WALTER RIBEIRO TERRA

BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO E ESTUDOS CINÉTICOS DA AMILASE
E ETREALASE INTESTINAIS DE *Rhynchosciara americana*

Tese de Livre-Docência apresentada
ao Departamento de Bioquímica,
Instituto de Química, Universidade
de São Paulo.

SÃO PAULO

— 1977 —

A Ilza

Ao Ricardo

AGRADECIMENTOS

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

- A Srta. Clélia Ferreira, pela sua dedicada colaboração em todas as fases deste trabalho.

- O Dr. Antonio G. de Bianchi, com quem tenho dividido todo o trabalho de criar e desenvolver um grupo de pesquisa em bioquímica de insetos, pelas suas críticas e sugestões durante a elaboração desta tese.

- O Prof. Dr. F.J.S. Lara em cujo hospital laboratório foi realizado todo este trabalho e quem jamais me privou de continuado estímulo.

- O Sr. Carlos E. Winter pela colaboração em algumas fases deste trabalho.

- O Dr. Fernando Galembeck pelo seu valioso auxílio no tratamento estatístico de dados físico-químicos.

- A Mestre Ilza C.M. Terra pelo seu auxílio na pesquisa bibliográfica referente a este trabalho e, mais recentemente, pela colaboração na sua continuação.

- Os meus colegas de laboratório: Arnaldo Zaha, Carlos A. Alvarenga, Lucile M. Floeter, Dr. Manuel T. Pueyo, Maria de Fátima Bonaldo, Dr. Roberto V. Santelli e Sonia M. de Toledo pela amizade.

- A Sra. Maria do Carmo P. Nunes, à Srta. Marina Batista e o Sr. João A. Rocha pelo auxílio técnico prestado.

- A Srta. Yvone de Abreu responsável pela eficiente datilografia desta tese.

- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos Auxílios destinados ao nosso grupo e pelas bolsas concedidas aos nossos orientados.

ÍNDICE

Pág.

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Considerações iniciais.....	3
1.2 Aspectos anatômicos do tubo digestivo	4
1.3 Enzimas digestivas	5
1.3.1 Proteases	5
1.3.2 Carboidrases	7
1.3.3 Hidrolases de ésteres carboxílicos.....	12
1.3.4 Fosfatases	13
1.4 Fisiologia da digestão	15
1.5 Objetivos deste trabalho	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Materiais	19
2.2 Animais	19
2.3 Preparação dos homogeneizados de tubos di- gestivos	20
2.4 Determinação do pH do conteúdo do tubo di- gestivo	21
2.5 Ensaio de hidrolases nos segmentos do tu- bo digestivo	22
2.6 Preparação da solução de amilase	22
2.7 Ensaio de amilase	22
2.8 Efeito de vários compostos na atividade ami- lástica	25
2.9 Diálise de homogeneizados de intestino médio para estudar o papel do cálcio na amilase.....	26
2.10 Padrão de ação de amilases	26
2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida de amilase	27
2.12 Preparação da solução de trealase	27

	Pág.
2.13 Ensaio padrão de trealase	28
2.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida de trease	28
2.15 Peso molecular da trease	29
2.16 Focalização isoeletrica da trease	29
2.17 Purificação parcial da trease	30
2.18 Parâmetros termodinâmicos de ionização da trease	30
2.19 pKs da trease em dioxana	31
2.20 Inibição múltipla de trease	32
3. RESULTADOS	34
3.1 Hidrolases do tubo digestivo de <u>R.americana</u>	34
3.1.1 Determinação do pH no conteúdo do tubo digestivo	34
3.1.2 Carboidrases do tubo digestivo de <u>R.</u> <u>americana</u>	34
3.1.3 Proteases do tubo digestivo de <u>R.</u> <u>americana</u>	39
3.1.4 Carboxilesterases e fosfatases do tubo digestivo de <u>R. americana</u>	42
3.2 A amilase do tubo digestivo de <u>R. americana</u> ...	44
3.2.1 Efeito do pH, concentração de substra- to e temperatura	44
3.2.2 Efeito de ânions e de inibidores de enzimas	47
3.2.3 Efeito de cálcio	51
3.2.4 Padrão de ação de amilase	55
3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida...	57
3.3 A trease do tubo digestivo de <u>R.americana</u>	57
3.3.1 Distribuição intracelular	57
3.3.2 Propriedades físicas e ausência de isozimas	57
3.3.3 Estequiometria da reação e efeito do pH, temperatura e concentração de subs- trato	62

