Cf. GRÉGOIRE e TAGNON, 1962).

A hemostasia no padrão IV de insetos é realizada principalmente pela formação de hemocitos aglutinados na ferida, de forma aparentemente análoga àquela verificada na hemostasia de mamíferos através da aglutinação de plaquetas (GRÉGOIRE e TAGNON, 1962).

O escurecimento e floculação da hemolinfa após diluição com água destilada, similar ao observado em larvas maduras de R. americana, foi reportado em Choristoneura (SCHMIDT e YOUNG, 1971), mas o fenômeno permanece obscuro. Uma hipótese explica

tiva, pelo menos para o escurecimento, é admitir a ocorrência em condições normais de um inibidor da tirosinase (EC 1.10.3.1) que deixaria de ser efetivo após a diluição, de forma análoga ao inibidor de trealase (EC 3.2.1.28) da hemolinfa da Phormia regina por FRIEDMAN (1961).

5. Pigmentos

A hemolinfa de larvas de R. americana maduras possuem pelo menos 7 pigmentos ligados a proteínas. Os mais importantes quantitativamente são: uma cromoglicoproteína de côr limão, cujo pigmento fluorescente de natureza desconhecida está fortemente ligado à proteína e dois carotenóides prêsos por ligações fracas a proteínas. Um dêsses carotenóides parece ser o β-caroteno e o outro, mais abundante, possui um espectro similar, mas não idêntico,ao do astaceno. TUNDISI et alii (1964) propuseram baseando-se em resultados cromatográficos, e espectrográficos que o principal pigmento da hemolinfa de larvas maduras seria astaxantina e outro pigmento também importante seria um similar ao β-caroteno. A presença dêsse último foi confirmado no presente trabalho, enquanto que a ocorrência de astaxantina não foi observada. Uma explicação possível para a discrepância poderia ser uma má interpretação dos resultados por TUNDISI et alii (1964), como consequência de ter feito os espectros em dissulfeto de carbono, onde astaxantina e astaceno apresentam espectros similares de uma única banda e não em piridina, onde astaceno apresenta um único pico de absorção, enquanto que astaxantina apresenta três (KUHN e SÖRENSEN, 1938). Uma outra possibilidade seria da astaxantina ter sido oxidada a astaceno nas condições usadas de extração e cromatografia nesta tese, o mesmo não ocorrendo com os citados autores. Esta possibilidade, entretanto, é muito remota porque a oxidação da astaxantina pelo ar é favorecida sòmente em meio alcalino e, com exceção das experiências em que as amostras foram prèviamente saponificadas os meios usados eram sempre neutros.

BASILE et alii (1970) identificaram três pigmentos na hemolinfa de larvas selvagens de R. americana, usando eletroforese em agarose, cujas côres eram: limão, tijolo e violeta. Isolou também um mutante recessivo, ligado ao sexo que apresen-

tava apenas o pigmento côr de limão da hemolinfa. O pigmento côr de limão observado deve corresponder à cromoglicoproteína côr de limão descrita nesta tese, enquanto que o pigmento côr de tijolo e violeta devem corresponder, respectivamente, a proteínas associadas ao β-caroteno e ao carotenóide similar a astaceno. A referida associação deve ser específica, porque BASILE et alii (1970) encontraram os pigmentos distribuídos em bandas discretas e com migração reproduzível na eletroforese.

Os carotenóides de insetos são derivados do alimento diretamente, ou após ligeiras alterações na molécula (GOODWIN, 1954; CROMARTIE, 1959). O β-caroteno de hemolinfa de R. americana provàvelmente deve provir da dieta, enquanto que o carotenóide similar ao astaceno poderia ser derivado do β-caroteno, de maneira análoga à astaxantina que, segundo GOODWIN (1949), é derivada do β-caroteno em Schistocerca gregaria ou como os ceto-carotenóides de Leptinotarsa decemlineata que são todos derivados do β-caroteno recebido na dieta (LEUENBERGER e THOMMEN, 1970). A partir dêsses fatos, três interpretações são possíveis para a mutação limão de R. americana, referida acima. A primeira interpretação pode ser imaginada admitindo-se que a mutação tenha afetado a capacidade da larva de absorver os dois pigmentos carotenóides. Entretanto, como essa absorção é geralmente específica (GOODWIN, 1954) é pouco provável que uma única mutação tenha causado essa situação. A segunda interpretação possível é admitir que se trate de uma dupla mutação afetando a capacidade da larva de absorver os dois carotenóides do alimento. Por fim, a terceira interpretação é considerá-la consequência de uma mutação afetando a capacidade da larva absorver β-caroteno, admitindo ainda, que o carotenóide similar ao astaceno seja derivado do β-caroteno. Esta última interpretação tem a seu favor o fato de admitir apenas uma mutação para explicar toda a situação encontrada, o que está mais de acôrdo com o comportamento de fator mendeliano simples dessa mutação.

Os carotenóides não tem nenhuma função específica conhecida em insetos, embora seja admitido um papel na reprodução, devido a sua presença nos ovos (GOODWIN, 1954). Êsse papel é de valor duvidoso em R. americana, porque no mutante limão, os ovos são amarelo-limão (BASILE, 1970), denunciando a ausência de caro

tenóides (os ovos de fêmeas selvagens são alaranjados).

A origem e função do pigmento fluorescente de côr limão é completamente obscura, principalmente porque a sua natureza química é desconhecida. E' interessante notar que a sua presença foi detectada na secreção salivar de larvas de R. americana (BIANCHI, 1972) e é possível que se encontre também nos ovos, a julgar pela coloração dêstes no mutante limão.

B. Produção do casulo coletivo por larvas de R. americana

1. Química do casulo

A fiação do casulo inicia-se com a formação de filamentos bem definidos junto aos quais a larva deposita um material semelhante a fezes. Mais tarde o espaço entre fios são preenchidos por um material amorfo, membranoso, visível mesmo depois da retirada de $CaCO_3$ por ácido acético. Êste material membranoso, juntamente com o filamentar fazem parte, portanto, do que tem sido chamado fração insolúvel do casulo. Esta fração corresponde à sêda de R. americana (ver ítem 2 abaixo), e a Tabela XI representa a sua composição aminoacídica. BIANCHI (1972) fêz a determinação da composição aminoacídica da secreção salivar da larva madura de R. americana. Esta secreção é responsável pela origem dos filamentos que são formados logo no início da produção do casulo, referidos acima. Como os seus resultados são similares àqueles obtidos com o casulo terminado isso sugere que a parte fibrosa e membranosa da fração insolúvel do casulo tem a mesma composição ou que a parte fibrosa predomina de tal forma sôbre a amorfa que mascara a eventual composição peculiar desta última.

Os tipos principais de sêda conhecidos são constituídos principalmente de fibroína, colágeno, quitina, cuticulina ou poliglicina (RUDALL e KENCHINGTON, 1971). A composição da sêda de R. americana, representada pela composição da fração insolúvel do casulo, é principalmente protéica, não podendo portanto, ser do tipo cuticulina ou quitina. A Tabela XI mostra que a sêda

de R. americana não pode ser do tipo poliglicina, pois tem muito menos do que 66% dos aminoácidos como glicina, bem como não pode ser também do tipo fibroína ou colágeno. E' notável, entretanto, a semelhança de sua composição com aquela de proteínas cuticulares, a julgar pela sua semelhança com a composição aminoacídica do pupário de Lucilia cuprina (Tabela XI). Como se sabe o pupário de Diptera Cyclorrhapha é derivado da epicutícula e endocutícula externa da larva madura (WHITEN, 1957). Parece, portanto, que a sêda de R. americana representa um tipo ainda não descrito de sêda, embora guarde semelhanças com a porção protêica das sêdas quitinosas, as quais segundo RUDALL (1962) estariam associadas com proteínas similares àquelas da cutícula. O fato da sêda de R. americana apresentar um conteúdo relativamente elevado de hexosaminas aumenta estas semelhanças, embora a hexosamina presente seja galactosamina e não N-acetilglicosamina e deva ainda ser levado em consideração o seu conteúdo relativamente elevado de carboidratos neutros.