	Pág.
3.3.4 Natureza dos grupos prototrópicos do sítio ativo	62
3.3.5 Especificidade de substrato e ini- bidores da trealase	69
3.3.6 Inibição múltipla de trealase	74
4. DISCUSSÃO	78
4.1 Fisiologia da digestão de <u>R. americana</u>	78
4.1.1 pH no tubo digestivo	78
4.1.2 Distribuição das enzimas entre os segmentos do tubo digestivo	79
4.1.3 Digestão de carboidratos e o papel da trealase	81
4.1.4 Digestão de proteínas	83
4.1.5 Organização espacial do processo di- gestivo e seu significado biológico ...	84
4.2 A amilase de <u>R. americana</u>	85
4.2.1 Propriedades cinéticas	85
4.2.2 Ativação por cloreto	86
4.2.3 Grupos sulfidrilas	87
4.2.4 Padrão de ação de amilase	87
4.2.5 Isozimas de alfa-amilases	88
4.3 A trealase de <u>R. americana</u>	89
4.3.1 Propriedades físicas e cinéticas	89
4.3.2 O sítio ativo da trealase	90
4.3.3 Especificidade da trealase e sua ini- bição por Tris e dioxana	91
5. RESUMO	93
6. ABSTRACT	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ABREVIATURAS

Arg β NA,	L-arginina- β -naftilamida
BAPA,	benzoil DL-arginina p-nitroanilida
BGlyArg,	N-benzoil-Glicil-L-arginina
BTEE,	benzoil-L-tirosina etil éster
cc ,	conteúdo luminal dos cecos
cf.,	confrontar com
CMC,	carboximetil celulose
DNPP,	dietil-p-nitrofenil fosfato
DNS,	reagente do ácido 3,5-dinitrossalicílico
Ea,	energia de ativação
Ec,	epitêlio do ceco
EDTA,	etilenodiaminotetracetato de sódio
ES,	complexo enzima-substrato
EVA,	epitêlio ventricular anterior
EVP,	epitêlio ventricular posterior
Gly-Gly,	glicil-glicina
Gly-Gly-Gly,	glicil-glicil-glicina
Glu β NA,	glutamil- β -naftilamida
IA,	iodoacetato de sódio
K _{cat} ,	constante catalítica
K _D ,	constante de dissociação
K _i ,	constante de dissociação do complexo enzi- ma-inibidor
K _j ,	constante de dissociação do complexo enzi- ma-inibidor
K _m ,	constante de Michaelis

LpNA,	L-leucina p-nitroanilida
p ^{MB} ,	p-Mercuriobenzoato
α NA,	α -naftil acetato
NP α Gal,	p-nitrofenil- α -D-galactosídeo
NP β Gal,	o-nitrofenil- β -D-galactosídeo
NP α Gli,	p-nitrofenil- α -D-glicosídeo
NP β Gli,	p-nitrofenil- β -D-glicosídeo
NPM,	p-nitrofenil miristato
NPP,	p-nitrofenil fosfato
P β Gli,	fenil- β -D-glicosídeo
p. ex.,	por exemplo
pK _e ,	pKs da enzima livre
pK _s ,	pKs do complexo enzima-substrato
PM,	peso molecular
PMSF,	fenil metil sulfonil fluoreto
SDS,	dodecil sulfato de sódio
TAME,	p-tosil-L-arginina metil éster
TD,	tubo digestivo
Tris,	tris-(hidroximetil)amino metano
V _{max} ,	velocidade máxima obtida por extrapolação de gráficos de Lineweaver-Burk
ZGlyPhe,	carbобенzoxiglicil-L-fenilalanina

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Praticamente qualquer tipo de matéria orgânica presente na natureza pode servir de alimento para os insetos (WIGGLESWORTH, 1972). Isto, aliado ao fato dos insetos constituírem o grupo taxonômico que apresenta o maior número de espécies, tornam-nos um importante competidor do homem na busca de alimento. Isto é particularmente visível nos estragos causados pelos insetos nas plantações. As pragas de insetos tem sido tradicionalmente combatidas pelo uso de pesticidas de várias naturezas (REAY, 1969). Entretanto, devido aos problemas ecológicos causados pelo uso em larga escala desses pesticidas, outros processos de controle de pragas tem sido pesquisados, tais como o controle biológico (REAY, 1969) e o uso de hormônios que afetam seletivamente o desenvolvimento de determinadas espécies de insetos (SLAMA, 1971).

Um meio inesperado e potencial de diminuir os estragos causados pelas pragas baseia-se na descoberta de que numerosas plantas possuem proteínas capazes de inibir enzimas hidrolíticas e que são encaradas como proteção natural ao ataque predador de insetos (MARSHALL, 1975). Em princípio, seria possível selecionar variedades de plantas economicamente interessantes que produzissem esses inibidores, as quais tornar-se-iam assim mais resistentes ao ataque por insetos. Essa possibilidade tem despertado o interesse, por um lado na procura de um número crescente de inibidores de enzimas hidrolíticas a partir de fontes vegetais (MARSHALL, 1975) e por outro lado na busca de um maior conhecimento das enzimas digestivas de insetos, afim de se compreender melhor a interação inibidor-enzima (BUONOCORE et al., 1976a,b).

O estudo da digestão e das enzimas digestivas dos insetos tem, pelo que foi acentuado acima, implicação de ordem prática além de seu interesse dentro da fisiologia comparada e da enzimologia. Apresentaremos a seguir uma revisão suscinta do estado atual dos conhecimentos na área da fisiologia da digestão em insetos e das enzimas hidrolíticas encontradas no seu tubo digestivo.

1.2 ASPECTOS ANATÔMICOS DO TUBO DIGESTIVO

O canal alimentar é um tubo de comprimento e grau de diferenciação variável conforme o grupo taxonômico e a fase de desenvolvimento do inseto. O tipo mais simples é aquele encontrado nas larvas de Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera-Nematocera (IMMS, 1957). Nestas larvas o canal alimentar consiste basicamente em um tubo cujo diâmetro varia pouco ao longo de sua extensão e tem como anexos dois cecos e os tubos de Malpighi. O canal alimentar é dividido em 3 regiões: a anterior, média e posterior. A região anterior (intestino anterior) apresenta células cobertas com uma cutícula e termina na válvula cardíaca onde se inicia a região média (intestino médio) formada por células sem cutícula, que por sua vez termina junto à abertura dos tubos de Malpighi. Após este ponto inicia-se a região posterior (intestino posterior) que se abre em um ânus e apresenta células cobertas com uma cutícula.

A larva de Rhynchosciara americana^{*} apresenta o mesmo padrão descrito acima para os tubos digestivos de larvas de Nematocera (cf. MARQUES, 1976). O intestino médio de R. americana é formado pelo ventrículo, que se inicia após a válvula cardíaca e termina na abertura dos tubos de Malpighi, e por dois longos cecos que se abrem junto à válvula cardíaca. O bôlo alimentar é separado do epi

* 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).

lio ventricular por uma membrana tubular, a membrana peritrófica. Esta membrana é sintetizada em R.americana na junção entre o intestino anterior e o ventrículo resultando em um tubo membranoso contínuo que não penetra nos cecos e envolve o bolo alimentar ao longo de todo o ventrículo até o intestino posterior onde se desintegra (MARQUES, 1976). O diâmetro da membrana peritrófica é maior do que o do lúmen do ventrículo, formando portanto numerosas dobras que deixam pequenos espaços entre o epitélio do ventrículo e a membrana peritrófica (MARQUES, 1976). As membranas peritróficas são geralmente formadas por três lâminas de uma malha de quitina embebida em uma matriz de proteína e carboidrato (WIGGLESWORTH, 1972). O ventrículo de R. americana é dividido em 6 zonas de acordo com o seu aspecto histológico. Nessas 6 regiões, com exceção da região cardíaca do ventrículo (porção mais anterior do ventrículo e de curta extensão) existem células com bordo estriado, que também ocorrem nos cecos (MARQUES, 1976).