A sêda de Camptochironomus possui uma composição aminoacídica muito diferente daquela de R. americana (Tabela XI), embora os dois gêneros estejam relativamente próximos taxonômicamente. Isso talvez esteja relacionado com o fato de Camptochironomus não produzir um casulo sedoso verdadeiro e possuir hábitos aquáticos bem distintos, portanto, daquêles de R. americana. Segundo LUCAS, SHAW e SMITH (1960) é possível que o tipo de ambiente em que o inseto pupe e suas características peculiares explique a diversidade das sêdas.

A função dos casulos de insetos formados por ocasião da pupação é a de oferecer proteção à pupa contra choques mecânicos, variações de temperatura, dessecamento e ataques de predadores (IMMS, 1957). DREYFUS et alii (1951) puseram em dúvida a função do casulo em R. americana como um protetor contra o dessecamento, baseando-se no ambiente úmido em que são normalmente encontradas as larvas dêste inseto. Entretanto, a sua objeção parece não ter procedência, porque embora as larvas sejam encontradas em ambientes úmidos, os casulos muitas vêzes têm sido encontrados no campo em locais sêcos.

2. Origem dos componentes do casulo

A produção do casulo exige um enorme esfôrço da larva de R. americana, pois durante a sua produção essa perde 62% de seu conteúdo aquoso e 39% de seu pêso-sêco. Sòmente a constituição do casulo em si consome cêrca de 29% de seu pêso-sêco. Resultados surpreendentes como êsse foram observados também em outros insetos, como Bombyx mori, em que cêrca da metade das proteínas da larva madura é usada para fazer o casulo (WIGGLESWORTH, 1965).

Uma consequência do expôsto acima é que a observação das alterações químicas na hemolinfa e em vários órgãos da larva deve permitir a identificação dos precursores dos componentes do casulo. Essa identificação seria dificultada se a maior parte das secreções formadoras do casulo fôssem sintetizadas e armazenadas durante o período de alimentação da larva. Entretanto, como será mostrado abaixo, e já foi brevemente referido na Introdução, êsse não é o caso em R. americana.

Os componentes hidrossolúveis do casulo devem provir, pelo menos em parte, de contaminações pelo fluído exuvial e/ou hemolinfa das larvas durante a coleta dos casulos, além das fezes eliminadas pelo animal durante o feitio do casulo, conforme já comentado em Resultados. Devido a isto, êsses componentes não mais serão considerados aqui. Os principais componentes do casulo cuja origem deve então ser traçada são: $CaCO_3$ e as proteínas e carboidratos insolúveis.

A hipótese formulada em Resultados de que o composto efervescente, contendo cálcio, observado nos túbulos de Malpighi deve ser $CaCO_3$, encontrou confirmação nos estudos histoquímicos de MARQUES (informação pessoal). Esta mostrou a ocorrência de cristais de carbonato de cálcio no lúmen da porção proximal dos túbulos de Malpighi das larvas de R. americana. A ocorrência dêsses cristais e com essa mesma localização já havia sido demonstrada em outros insetos, inclusive em Diptera (CLARK, 1958). A partir dessa demonstração e uma inspeção nas Tabelas XXIV e XXV, torna-se possível admitir com segurança que o $CaCO_3$ do casulo provêm dos túbulos de Malpighi. O acúmulo de carbonato de cálcio nos túbulos de Malpighi durante o desenvolvimento larval e a sua posterior eliminação encontra paralelo em vários in-

setos e tem sido interpretado como um mecanismo de excreção de cálcio (CLARK, 1958).

As cinzas insolúveis, determinadas no casulo devem provir também dos túbulos de Malpighi. E' possível que sejam compostos de cálcio diferentes de $CaCO_3$. Essa hipótese é levantada com base no excesso de $CaCO_3$ calculado a partir do conteúdo de Ca do casulo quando comparado com o $CaCO_3$ calculado a partir do material hidroinsolúvel e ácido acético solúvel do casulo (Tabela VIII e IX e texto correspondente). O composto de cálcio mais provável a corresponder às cinzas insolúveis é fosfato de cálcio, que já foi encontrado nos túbulos de Malpighi de várias larvas de insetos (CLARK, 1958).

A fração insolúvel do casulo corresponde à sêda de R. americana, produzida pelas glândulas salivares. Essa conclusão resulta da observação direta de que o casulo é feito por uma sêda produzida por essas glândulas salivares (labiais) e um material similar a fezes. Êste material similar a fezes deve corresponder pelo menos em parte, ao $CaCO_3$, que provém dos túbulos de Malpighi, enquanto que a sêda deve corresponder ao restante da composição do casulo, isto é, à fração insolúvel. Uma evidência a favor disto é o fato do casulo I, que apresenta pouco material similar a fezes e é quase que sòmente feito por fios de sêda, ser formado principalmente pela fração insolúvel (Tabela XIII). Além do mais, a composição da sêda, obtida a partir de determinações químicas da secreção salivar colhida pouco antes do início do processo de fiação (fim do 2º período do 4º estádio) mostra que ela é rica em proteínas com composição aminoacídica similar àquela das proteínas insolúveis do casulo III (BIANCHI, 1972). Além disso, a massa média de proteínas secretadas pela glândula salivar, por dia, em vários períodos da produção do casulo, concorda bastante bem com os incrementos médios diários da proteína do casulo, medidos nos mesmos períodos. Êsses incrementos para os intervalos de 3ºP —| 4ºP, 4ºP —| 5ºP e 5ºP —| Pupa farata são: 54, 117 e 276 µg/dia/larva, respectivamente (Tabela XV), enquanto que as massas de secreção protéica, produzidas por dia, pela glândula salivar nos mesmos intervalos são: 42, 102 e 90 µg/dia/larva, respectivamente (BIANCHI, 1972). A discrepância nos resultados correspondentes ao último intervalo seguramente é inferior à apre-

sentada, porque o resultado obtido no casulo pode estar superestimado (Tabela XV) enquanto que aquêle da glândula salivar deve estar subestimado (BIANCHI, 1972).

O conteúdo de carboidratos da secreção é, entretanto, bem inferior ao determinado no casulo III (BIANCHI, 1972). Essa discrepância parece ser consequência de uma mudança na composição da fração insolúvel durante o desenvolvimento, no sentido de aumentar o seu conteúdo de carboidratos (Tabela XIII e texto correspondente). Uma outra hipótese para explicar a diferença no conteúdo de carboidratos encontrada entre o casulo e secreção salivar seria admitir que a larva de R. americana produzisse sêda também pelo túbulo de Malpighi. Êsse fenômeno ocorre em vários Coleoptera e Neuroptera (WIGGLESWORTH, 1965) e está relacionado com modificações do túbulo de Malpighi e no reto, como as descritas por MAZZI e BACCETTI (1956) para Donus crinitus (Coleoptera). Como essas modificações não ocorrem em R. americana (MARQUES informação pessoal), o túbulo de Malpighi em R. americana não deve ter nenhuma atividade secretora de compostos para o casulo, além do $CaCO_3$ e, portanto, tôda a sêda deve ser produzida nas glândulas salivares.

Segundo BIANCHI (1972) a glândula salivar no início do processo de fiação possui no máximo 136 µg de proteínas de secreção acumulada por larva. Como o casulo produzido por larva contém cêrca de 1170 µg de proteínas na fração insolúvel (Tabela XIV) pode-se concluir que o animal acumula apenas cêrca de 10% de tôda sêda que vai utilizar para fazer o casulo antes de parar de comer e iniciar a fiar. A larva de B. mori comporta-se de maneira radicalmente diferente, a maior parte da secreção de sua sêda (cêrca de 70%) é sintetizada e armazenada antes do animal parar de comer (FUKUDA et alii, 1959). Êsse comportamento diferencial deve estar ligado , pelo menos em parte, às diferenças anatômicas entre as glândulas labiais dos dois insetos. Enquanto que as glândulas labiais (sericígenas) de B. mori apresentam na sua porção mediana um reservatório considerável para a secreção (LUCAS, SHAW e SMITH, 1958), as glândulas labiais (salivares) de R. americana apresentam apenas um lúmen relativamente estreito e de diâmetro pouco variável ao longo da glândula (DREYFUS et alii, 1951).