1.3 ENZIMAS DIGESTIVAS

1.3.1 Proteases

Proteases são enzimas que hidrolizam ligações peptídicas. Elas podem ser divididas em três grandes grupos: as proteinases, que clivam ligações peptídicas internas em proteínas, as peptidases, que atacam sequencialmente as ligações de oligopeptídeos a partir do resíduo N-terminal (aminopeptidases, EC 3.4.11.-) ou C-terminal (carboxipeptidases, EC 3.4.12.-) e as dipeptidases (EC 3.4.13.-) que hidrolizam dipeptídeos. As proteinases são classificadas na base de seu mecanismo catalítico em: serina-proteinases (EC 3.4.21.-), sulfidril-proteinases (EC 3.4.22.-), proteinases ácidas (EC 3.4.23.-) e metaloproteinases (EC 3.4.24.-). As proteinases extracelulares principais em animais são do tipo serina-proteinase e são identificadas pela sua especificidade. Entre as serina-proteinases destacam-se a quimotripsina (EC 3.4.21.1) e a tripsina (EC 3.4.21.4).

A maioria das proteinases digestivas descritas em insetos são ativas em pHs alcalinos ou neutros e apresentam uma especificidade similar àquela da tripsina ou quimotripsina de mamíferos (revisão em GIEBEL et al., 1971; KNECHT et al., 1974; MILLER et al., 1974; WARD, 1975a). Entretanto, somente a tripsina presente no tubo digestivo de Man-duca sexta foi purificada até a homogeneidade e teve a sua composição de aminoácidos determinada (MILLER et al., 1974). Embora nenhuma quimotripsina de insetos tenha sido purificada até a homogeneidade, existem estudos de sua especificidade sobre substratos sintéticos e peptídeos realizados com amostras semi-purificadas (GIEBEL et al., 1971; KNECHT et al., 1974). Recentemente tem aparecido relatos da ocorrência de proteinases de serina com especificidade diferentes daquelas de tripsina e quimotripsina (GIEBEL et al., 1971; KNECHT et al., 1974), assim como, da existência de outros tipos de proteinases (GIEBEL et al., 1971; WARD, 1975a,d,e) em tubos digestivos de insetos. Dessas proteinases, as únicas purificadas em extensão considerável e com estudos amplos de sua especificidade são as metaloproteinases de Tineola bisselliella (WARD 1975d,e). Estudos abrangentes das proteinases dos tubos digestivos de insetos são desejáveis uma vez que, baseando-se no número limitado de investigações realizadas até o presente, os invertebrados em geral não possuem enzimas do tipo pepsina (BARNARD, 1973) e, portanto, seria de se esperar que as suas proteinases tivessem especificidades adequadas para compensar aquela falta.

As aminopeptidases de insetos tem sido pouco estudadas (revisão em DADD, 1970; HOUSE, 1974). O estudo mais completo existente foi realizado em tubo digestivo de Tineola bisselliella onde foram detectadas 16 aminopeptidases das quais 9 foram caracterizadas (WARD, 1975a,b,c). Estas aminopeptidases são capazes de hidrolizar di, tri e oligopeptídeos sequencialmente a partir da extremidade N-terminal, possuem pequena especificidade e foram consideradas em dois grupos de acordo com a sua migração eletroforética. A principal diferença entre os dois grupos é o peso molecular (240000 para as aminopeptidases de migração menor e 94000 para as de migração maior) e

a capacidade de hidrolizar ligações envolvendo prolina, característica das aminopeptidases de migração maior (WARD, 1975b e c). As aminopeptidases de insetos devem estar envolvidas na digestão terminal, uma vez que tem atividade desprezível sobre substratos proteicos grandes (WARD, 1975a; GOODING & ROLSETH, 1976). A distribuição das aminopeptidases entre células e lúmen do intestino médio não foi estudada de maneira ampla e os escassos resultados existentes sugerem que elas podem ocorrer no lúmen em Locusta migratoria (FREEMAN, 1967) enquanto que em Glossina morsitans (GOODING & ROLSETH, 1976) eles ocorreriam apenas nas células. Em ambos os casos foi utilizado como substrato das aminopeptidases apenas a leucina p-nitroanilida.