O fato de 90% da sêda de R. americana ser sintetizada após o animal parar de comer, torna razoável procurar identificar a origem de seus componentes através de análises químicas na hemolinfa e em vários órgãos durante a sua produção. O intervalo mais adequado para êsse estudo é entre o 4ºP e o 5ºP. Antes do 4ºP os resultados tendem a ser prejudicados pela existência de reserva de secreção na glândula e após o 5ºP devem surgir alterações químicas relacionadas com a apólise e transformação do animal em uma pupa farata.

A Tabela XXX mostra o balanço de proteínas ou seus precursores na hemolinfa e em órgãos de R. americana que juntos correspondem a 71% do pêso-sêco total da larva madura. Como os túbulos de Malpighi correspondem a 13% do pêso-sêco da larva e são formados quase que exclusivamente de $CaCO_3$ (Tabela XXIV e discussão acima), pode-se dizer que o balanço de proteínas ou seus precursores é conhecido em 84% do pêso-sêco da larva. Os 16% do pêso-sêco da larva não estudados correspondem principalmente a cutículas, traquéias, parede muscular e tubo digestivo. Entretanto, como as cutículas moles de larvas de Diptera apresentam cêrca de 50-60% em quitina (RUDALL, 1963; HACKMAN, 1964), e as traquéias e o revestimento do intestino contêm quitina (WIGGLESWORTH, 1965), a porcentagem do pêso-sêco larval não estudada que pode fornecer precursores de proteínas desce abaixo de 16%. Dessa forma a Tabela XXX pode ser considerada como representando um balanço bem completo das proteínas e seus precursores entre os períodos indicados.

A Tabela XXX e a argumentação acima tornam muito difícil admitir que as proteínas insolúveis do casulo não derivem, pelo menos em parte, das proteínas da hemolinfa. O decréscimo de todos precursores, excluído as proteínas da hemolinfa é de 199 µg/larva, enquanto que nêsse período são sintetizados 350 µg/larva de proteínas insolúveis do casulo.

Se cisteína for aminoácido essencial para R. americana, como foi sugerido no ítem A2 acima, sua presença nas proteínas insolúveis do casulo (Tabela XI) só poderia ser explicada adequadamente, admitindo-se que essas proteínas são feitas, pelo

menos parcialmente, a partir das proteínas da hemolinfa. Isso é necessário porque a hemolinfa não possui cisteína livre (Tabela II) e nem ligada a peptídeos (Tabela III).

TABELA XXX

Balanço dos possíveis contribuintes de precursores das proteínas insolúveis do casulo e incremento dessas, no intervalo do 4ºP ao 5ºP do 4º estádio de R. americana[1]

Possível contribuinte ou Proteínas do casulo	µg/larva	
	decréscimo	incremento
Proteína da glândula salivar[2]	0	-
Aminoácidos da glândula salivar[3]	38	-
Aminoácidos da hemolinfa[4]	12	-
Peptídeos da hemolinfa[4]	23	-
Corpo gorduroso[5]	126	-
Proteínas da hemolinfa[6]	700	-
Proteínas insolúveis do casulo[7]	-	350

1. Discussão no texto.
2. Segundo BIANCHI (1972).
3. Calculado a partir da hipótese de que a concentração de aminoácidos livres da glândula salivar é a mesma da hemolinfa e que a densidade dessa glândula é 1,00.
4. Calculado a partir da Tabela XX.
5. Decréscimo do pêso-sêco do corpo gorduroso, após subtração do decréscimo do conteúdo de glicogênio no mesmo período. Calculado a partir da Tabela XXIII.
6. Calculado a partir da Tabela XVI.
7. Retirado da Tabela XIV.

BIANCHI (1972) propôs a partir de eletroferogramas da secreção salivar e da glândula salivar "in vivo" e "in vitro", em diferentes períodos larvais, assim como a partir de cinéticas de incorporação de aminoácidos marcados em proteínas da glândula salivar em diferentes circunstâncias, que cêrca de 60% das proteínas da secreção salivar (que corresponde à fração insolúvel do casulo, ver acima) provêm diretamente das proteínas da hemolinfa, enquanto que os outros 40% são sintetizados na própria glândula. Esta síntese utilizaria os aminoácidos livres da glângula salivar e/ou hemolinfa ou as proteínas da hemolinfa após a sua hidrólise.

Se parte da síntese de proteínas da secreção salivar é feita a partir dos aminoácidos da hemolinfa, seria de se esperar um reflexo dessa síntese na composição aminoacídica da hemolinfa. Em Resultados foi ressaltado o fato de que aquêles aminoácidos cuja queda em moles, ao passar do 3ºP ao 5ºP correspondem a 70% do total da queda dos aminoácidos da hemolinfa são justamente aquêles que perfazem 29% da proteína insolúvel do casulo III. Se fôrem considerados apenas os aminoácidos essenciais, os resultados tornam-se ainda mais reveladores. Os aminoácidos essenciais que mais diminuem em moles, por ordem decrescente de grandeza, na hemolinfa entre o 3ºP e 5ºP são: treonina, valina, isoleucina, leucina (Tabela XX); enquanto que aquêles aminoácidos essenciais que ocorrem em maior quantidade no casulo são, por ordem decrescente: treonina, leucina, valina e isoleucina (Tabela XI). Como se vê, os resultados são indicativos de que pelo menos parte da síntese de proteínas do casulo é feita a partir de aminoácidos livres da hemolinfa, enquanto que a outra parte deriva das proteínas da hemolinfa.

A ocorrência de uma concentração protéica na hemolinfa das larvas de R. americana maior do que a apresentada pela maioria das larvas de insetos (Tabela V), talvez seja consequência de uma adaptação dêsse animal, pelo fato dessas proteínas serem utilizadas em parte na produção do casulo.

A síntese dos carboidratos insolúveis do casulo pela glândula salivar tem que utilizar, como precursores imediatos, carboidratos presentes na glândula salivar ou na hemolinfa. Os demais carboidratos antes de poderem ser utilizados na síntese

tem que ser primeiro liberados na hemolinfa. Os carboidratos que podem ser liberados na hemolinfa após hidrólise incluem a quitina cuticular e o glicogênio presente nos vários tecidos como corpo gorduroso, masculatura e células do tubo digestivo. A quitina cuticular, entretanto, só é hidrolizada sob a ação do fluído exuvial e seus produtos transferidos para a hemolinfa, nas vésperas da muda pupal (BADE e WYATT, 1961), enquanto que o glicogênio que é mais fàcilmente mobilizado para a hemolinfa na forma de trealose, pertence ao corpo gorduroso (KILBY, 1963).

TABELA XXXI

Balanço dos possíveis contribuintes de precursores dos carboidratos insolúveis do casulo e incremento dêsses no intervalo do 4ºP ao 5ºP do 4º estádio de R.americana[1]

Possível contribuinte ou Carboidratos do casulo	µg/larva	
	decréscimo	incremento
Glândula salivar [2]	18	-
Hemolinfa[3]	-	10,7
Glicogênio do corpo gorduroso[4]	154	-
Carboidratos insolúveis do casulo[5]	-	106

1. Ver discussão.
2. Segundo BIANCHI (1972)
3. Calculado a partir da Tabela XIX
4. Calculado a partir da Tabela XXIII
5. Retirado da Tabela XIV

A Tabela XXXI mostra o balanço dos possíveis contribuintes de precursores dos carboidratos insolúveis do casulo. Conforme pode-se concluir da Tabela XXXI e da argumentação acima, o glicogênio do corpo gorduroso é o grande fornecedor de precursores de carboidratos.

O corpo gorduroso é capaz de sintetisar trealose e liberá-la para a hemolinfa na mesma velocidade com que essa é

gasta, mantendo constante a concentração de carboidratos ha hemolinfa (Cf. HORIE,1960). Essa conversão está sob contrôle de um hormônio da "corpora cardíaca" que é capaz de aumentar a concentração de trealose na hemolinfa às custas do glicogênio do corpo gorduroso (STEELE, 1961) e cujos efeitos são similares àqueles do glucagon em fígado de mamíferos (STEELE, citado em KILBY, 1965; WIENS e GILBERT, 1967).

A utilização da trealose da hemolinfa pelos tecidos é facilitada pela ocorrência generalizada da trealase (EC3.2.1.28) enzima que cliva a trealose em duas moléculas de glicose (KILBY, 1963).

3. Mecanismo e regulação da produção do casulo

A fiação da sêda em R. americana ocorre de forma similar àquela descrita para Bombyx (LUCAS, SHAW e SMITH, 1958). A liberação da secreção da sêda é feita por pressão hidrostática da hemolinfa sôbre a glândula salivar como consequência de contração da musculatura corporal da larva. Isso pode ser fàcilmente demonstrado pela constatação da inexistência de musculatura na glândula salivar (MARQUES, informação pessoal), e obtenção de secreção por compressão do corpo da larva (BIANCHI, 1972). A secreção da sêda de R. americana apresenta propriedades similares àquelas da sêda de Bombyx (LUCAS, SHAW e SMITH, 1958), isto é, a secreção é expelida como um fluído esverdeado solúvel em vários solventes, mas que após ser submetido a tensões torna-se altamente insolúvel.

Estudos realizados com glândulas sericígenas de Hymenoptera mostraram que a secreção da sêda encontra-se ali altamente organizada, na forma de filamentos dispostos em fileiras paralelas (RUDALL, 1965). Segundo êsse mesmo autor, a transformação no fio de sêda insolúvel seria consequência do deslizamento dêsses filamentos, uns sôbre os outros, sob ação de fôrças hidrodinâmicas e tensões permitindo o contato de extremidades reativas e produzindo novas ligações entre os filamentos. O autor levanta ainda a possibilidade de ocorrer o mesmo na produção da sêda por Bombyx mori, embora não exista estudos nêsse animal sôbre a estrutura da sêda dentro das glândulas sericígenas e o con

ceito mais aceito para a transformação da secreção da sêda em fio insolúvel nêsse animal seja baseado na alteração da conformação das moléculas protéicas, de uma forma dobrada, para outra completamente distendida.

Observações preliminares realizadas, durante a elaboração desta tese, com microscópio de fase na glândula salivar de R. americana, indicaram a presença ali de uma certa organização do material, embora não no nível observado em Hymenoptera (Cf. RUDALL, 1965). Essas observações sugerem que a transformação da secreção da sêda em um fio insolúvel em R. americana pode ocorrer segundo o mesmo mecanismo descrito por RUDALL (1965).

A regulação hormonal do processo de fiação é pouco conhecida, embora haja evidências em Lepidoptera de que ecdisterona (20-hidroxi-ecdisona) seja um fator importante para a promoção e manutenção da síntese de fibroína na divisão posterior da glândula sericígena no período larval (SHIGEMATSU e MORIYAMA, 1970) e de que o início da fiação dependa de um baixo título de hormônio juvenil (WIGGLESWORTH, 1970).

A liberação de $CaCO_3$ pelos túbulos de Malpighi de R. americana poderia ocorrer pela conjugação de dois fatôres: pressão hidrostática da hemolinfa sôbre os túbulos como consequência de contrações corporais da larva e ação da musculatura presente nos dutos comuns de cada par de túbulos de Malpighi. Êste tipo de musculatura é comum entre os Diptera (PATTON, 1953) e R. americana não é exceção (MARQUES, informação pessoal). No início da fiação, os dutos comuns dos túbulos de Malpighi estariam fechados, impedindo que a pressão hidrostática da hemolinfa, consequente de contrações corporais da larva, ocasionasse a liberação de $CaCO_3$. Posteriormente, os dutos se abririam, permitindo a saída de cristais de $CaCO_3$, sob ação da pressão hidrostática da hemolinfa. Êste mecanismo é perfeitamente compatível com os resultados apresentados na Tabela XV, que mostram uma liberação de $CaCO_3$ muito pequena no início da fiação, seguido de um grande aumento alguns dias depois. A Tabela mostra também que a produção da sêda é intensa durante tôda a fiação, o que indica a ocorrência de elevada pressão hidrostática durante todo êste período, devido ao fato de que essa pressão é necessária para a liberação da secreção da sêda (ver acima).

A regulação da musculatura dos dutos comuns de cada par de túbulos de Malpighi poderia ser nervosa ou hormonal. O estado atual dos conhecimentos em R.americana não permite a escolha entre nenhum dos dois processos de regulação. Contudo, é interessante notar que a regulação da musculatura dos túbulos de Malpighi de alguns insetos é feita por um hormônio produzido nas "corpora allata", similar à adrenalina, como ocorre, por exemplo, em Locusta migratoria (CAMERON, 1953).

WATERHOUSE (1950) propôs que os grânulos presentes nos túbulos de Malpighi de Lucilia cuprina seriam descarregados no intestino como consequência de um aumento na tomada de fluídos pelos túbulos de Malpighi no estágio pupal. Um mecanismo similar também poderia explicar a liberação de $CaCO_3$ pelos túbulos de Malpighi de R. americana.

A opção entre os dois mecanismos propostos deverá aguardar,entretanto, a expansão dos estudos de fisiologia dos túbulos de Malpighi em R. americana.

RESUMO

Os resultados obtidos nesta tese podem ser distribuídos em três grandes grupos: composição química da hemolinfa e do casulo coletivo e determinação química de alguns componentes principais do corpo gorduroso e túbulos de Malpighi ao longo do desenvolvimento.

Os principais resultados referentes à química da hemolinfa de larvas maduras são:

1) A hemolinfa possui uma densidade = 1,043, pH = 7,27, osmolaridade = 216 miliosmoles e corresponde a 37% do pêso-úmido do animal e 26% de seu pêso-sêco. A hemolinfa não se coagula e possui um volume de células correspondente a 0,3% de seu volume total.

2) A análise química realizada deu conta de 88% do pêso-sêco total da hemolinfa e revelou que entre os componentes presentes mais importantes em massa estão as proteínas, seguidas dos aminoácidos livres, enquanto que os osmòticamente mais ativos são os aminoácidos livres seguido de Mg^{++} e Na^{+}. Entre os aminoácidos é notável a presença de ornitina e cistationina em concentrações relativamente elevadas e a ausência, mesmo em traços, de cisteína e/ou cistina e citrulina.

3) Os peptídeos ocorrem em concentrações elevadas, mas em pequeno número, e são compostos de 2 a 3 resíduos de aminoácidos em média; o mais abundante dos quais deve ser um dipeptídeo de histidina e ácido aspártico.

4) Citrato é o ânion mais importante da hemolinfa, seguido dos fosfatos orgânicos, enquanto que trealose é o principal carboidrato presente.

5) Existem pelo menos 6 carotenóides ligados de forma não covalente a proteínas da hemolinfa e uma cromoglicoproteína, de côr amarelo-limão, fluorescente, de natureza desconhecida. Os

carotenóides mais importantes quantitativamente são: β-caroteno e um similar ao astaceno.

A composição em massa do casulo coletivo na véspera da muda pupal é a seguinte, em números inteiros: 44% de $CaCO_3$; 34% de proteínas e 10% de carboidratos, ambos insolúveis em todos solventes utilizados (SDS 10%, uréia 6M, ácido fórmico 50%, HCl 2N, KOH 1M e Na HCO_3 1M); 10% de material hidrossolúvel e 4% de cinzas não identificadas. O material hidrossolúvel foi parcialmente identificado como: proteína (4%), carboidratos (2%), enquanto que 4% ainda permanece desconhecido.

O correlacionamento da análise química da hemolinfa, casulo, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso ao longo do desenvolvimento, possibilitou ainda as seguintes conclusões:

1) A fração insolúvel do casulo (proteínas e carboidratos) corresponde à sêda secretada pelas glândulas salivares da larva, enquanto que o $CaCO_3$ presente provém dos túbulos de Malpighi.

2) As proteínas do casulo devem originar-se, pelo menos em parte, das proteínas da hemolinfa, enquanto que seus carboidratos devem provir do glicogênio do corpo gorduroso.

Os resultados são considerados em têrmos de seus possíveis significados metabólicos e eventualmente fisiológicos. Ênfase é dada na discussão do papel metabólico dos componentes orgânicos e inorgânicos da hemolinfa, assim como dos mecanismos de secreção da sêda e $CaCO_3$ e sua possível regulação hormonal.

ABSTRACT

The results of this thesis are concerned to three main lines of research: the chemical composition of the hemolymph, of the communal cocoon, and the chemical determination of some components in the fat body and Malpighian tubules along larval development.