Não existem estudos detalhados sobre carboxipeptidases em insetos. Em T. biselliella foram detectadas e separadas duas carboxipeptidases que são provavelmente enzimas sulfidrílicas, embora suas especificidades não sejam conhecidas (WARD, 1975a). Em glossina morsitans, utilizando-se hipuril-L-fenilalanina e hipuril-L-arginina como substratos foram identificadas e posteriormente separadas duas carboxipeptidases (PM 30000 e 22000) denominadas respectivamente de carboxipeptidase A e carboxipeptidase B. Estas carboxipeptidases parecem ocorrer em células e no conteúdo luminal (GOODING & ROLSETH, 1976).

1.3.2 Carboidrases

As carboidrases são enzimas que atuam sobre ligações glicosídicas. As principais carboidrases são as amilases e celulasas que atuam sobre polissacarídeos e as glicosidases que hidrolizam oligo e dissacarídeos. As amilases são usualmente separadas em três grandes categorias: α -amilases (EC 3.2.1.1), β -amilases (EC 3.2.1.2) e glicoamilases (EC 3.2.1.3). As α -amilases são enzimas que hidrolizam ligações glicosídicas preferencialmente no interior de cadeias poli- α -1,4-glicosídicas, enquanto que as β - e glicoamilases atacam as mesmas cadeias a partir das extremidades não redutoras, removendo hidroliticamente molé

culas de maltose e glicose, respectivamente. A classificação das glicosidases é feita principalmente baseando-se na natureza do monossacarídeo que doa o seu grupo redutor à ligação glicosídica a ser clivada e na configuração α ou β dessa ligação. Assim, glicose doando o seu grupo redutor em uma ligação α com açúcar ou álcool será liberada pela ação de uma α -glicosidase (EC 3.2.1.21); galactose em ligação β , por uma β -galactosidase (EC 3.2.1.23) e assim por diante. Essa classificação implica no fato de uma enzima clivar muitos substratos e de substratos diferentes serem hidrolizados pelas mesmas enzimas. Entretanto, essas regras tem exceção, como por exemplo, para o dissacarídeo trealose que embora sendo um α -glicosídeo não é clivado pela α -glicosidase, mas somente pela trealase (EC 3.2.1.28), que por sua vez tem especificidade absoluta para este substrato.

Embora a ocorrência de amilases em insetos seja conhecida há muito tempo, a caracterização dessas enzimas tem sido geralmente primitiva, dificilmente passando da demonstração de que homogeneizados de insetos hidrolizam amido ou amilose, e do estudo do efeito do pH nesta atividade (DADD, 1970; HOUSE, 1974). Estudos comparados dos efeitos de ânions sobre as amilases de insetos são recentes (HORI, 1972), enquanto poucas tentativas tem sido feitas para distinguir α - e β - e glicoamilases de insetos (DADD, 1970). Frequentemente esta distinção é feita medindo-se a razão das atividades dextrinogênicas e sacarificantes da amilase nos estágios iniciais da hidrólise do substrato, como foi feito por exemplo para a amilase do tubo digestivo de Blatella germanica (WIGGLESWORTH, 1927). Esta razão permite distinguir as categorias das amilases, mas ela não mostra diferenças entre as α -amilases (KUNG et al., 1953). Essas diferenças, por outro lado, tornam-se aparentes quando o padrão de ação das α -amilases sobre o seu substrato é estudado (KUNG et al., 1953; ROBYT & FRENCH, 1967). Embora existam duas amilases de insetos purificadas até a homogeneidade: a amilase de C. chinensis

(PODOLER & APPLEBAUM, 1971) e a de T. molitor (BUONOCORE et al., 1976a) apenas esta última teve o seu peso molecular e seu pI determinados. O padrão de ação de nenhuma amilase de inseto foi estudado com detalhe suficiente para incluir determinações do seu grau de ataque múltiplo.