The chief results on the hemolymph chemistry of mature larvae are:

1) The hemolymph has a density = 1.043, pH = 7.27, osmolarity = 216 miliosmols and corresponds to 37% of the larva (Wet-Weight) or to 26% of the larva (dry weight). The hemolymph does not clott and the volume of the hemocytes is 0.3% of blood total volume.

2) The chemical analysis dealt with 88% (dry-weight) of the hemolymph and showed that proteins are the most important component in mass, while free amino acids, Mg^{++} and Na^{+} are the most osmotically active substances. Among the amino acids is remarkable the titres of ornithine and cystathionine, and the complete absence of cysteine and/or cystine and citrulline.

3) There are few peptides, but present in high titres. They are built of two to three amino acids residues, and the most concentrated of them must be a dipeptide of histidine and aspartic acid.

4) Citrate and organic phosphates are the most important anions in the hemolymph. Trehalose is the chief carbohydrate present.

5) There are at least 6 non-covalentely protein-bound carotenoids and one lemon-yellow, fluorescent chromoglycoprotein of unknown nature.

The chemical composition of the communal cocoon of R. americana expressed in percentage of its total dry weight

(numbers rounded to the nearest unity) are: 44% of $CaCO_3$; 34% of proteins and 10% of carbohydrates both insoluble in all solvents used (10% SDS, 6M urea, 50% formic acid, 2N HCl, 1M KOH and 1M $NaHCO_3$); 10% of water soluble material and 4% of ashes of unknown nature. The water soluble material was identified in part as: protein (4%) and carbohydrates (2%), while 4% remained unknown.

The interrelationship among the results of the chemical analysis of the hemolymph, cocoon, Malpighian tubules and fat body during larval development was used to draw the conclusions:

1) The insoluble fraction of the cocoon (proteins and carbohydrates) corresponds to the silk produced by the larval salivary glands, while $CaCO_3$ comes from Malpighian tubules.

2) The cocoon proteins must come, at least in part, from the hemolymph proteins, while its carbohydrates must come from the fat body glycogen.

The results are discussed in terms of its possible metabolic and eventually physiological meanings. Emphasis is given in the discussion of the metabolic role of the inorganic and organic components of the hemolymph, as yet in the mecanisms of the silk secretion and $CaCO_3$ deposition and their possible hormonal regulation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADIYODI, K.G. - The nature of haemolymph proteins in relation to the ovarian cycle in the viviparous cockroach, Nauphoeta cinerea. J. Insect Physiol., 13: 1189-1195, 1967.

AGRELL, I. - Physiological and biochemical changes during insect development. In: ROCKSTEIN, M., ed. The physiology of Insecta, New York, Academic Press, 1964, v.1, p. 91-148.

ALBANESE, A.A. & ORTO, L.A. - Proteins and amino acids. In: ALBANESE, A.A., ed. Newer methods of nutritional biochemistry, New York, Academic Press, 1963, v.1, p. 1-112.

AMABIS, J.M. & CABRAL, D. - RNA and DNA puffs in polytene chromosomes of Rhynchosciara: inhibition by extirpation of prothorax. Science, 169: 692-694, 1970.

ARMELIN, H.A.; MENEGHINI, R. & LARA, F.J.S. - Extraction and characterization of newly synthesized RNA from whole cells and cellular fractions of Rhynchosciara angelae salivary glands. Biochim. biophys. Acta, 190: 358-367, 1969.

BADE, M.L. & WYATT, G.R. - Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. I. Deposition and utilization of nutrient reserves. Biochem. J., 83: 470-478, 1961.

BALMAIN, J.H.; BIGGERS, J.D. & CHARINGBOLD, P.J. - Micromethod for the estimation of glycogen in the genital organs of the mouse. Aust. J. biol. Sci., 9: 139-146, 1956.

BASILE, R.; TOLEDO FILHO, S.A.; CUNHA, A.B. da; MORGANTE, J.S. & MARQUES, J. - Análises da mutação que afeta a pigmentacão de larvas de Rhynchosciara angelae Nonato & Pavan, 1951 (Diptera Sciaridae). Rev. bras. Biol., 30: 471-475, 1970.

---

* De acôrdo com as normas preconizadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Abreviaturas dos títulos de periódicos de acôrdo com World Medical Periodical, 3ª ed, London, 1961.

BECKER, H.J. - Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster. II. Mitteilung. Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre Beziehung zur Funktion der Ringdrüse. Chromosoma, 13: 341-384, 1962.

BEERMAN, W. - Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 21: 217-232, 1956.

BEERMAN, W. - Cytological aspects of information transfer in cellular differentiation. Amer. Zool., 3: 23-32, 1963.

BELL, D.J. & YOUNG, F.G. - Observations on the chemistry of liver glycogen. Biochem. J., 28: 882-889, 1934.

BIANCHI, A.G. de - Bioquímica da secreção salivar de Rhynchosciara americana, São Paulo, 1972 [Tese de doutoramento a ser apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP].

BIEBER, L.L.; HODGSON, E.; CHELDELIN, V.H.; BROOKES, V.J. & NEWBURGH, R.W. - Phospholipids patterns in the blowfly Phormia regina (Meigen). J. biol. Chem., 236: 2590-2595, 1961.

BOAS, N.F. - Method for the determination of hexosamines in tissues. J. biol. Chem., 204: 553-563, 1953.

BONÉ, G.J. - Le rapport sodium/potassium dans le liquide coelomiques des insectes. Ann. Soc. roy. Zool. Belg., 75: 123 - 132, 1944.

BOYD, J.B. & MITCHELL, H.K. - Turnover of the hemolymph proteins in Drosophila. Arch. Biochem., 117: 310-319, 1966.

BREUER, M.E. - Revision of the genus Rhynchosciara Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. Arch. Zool.S.Paulo, 17: 167-198, 1969.

BREUER, M.E. & PAVAN, C. - Behaviour of polytene chromosomes of R. angelae at different stages of larval development. Chromosoma, 7: 317-386, 1955.

BUCK, J.B. - Physical properties and chemical composition of insect blood. In: ROEDER, K.D., ed. Insect physiology. New York, John Wiley, 1953, p. 147-190.

CAMERON, M.L. - Secretion of an orthodiphenol in the corpus cardiacum of the insect. Nature, 172: 349-350, 1953.

CARRINGTON, C.B. & TENNEY, S.M. - Chemical constituents of haemolymph and tissue in Telea polyphemus Cram. with particular reference to the question of ion binding. J. Insect Physiol., 3: 402-413, 1959.

CHEN, P.S. - Amino acid and protein metabolism in insect development. Advanc. Insect Physiol., 3: 53-131, 1966.

CHEN, P.S. & BÜHLER, R. - Paragonial substance (sex peptide) and other free ninhydrin-positive components in male and female adults of Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol., 16: 615-627, 1970.

CHEN, P.S. & LEVENBOOK, L. - Studies on the haemolymph proteins of the blowfly Phormia regina. II. Synthesis and breakdown as revealed by isotopic labelling. J. Insect Physiol., 12: 1611-1627, 1966.

CHEN JUNIOR, P.S.; TORIBARA, T.Y. & WARNER, H. - Microdetermination of phosphorus. Analyt. Chem., 28: 1756-1758, 1956.

CHINO, H. & GILBERT, L.I. - Lipid release and transport in insects. Biochim. biophys. Acta, 98: 94-110, 1965.

CHIPPENDALE, G.M. - Metamorphic changes in haemolymph and midgut proteins of the southwestern corn borer, Diatraea grandiosella. J. Insect Physiol., 16: 1909-1920, 1970.

CHIPPENDALE, G.M. & KILBY, B.A. - Relationship between the proteins of the haemolymph and fat body during development of Pieris brassicae. J. Insect Physiol., 15: 905-926, 1969.

CLARK, E.W. - A review of literature on calcium and magnesium in insects. Ann. entomol. Soc. Amer., 51: 142-154, 1958.

CLEVER, U. & KARLSON, P. - Induction von Puff-Veränderung in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson. Exp. Cell Res., 20: 623-626, 1960.

COLLINS, J.V. - The hormonal control of fat body development in Calpodes ethlius (Lepidoptera, Hesperiidae). J. Insect Physiol., 15: 341-352, 1969.

CRAIG, R. - The physiology of excretion in insects. Ann. Rev. Entomol., 5: 53-68, 1960.

CROMARTIE, R.I.T. - Insect pigments. Ann. Rev. Entomol., 4: 59-76, 1959.

CRONE, H.D. & BRIDGES, R.G. - The phospholipids of the housefly, Musca domestica. Biochem. J., 89: 11-12. 1963.

CRUICKSHANK, P.A. & PALMERE, R.M. - Terpenoid amines as insect juvenile hormones. Nature, 233: 488-489, 1971.

DAHM, K.H.; TROST, B.M. & RÖLLER, H. - The juvenile hormone. V. Synthesis of the racemic juvenile hormone. J. Am. chem. Soc., 89: 5292-5294, 1967.

DAVENPORT, H.W. - The ABC of acid-basic chemistry. 4th ed., Chicago, University Press, 1958, 118p.

DAVISON, A.N; & KACZMAREK, L.K. - Taurine - a possible neurotransmitter ? Nature, 234: 107-108, 1971.

DE LOOF, A. & DE WILDE, J. - The relation between haemolymph proteins and vitellogenesis in the colorado beetle, Leptinotarsa decemlineata. J. Insect Physiol., 16: 157-169, 1970.

DINAMARCA, M.L. & LEVENBOOK, L. - Oxidation, utilization and incorporation into protein of alanine and lysine during metamorphosis of the blowfly Phormia regina (Meigen). Arch. Biochem.,117: 110-119, 1966.

DOYLE, D. & LAUFER, H. - Sources of larval salivary gland secretion in the Dipteran Chironomus tentans. J. Cell Biol., 40: 61-78, 1969.

DREYFUS, A.; NONATO, E.; BREUER, M.E. & PAVAN, C. - Cromosomas politênicos em vários órgãos de "Rhynchosciara angelae" Nonato & Pavan (Diptera). Rev. bras. Biol., 11: 439-450, 1951.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH,F.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem., 28: 350- 356, 1956.

ELLIS, G.P. - The Maillard reaction. Advanc. Carbohyd. Chem., 14: 63-134, 1959.

ENGLE JUNIOR, R.L. & WOODS, K.R. - Comparative biochemistry and embriology. In: PUTNAM, F.W., ed. The plasma proteins. New York, Academic Press, 1960, v.2, p. 183-265.

ETTINGER, R.H.; GOLDBAUM, L.R. & SMITH JUNIOR, L.H. - A simplified photometric method for the determination of citric acid in biological fluids. J. biol. Chem., 199: 531-536, 1952.

FLORKIN, M. & JEUNIAUX, C. - Hemolymph: composition. In: ROCKSTEIN, M.,ed. The physiology of Insecta, New York, Academic Press, 1964, v.3, p. 109-152.

FOLCH, J.; LEES, M. & SLOANE-STANLEY, G.H. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. biol. Chem., 226: 497-509, 1957.

FOSTER, J.E. - Plasma albumin. In: PUTNAM, F.W.,ed., The plasma proteins. New York, Academic Press, 1960, v.1, p.179-239.

FRIEDMAN, S. - Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of Phormia regina Meig. Arch. Biochem., 93: 550-554, 1961.

FUKUDA, T.; SUDO, M.; MATUDA, M.; HAYASHI, T.; KUROSE, T.; HORIUCHI, Y. & FLORKIN, M. - Formation of the silkproteins during the growth of the silkworm larva (Bombyx mori). In: LEVENBOOK,L. ed. Biochemistry of insects. London, Pergamon Press, 1959.

GALAMBOS, J.T. - The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. Analyt. Biochem., 19: 119-132, 1967.

GAMBINO, S.R. - Determination of blood pCO_2. Clin. Chem., 7:336-345, 1961.

GILBERT, L.I. - Physiology of growth and development: endocrine aspects. In: ROCKSTEIN, M.,ed. The physiology Insecta. New York, Academic Press, 1964. v.1, p. 194-225.

GILBERT, L.I. - Lipid metabolism and function in insects.Advanc. Insect Physiol., 4: 69-211, 1967a.

GILBERT, L.I. - Biochemical correlations in insect metamorphosis. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H., eds. Comprehensive biochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1967. v.28, p. 199-252.

GILBY, A.R. - Lipids and their metabolism in insects. Ann. Rev. Entomol., 10: 141-160, 1965.

GILBY, A.R. & McKELLAR, S.W. - The composition of the empty puparia of a blowfly. J. Insect Physiol., 16: 1517-1529, 1970.

GILMOUR, D. - The biochemistry of insects. New York, Academic Press, 1961, 343 p.

GILMOUR, D. - The metabolism of insects. London, Oliver and Boyd, 1965, 215 p.

GOLBERG, L. & DE MEILLON, B. - The nutrition of the larva of Aëdes aegypti Linnaeus. 4. Protein and amino-acid requirements. Biochem. J., 43: 379-387, 1948.

GOODWIN, T.W. - The biochemistry of locust. 2. Carotenoid distribution in solitary and gregarions phases of the African migratory locust (Locusta migratoria migratorioides R & F) and the desert locust (Schistocerca gregaria Forsk). Biochem. J., 45: 472-479, 1949.

GOODWIN, T.W. - The comparative biochemistry of the carotenoids. New York, Chemical Publishing, 1954, 356 p.

GOODWIN, T.W. & SRISUKH, S. - The biochemistry of locust. I. The carotenoids of the integument of two locust species (Locusta migratoria migratorioides R. and F and Schistocerca gregaria Forsk.) . Biochem. J., 45: 263- 268, 1949.

GRÉGOIRE, C. - Blood coagulation in arthropods. II. Phase contrast microscopic observations on hemolymph coagulation in sixty-one species of insects. Blood, 6: 1173-1198, 1951.

GRÉGOIRE, C. & TAGNON, H.J. - Blood coagulation. In: FLORKIN,M. & MASON, H.S., eds. Comparative biochemistry. New York, Academic Press, 1962. v.4, p. 435-482.

GROSSBACH, U. - Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von Camptochironomus. Chromosoma, 28: 136-187, 1969.

GUARACIABA, H.L. & TOLEDO, L.F.A. - Age determination of "Rhynchosciara angelae " larvae. Rev. bras. Biol., 27: 321-332, 1967.

HACKMAN, R.H. - Changes in the free amino acids of the blood of blowfly larvae at metamorphosis. Aust. J. biol. Sci., 9:400-405, 1956.

HACKMAN, R.H. - Chemistry of the insect cuticle. In: ROCKSTEIN, M., ed. The physiology of Insecta. New York, Academic Press, 1964. v.3, p. 471-506.

HACKMAN, R.H. & GOLDBERG, M. - Studies on the hardening and darkening of insect cuticles. J. Insect Physiol., 17:335-347,1971.

HAMILTON, P.B. - Ion exchange chromatography of aminoacids, a single column, high resolving, fully automatic procedure. Analyt. Chem., 35: 2055- 2064, 1963.

HERMAN, W.S. - Control of hormone production in insects. In:ETKIN, W. & GILBERT, L.I., eds. Metamorphosis: a problem in development biology. New York, Appleton Century-Crofts, 1968, p. 107-141.

HILL, L. - Neurosecretory control of hemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust. J. Insect Physiol., 8: 609-621, 1962.

HINTON, H.E. - Concealed phases in the metamorphosis of insects. Nature, 157: 552-553, 1946.

HIRS, M.W.; STEIN, W.H. & MOORE, S. - The amino acid composition of ribonuclease. J. biol. Chem., 211: 941-950, 1954.

HORIE, Y. - Blood trehalose and fat body glycogen in the silkworm, Bombyx mori. Nature, 188: 583-584, 1960.

IMMS, A.D. - A general textbook of entomoly. 9th ed. Rev. by O. W. Richards and R. G. Davies. New York, Methuen, 1957, 886 p.

INOKUCHI, T.; HORIE, Y. & ITO, T. - Urea cycle in the silkworm, Bombyx mori: Biochem. biophys. Res. Commun., 35: 783-787,1969.

JACOB, S. - The determination of nitrogen in biological materials. Meth. biochem. Anal., 13: 241-263, 1965.

JENKIN, P.M. & HINTON, H.E. - Apolysis in arthropod moulting cycles. Nature, 211: 871, 1966.