Celulose é sem dúvida alguma utilizada por vários insetos que se alimentam de vegetais. Nos Isop-
tera a digestão de celulose é dependente da presença de certos protozoários no seu tubo digestivo, enquanto que em outros insetos o ventrículo secreta uma verdadeira celula-
se, como ocorre na maioria dos Coleoptera da família Ce-
rambycidae (WIGGLESWORTH, 1972). Animais de outras ordens de insetos, além dos Coleoptera, também apresentam celula-
ses como secreções próprias como Thysanura (LASKER & GIESE, 1956), Dictyoptera (WHARTON et al., 1965) e Orthoptera (re-
visto em MORGAN, 1976). Nenhuma caracterização de celula-
ses foi tentada em insetos, os trabalhos somente se preo-
cuparam em mostrar que a celulase é realmente secretada pe-
los animais e em definir o seu sítio de produção. É in-
teressante ressaltar que a atividade normalmente denomi-
nada de celulase é consequência de um sistema enzimático
complexo do qual participam o componente C_1 (que parece
ser uma celobiohidrolase), as enzimas C_x (endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)glica-
nases), β -glicosidases e algumas vezes também exo- β -(1 $\rightarrow$ 4)
glicanases (WOOD, 1975). Curiosamente as enzimas C_1 e C_x
são capazes de individualmente atacar celulose embebida, mas
não celulose cristalina, enquanto que atuando em conjunto
hidrolizam celulose altamente ordenada com relativa facili-
dade (WOOD, 1975).

As glicosidases usualmente encontradas no tubo digestivo de insetos são: α e β -glicosidases, α e β -galactosidases, trealases e raramente β -frutosidases (DADD, 1970). Com exceção das trealases (que serão comentadas mais abaixo), a maioria das glicosidases foi estudada de manei-
ra superficial, frequentemente não passando da demonstra-
ção de que substratos selecionados são hidrolizados por ho-

mogeneizados crus do tubo digestivo e as enzimas sendo designadas de acordo com o seu substrato (DADD, 1970; HOUSE, 1974). O que torna ainda mais difícil a interpretação de dados encontrados é o fato de que grande número deles foi obtido utilizando-se apenas substratos sintéticos, quando se sabe que existem glicosidases que clivam substratos naturais mas não os arilglicosídeos correspondentes e vice-versa (MORGAN, 1975a,c).

As sacarases de insetos estudadas em detalhe foram apenas as obtidas a partir de animais inteiros. Assim MARZLUF (1969) mostrou a existência em Drosophila melanogaster de sacarases ligadas a membranas e solúveis, sendo que estas últimas ocorrem como uma família de isoenzimas. Mais tarde HUBER & LEFEBVRE (1971) purificaram uma das sacarases solúveis de D. melanogaster e mostraram que ela tinha um peso molecular de cerca de 100000 e era fortemente inibida por p_{MB} e Tris. Mais recentemente duas sacarases solúveis de Apis mellifera foram purificadas até a homogeneidade e caracterizadas física e cineticamente (HUBER & THOMPSON, 1973; HUBER, 1975; HUBER & MATHISON, 1976). Ambas as sacarases solúveis de A. mellifera são α -glicosidases inespecíficas (EC 3.2.1.20), pouco sensíveis a reagentes de sulfidrilas, apresentam atividade de transglicosilação e como ocorrem principalmente no abdômen de A. mellifera (HUBER, 1975; HUBER & MATHISON, 1976), é razoável supor que elas se encontrem no tubo digestivo.

Muito poucas β -glicosidases (revisão em MORGAN, 1975a) e β -galactosidases (revisão em MORGAN, 1975b) de insetos em geral, e de seu tubo digestivo em particular, foram caracterizadas mesmo ao nível apenas da determinação de seu pH ótimo e Km. O estudo mais completo dessas enzimas em tubos digestivos de insetos foi realizado em L. migratoria. Nesse inseto MORGAN (1975c) usando filtração em gel, desnaturação térmica e focalização isoelétrica mostrou que apenas uma espécie molecular (PM 110000) é responsável pela hidrólise de celobiose e lactose, enquanto que as atividades de aril- β -glicosidase e aril- β -galactosidase

são distintas entre si e da enzima que cliva celobiose e lactose. Todas as enzimas referidas são solúveis.

Trealase (EC 3.2.1.28) é uma das carboidrases de insetos com distribuição mais ampla, ocorrendo principalmente no intestino médio, músculo do vôo, corpo gorduroso e glândulas labiais (WYATT, 1967). Algumas trealases solúveis foram altamente purificadas a partir de insetos inteiros (KALF & RIEDER, 1958; FRIEDMAN, 1960; SAITO, 1960; DERR & RANDALL, 1966; GUILLOUX et al., 1968; HUBER & LEFEBVRE, 1971; DAHLMAN, 1971; GIEBEL & DOMNAS, 1976) e frequentemente tem sido consideradas como sendo derivadas do tubo digestivo (WYATT, 1967). Entretanto, desde que trealases solúveis também ocorrem em outros tecidos além do tubo digestivo, como músculo (CLEMENTS et al., 1970; FRIEDMAN & ALEXANDER, 1971; REED & SACKTOR, 1971; TALBOT et al., 1975) e hemolinfa (FRIEDMAN, 1961) não é possível se ter certeza que as trealases solúveis de animais inteiros venham do tubo digestivo e não sejam uma mistura de trealases. As trealases que inequivocamente são trealases do tubo digestivo tem sido pouco caracterizadas. Na maioria dos casos somente o peso molecular foi medido e o efeito do pH, temperatura e concentração de substrato sobre a trealase foi estudado (GUSSIN & WYATT, 1965; GILBY et al., 1967; YANAGAWA, 1971; RETIEF & HEWITT, 1973; FRIEDMAN, 1975; TALBOT & HUBER, 1975). Trealases tem sido purificadas de outras fontes além de insetos tais como fungos (HILL & SUSSMAN, 1963; PANEK & SOUZA, 1964; AVIGAD et al., 1965), plantas (ROBERTS & TOVEY, 1969) e mamíferos (LABAT et al., 1974; SASAJIMA et al., 1975). Embora algumas dessas trealases tenham sido purificadas até a homogeneidade, há muito poucas tentativas de se estudar o seu sítio ativo e mecanismo. O papel fisiológico das trealases do tubo digestivos de insetos é incerto, embora WYATT (1967) tenha proposto que elas pudessem estar presentes para reduzir a perda de trealose por difusão através da parede do ventrículo, uma vez que este não apresenta um sistema de transporte ativo para carboidratos. A confirmação dessa hipótese está a exigir, entre outras coisas, um maior conhecimento da distribuição da trealase no tubo digestivo, uma vez

que mesmo a importante questão se a trealase é secretada para o lúmen do tubo digestivo só foi estudada em muito poucos insetos (WYATT, 1967).

1.3.3 Hidrolases de ésteres carboxílicos

As hidrolases de ésteres carboxílicos são usualmente divididas em esterases e lipases. As lipases são incapazes de atacar moléculas de substrato em solução aquosa, sendo ativas apenas sobre substratos presentes na forma emulsificada, enquanto que as esterases atuam nos substratos em solução verdadeira (DESNUELLE, 1971). As principais esterases de mamíferos são usualmente divididas e caracterizadas (HOLMES & MASTERS, 1967) como se segue: carboxilesterases (EC 3.1.1.1) que são inibidas por compostos organofosforados tais como dietil-p-nitrofenilfosfato (DNPP) mas não por eserina e apresentam uma ampla especificidade; arilesterases (EC 3.1.1.2) que não são inibidas por DNPP mas são inibidas por reagentes sulfidrílicos, atuam sobre ésteres fenólicos e algumas enzimas atuam sobre DNPP; acetilesterases (EC 3.1.1.6) que não são inibidas por DNPP, eserina ou reagentes sulfidrílicos e hidrolizam ésteres de ácido acético; e colinesterases (EC 3.1.1.7, 3.1.1.8) que são inibidas por eserina e DNPP e agem sobre ésteres de colina.

Baseando-se apenas no efeito de compostos organofosforados e eserina sobre a atividade esterásica, carboxilesterases, arilesterases e colinesterases foram descritas em alguns insetos (p.ex. COOK & FORGASH, 1965, Veerabhadrapa et al., 1976) sendo que as colinesterases foram encontradas apenas em tecido nervoso (COOK & FORGASH, 1965).