JOHNSON, W.S. & SCHNEIDER, W.P. - β-carbethoxy-γ,γ-diphenylvinyl acetic acid. Org. synth. Rev. ed., 4: 132-136, 1963.

KARLSON, P. & SEKERIS, C.E. - Ecdysone, an insect steroid hormone, and its mode of action. Recent. Progr. Hormone Res., 22: 473-502, 1966.

KARRER, P. & JUCKER, E. - Carotenoids. New York, Elsevier,1950, 384 p.

KILBY, B.A. - The biochemistry of the insect fat body. Advanc. Insect Physiol., 1: 111-174, 1963.

KILBY, B.A. - Intermediary metabolism and the insect fat body. In: GOODWIN, T.W.,ed. Aspects of Insect biochemistry. New York, Academic Press, 1965, p. 39-48.

KUHN, R. & SÖRENSEN, N.A. Über Astaxanthin und Ovoverdin. Chem. Ber., 71: 1879-1888, 1938.

LARA, F.J.S.; TAMAKI, H. &.PAVAN, C. - Laboratory culture of R. angelae. Amer. Natur., 99: 189-191, 1965.

LAUFER, H. - Studies of changes in enzymatic activities of blood proteins in the developing silk moth. Proc. Int. Congr. Entomol., 11th, Vienna, 1960. Proc. Pavia, 1960a. v.3, p. 194-200.

LAUFER, H. - Blood proteins in insect development. Ann. N.Y.Acad. Sci., 89: 490-515, 1960b.

LAUFER, H. & NAKASE, Y. - Developmental studies of the Dipteran salivary gland. II. DNase activity in Chironomus thummi. J. Cell Biol., 25: 97-102, 1965.

LAW, J.H. & REGNIER, F.E. - Pheromones. Ann. Rev. Biochem., 40: 533-548, 1971.

LEA, C.H.; HANNAN, R.S. & GREAVES, R.I.N. - The reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. Biochem. J., 47: 626-629, 1950.

LEE, R.M. - The variation of blood volume with age in the desert locust. (Schistocerca gregaria Forsk.). J. Insect Physiol., 6: 36-51, 1961.

LEUENBERGER, F. & TOMMEN, H. - Keto-carotenoids in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. J. Insect Physiol., 16: 1855-1858, 1970.

LEVENBOOK, L. - The composition of horse bot fly (Gastrophilus intestinalis) larva blood. Biochem. J., 47: 336-346, 1950a.

LEVENBOOK, L. - The physiology of carbon dioxide transport in insect blood. III. The buffer capacity of Gastrophilus blood. J. exp. Biol., 27: 184-191, 1950b.

LEVENBOOK, L. - Organic acids in insects. II. Tricarboxilic acid cycle and related enzymes in the larva of the southern armyworm, Prodenia eridania. Arch. Biochem., 92: 114-121, 1961.

LEVENBOOK, L. - Hemolymph aminoacids and peptides during larval growth of the blowfly, Phormia regina. Comp. Biochem. Physiol., 18: 341-351, 1966.

LEVENBOOK, L. & DINAMARCA, M.L. - Free amino acids and related compounds during metamorphosis of the blowfly Phormia regina. J. Insect Physiol., 12: 1343-1362, 1966.

LEVENBOOK, L. & HOLLIS JUNIOR, V.W. - Organic acid in insects. I. Citric acid. J. Insect Physiol., 6: 52-61, 1961.

LOCKE, M. & COLLINS, J.V. - Sequestration of protein by the fat body of an insect. Nature, 210: 552-553, 1966.

LOCKE, M. & COLLINS, J.V. - Protein uptake in multivesicular bodies in the molt-intermolt cycle of an insect. Science, 155: 467-469, 1967.

LOUGHTON, B.G. & WEST, A.S. - The development and distribution of haemolymph proteins in Lepidoptera. J. Insect Physiol., 11: 919-932, 1965.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.S.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol.Chem., 193: 265-275, 1951.

LUCAS, F. & RUDALL, K. - Extracellular fibrous proteins: the silks. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H., eds. Comprehensive biochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1968. v. 26B, p. 475-558.

LUCAS, F.; SHAW, J.T.B. & SMITH, S.G. - The silk fibroins. Advanc. Protein Chem., 13: 107-242, 1958.

LUCAS, F.; SHAW, J.T.B. & SMITH, S.G. - Comparative studies of fibroins. I. The aminoacid composition of various fibroins and its significance in relation to their crystal structure and taxonomy. J. molec. Biol., 2: 339-349, 1960.

MARSH, R.E.; COREY, R.B. & PAULING, L. - The structure of Tussah silk fibroin (with a note on the structure of β-poly-L-alanine). Acta Cryst., 8: 710-715, 1955a.

MARSH, R.E.; COREY, R.B. & PAULING, L. - An investigation of the structure of silk fibroin. Biochim. biophys. Acta, 16:1-34, 1955b.

MARTIN, J.S. - Studies on assimilation, mobilization and transport of lipids by the fat body and haemolymph of Pyrrhocoris apterus. J. Insect Physiol., 15: 2319-2344, 1969.

MAZZI, V. & BACCETTI, B. - I tubi Malpighiani e la secrezione della seta nelle larve di Donus crinitus Boheman (Coleoptera, Curculionidae, Hyperini) Redia, 41: 315-341, 1956.

MEYER, K.H. & MARK, H. - Über den Aufbau des Seiden-Fibroins. Chem. Ber., 61: 1932-1936, 1928.

MITCHELL, H.K. & SIMMONS, J.R. - Amino acids and derivatives in Drosophila. In: HOLDEN. J.T., ed. Amino acid pools. Amsterdam, Elsevier, 1962, p. 136-146.

MOKRASCH, L.C. - Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. J. biol. Chem., 208: 55-59,1954.

MOORE, S. & STEIN, W.H. - Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. J. biol. Chem., 211: 893-906, 1954.

MUNN, E.A.; FEINSTEIN, A. & GREVILLE, G.D. - A major protein constituent of pupae of the blowfly Calliphora erythrocephala (Diptera). Biochem. J., 102: 5P-6P, 1967.

MUNN, E.A. & GREVILLE, G.D. - The soluble proteins of developing Calliphora erythrocephala, particularly calliphorin, and similar proteins in other insect. J. Insect Physiol., 15: 1935-1950, 1969.

MUNN, E.A.; PRICE, G.M. & GREVILLE, G.D. - The synthesis "in vitro" of the protein calliphorin by fat body from the larva of the blowfly, Calliphora erythrocephala. J. Insect Physiol.,15: 1601-1605, 1969.

NARAHASHI, T. - The properties of insect axons. Advanc. Insect Physiol., 1: 175-256, 1963.

NIELSEN, D.J. & MILLS, R.R. - Changes in electrophoretic properties of haemolymph and terminal oöcyte proteins during vitellogenesis in the american cockroach. J. Insect Physiol., 14: 163-170, 1968.

NONATO, E. & PAVAN, C. - A new species of "Rhynchosciara" Rübsaamen, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). Rev. bras. Biol., 11: 435-437, 1951.

NOVÁK, V.J.A. - Insect hormones. London, Methuen, 1966. 478p.

OHNISHI, E.; TAKAHASHI, S.Y.; SONOBE, H. & HAYASHI, T. - Crystal from cocoon of Malacosoma neustria testacea. Science, 160: 783-784, 1968.

ORR, C.W.M. - The influence of nutritional and hormonal factors on egg development in the blowfly Phormia regina (meig.). J. Insect Physiol., 10: 53-64, 1964a.

ORR, C.W.M. - The influence of nutritional and hormonal factor on the chemistry of the fat body, blood and ovaries of the blowfly, Phormia regina, Meig. J. Insect Physiol., 10: 103-119, 1964b.

PARKER, K.D. & RUDALL, K.M. - The silk of the egg-stalk of the green lace-wing fly. Nature, 179: 905-906, 1957.

PARTRIDGE, S.M. & WESTALL, R.G. - Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. Biochem. J., 42:238-248,1948.

PATTON, R.L. - Excretion. In: ROEDER, K.D., ed. Insect physiology. New York, John Wiley, 1953, p. 387-403.

PRICE, G.M. - Some aspects of amino acid metabolism in the adult house fly, Musca domestica. Biochem. J., 80: 420-428, 1961.

PRICE, G.M. & BOSMAN, T. - The electrophoretic separation of proteins isolated from the larva of the blowfly, Calliphora erythrocephala. J. Insect Physiol., 12: 741-745, 1966.

PROSSER, C.L. & BROWN JUNIOR, F.A. - Comparative animal physiology. 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 1961, 688p.

RICHARDSON, C.H.; BURDETTE, R.C. & EAGLESON, C.W. - Blood volume larval. Ann. entomol. Soc. Amer., 24: 503-506, 1931.

RIECHERS, L.A.; MEYERS, F.W. & BERRY, S.J. - DNase as a component of "multi-enzyme complexes" in the blood of saturniid moths. J. Insect Physiol., 15: 743-753, 1969.

RÖLLER, H.; DAHM, K.H.; SWEELEY, C.C. & TROST, B.M. - The structure of the juvenile hormone. Angew. Chem., 6:179-180, 1967.

ROSEN, H. - A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem., 67: 10-15, 1957.

ROSS, H.H. - A textbook of entomology. New York, John Wiley,1965, 539 p.

ROTH, T.F. & PORTER, R.K. - Yolk protein uptake in oocyte of the mosquito Aedes aegypti L. J. Cell Biol., 20: 313-332, 1964.

RUDALL, K.M. - Silk and other cocoon proteins. In: FLORKIN, M. & MASON, H.S., eds. Comparative biochemistry. New York, Academic Press, 1962. v. 4, p. 397-433.

RUDALL, K.M. - The chitin protein complexes of insect cuticles. Advanc. insect Physiol., 1: 257-313, 1963.

RUDALL, K.M. - Skeletal structure in insects. In: GOODWIN, T.W., ed. Aspects of insect biochemistry. London, Academic Press, 1965. p. 83-92.

RUDALL, K.M. & KENCHINGTON, W. - Arthropod silks: the problem of fibrous proteins in animal tissues. Ann. Rev. entomol.,16: 73-96, 1971.

SCHMIDT, F.H. & YOUNG, C.L. - Larval coloration in Choristoneura spp. (Lepidoptera, Tortricidae). Bile pigment in haemolymph J. Insect Physiol., 17: 843-855, 1971.

SCHNEIDERMAN, H.A. & GILBERT, L.I. - Control of growth and development in insects. Science, 143: 325-333, 1964.

SÉGUY, E. - Ordre des diptères. In: GRASSÉ, P.P., ed. Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Paris, Masson, 1951, v. 10, p. 448-744.

SEIFTER, S. & GALLOP, P.M. - The structure proteins. In: NEURATH, H., ed. The proteins. New York, Academic Press, 1966. v. 4, p. 155-458.

SHALES, O.S. & SHLAES, S.S. - A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. J. biol. Chem., 140: 879-884, 1941.

SHIGEMATSU, H. - Synthesis of blood proteins by the fat body in the silkworm, Bombyx mori. Nature, 182: 880-882, 1958.

SHIGEMATSU, H. - Protein metabolism in the fat body of the silkworm, Bombyx mori L. Bull. Seric. Exp. Stn. Japan, 16: 141-170, 1960.

SHIGEMATSU, H. & MORIYAMA, H. - Effect of ecdysterone on fibroin synthesis in the posterior division of the silk gland of the silkworm, Bombyx mori. J. Insect Physiol., 16: 2015 - 2022, 1970.

SIAKOTOS, A.N. - The conjugated plasma proteins of the American cockroach I. The normal state. J. gen. Physiol., 43: 999 - 1013, 1960a.

SIAKOTOS, A.N. - The conjugated plasma proteins of the American cockroach. II. Changes during the moulting and clotting processes. J. gen. Physiol ., 43: 1015-1030, 1960b.

SINNOT, E.W.; DUNN, L.C. & DOBZHANSKY, T. - Principles of genetics. 5th ed. New York, McGraw Hill, 1958, 581p.

SLÁMA, K. - Insect juvenile hormone analogues. Ann. Rev.Biochem., 40: 1079-1102, 1971.

SMITH JUNIOR, J.G. & CLARK, R.D. - Hexosamine in Bombyx mori silk. Nature, 207: 860-861, 1965.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analyt. Chem., 30: 1190-1206, 1958.

STEELE, J.E. - Ocurrence of a hyperglycemic factor in the corpus cardiacum of an insect. Nature, 192: 680-681, 1961.

STRANGWAYS-DIXON, J. - The relationship between nutrition, hormones and reproduction in the blowfly Calliphora erythrocephala (Meig.) III. The corpus allatum in relation to nutrition,the ovaries, innervation and the corpus cardiacum. J. exp.Biol., 39: 293-306, 1962.

TELFER, W.H. - Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited female protein in egg formation by the cecropia silkworm. J. gen. Physiol., 37: 539-558, 1954.

TELFER, W.H. - The mechanism and control of yolk formation. Ann. Rev. Entomol., 10: 161-184, 1965.

TOBE, S.S. & LOUGHTON, B.G. - An autoradiographic study of haemolymph protein uptake by the tissues of the fifth instar locust. J. Insect Physiol., 15: 1331-1346, 1969.

TOKUMARU, M.; FERRI, M.D.G. & WORSMANN, T.U. - Pressão osmótica da hemolinfa da "Rhynchosciara angelae" Nonato & Pavan, 1951 (Diptera, Mycetophilidae). Rev. bras. Biol., 28: 439 - 445, 1968.

TOLEDO FILHO, S.A. - Differentiation of sibling species of "Rhynchosciara" by hemolymph electrophoresis (Diptera, Sciaridae). Rev. bras. Biol., 29: 289-294, 1969.

TUNDISI, J.; KOKROM, M.I.; DIAZ, G.; MAGALDI, J.B. & LARA, F.J.S. Composição da hemolinfa de "Rhynchosciara angelae" Cienc. e Cult., 16: 185, 1964.

VAN SLYKE, D.D. & HAWKINS, J.A. - A gasometric method for determination of reducing sugars, and its application to analysis of blood and urine. J. biol. Chem., 79: 739-767, 1928.

WATERHOUSE, D.F. - Studies of the physiology and toxicology of blowflies. XIV. The composition, formation and fate of the granules in the Malpighian tubules of Lucilia cuprina larvae. Aust. J. Sci. Res. B, 3: 76-112, 1950.

WEINER, B.A. - A microelectrode to measure dissolved oxygen in insect larvae. J. Insect Physiol., 11: 817-830, 1965.

WHITTEN, J.M. - The supposed pre-pupa in cyclorrhaphous Diptera. Quart. J. micr. Sci., 98: 241-250, 1957.

WIENS, A.W. & GILBERT, L.I. - Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in Leucophaea maderae. J. Insect Physiol., 13: 779-794, 1967.

WIGGLESWORTH, V.B. - Croonian lecture: the insect as a medium for the study of physiology. Proc. roy. Soc. B, 135: 430 - 446, 1948.

WIGGLESWORTH, V.B. - The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. Advanc. Insect Physiol., 2: 244-332, 1964.

WIGGLESWORTH, V.B. - The principles of insect physiology. 6th ed. London, Methuen, 1965, 741 p.

WIGGLESWORTH, V.B. - Insect hormones. Edinburgh, Oliver & Boyd, 1970, 159 p.

WYATT, G.R. - The biochemistry of insect hemolymph. Ann. Rev. Entomol., 6: 75 - 102, 1961.

WYATT, G.R. - Biochemistry of insect metamorphosis. In: ETKIN, W. & GILBERT, L.I., eds. Metamorphosis: a problem in developmental biology. New York, Appleton Century-Crofts,1968. p. 143-184.

WYATT, G.R. & KALF, G.F. - The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates. J.gen.Physiol., 40: 833-847, 1957.

WYATT, G.R.; LOUGHHEED, T.C. & WYATT, S.S. - The chemistry of insect hemolymph. Organic components of the hemolymph of the silkworm, Bombyx mori, and two other species. J.gen. Physiol., 39: 853-868, 1956.

ZACHARIUS, R.M. & TALLEY, E.A. - Elution pattern of naturally ocuring ninhydrin positive compounds during ion exchange chromatography. Analyt. Chem., 34: 1551-1556, 1962.