As esterases melhores estudadas em insetos são aquelas do tubo digestivo de P. americana onde sete delas foram isoladas e purificadas até a homogeneidade, além de terem os seus pesos moleculares e vários de seus parâmetros cinéticos determinados. Essas esterases são do tipo

carboxilesterase, baseando-se na sensibilidade a DNPP e na insensibilidade a pMB e parecem ocorrer como agregados moleculares (HIPPS & NELSON, 1974). A função das carboxil e arilesterases em animais não é bem conhecida, embora pareçam desempenhar um papel nos processos de desintoxicação, metabolizando numerosos compostos com ligações ésteres e estranhos ao organismo (KRISCH, 1971). Uma análise eletroforética das esterases de R. americana, usando β -naftil acetato como substrato, mostrou a existência de 7 esterases no intestino médio, uma das quais só ocorre neste órgão (NEGRELLI, 1973).

Muitas das supostas lipases digestivas descritas em insetos podem estar entre as esterases encontradas em tubos digestivos de insetos, uma vez que em grande número de trabalhos não houve uma preocupação em se diferenciar as duas classes de enzimas (DADD, 1970). Entretanto, lipases verdadeiras foram descritas em vários tecidos de insetos, incluindo o tubo digestivo (GILBERT et al. 1965). O estudo de uma lipase presente em homogenatos de intestino médio de baratas mostrou que o seu modo de ação é similar ao da lipase pancreática de mamíferos, isto é, a enzima libera preferencialmente os ácidos graxos situados nas posições externas das moléculas de triglicerídeos. Por outro lado, mesmo quando a hidrólise total dos triglicerídeos se produz "in vivo", sob a ação dessa lipase, o glicerol formado é pouco utilizado na ressíntese de lipídeos, de forma análoga ao que ocorre com os mamíferos (BOLLADE et al., 1970).

1.3.4 Fosfatases

As fosfatases (fosfomonoesterases, EC 3.1.3.-) não são consideradas enzimas digestivas verdadeiras, mas como a fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) e a fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) podem estar relacionadas aos mecanismos de transporte envolvidos na absorção de nutrientes e/ou digestão intracelular, elas serão enfocadas aqui.

As fosfatases alcalinas de animais são inespecíficas, hidrolizando praticamente qualquer fosfomonoéster, são ativadas por Mg^{++} e geralmente estão ligadas a membranas. No caso particular da fosfatase alcalina da mucosa intestinal de mamíferos, ela se dispõe nas microvilosidades. Admite-se que ela esteja envolvida em mecanismos de transporte (FERNLEY, 1971). As fosfatases ácidas atuam em diferentes monoésteres e ocorrem na forma solúvel ou no interior de lisossomos (HOLLANDER, 1971).

Embora as fosfatases alcalinas estejam descritas em insetos há algum tempo (DAY, 1949), inclusive em seus tubos digestivos (HORIE, 1955), são recentes as tentativas de isolamento e caracterização bioquímica. Uma das poucas tentativas efetuadas permitiu o isolamento de duas fosfatases alcalinas a partir de tubos digestivos de larvas de Pieris rapae. Ambas as formas hidrolizam um número grande de fosfomonoésteres diferentes, dos quais se destacam glicose-1-fosfato e ribose-1-fosfato (MOLDENKE, 1976). Por outro lado, foi mostrado que em Bombyx mori a fosfatase alcalina ocorre preferencialmente na fração particulada das células do tubo digestivo na fase larval e na fração solúvel, na pupa (EGUCHI & IWAMOTO, 1975).

As fosfatases ácidas em insetos tem sido estudadas principalmente em tecidos que sofrem histólise e no aparelho reprodutor. Os resultados sugerem um envolvimento da fosfatase ácida lisossômica muscular na histólise (p.ex. LOCKSHIN & WILLIAMS, 1965), enquanto que a fosfatase ácida do aparelho reprodutor está associada à maturação dos gametas (p.ex. MOORE & FRAZIER, 1976). O estudo das fosfatases ácidas no tubo digestivo de insetos tem-se restringido à demonstração de sua ocorrência por técnicas histoquímicas ao nível de microscopia ótica (p.ex. COUCH & MILLS, 1968) ou eletrônica (p.ex. AKAI, 1969) e mais recentemente foi demonstrado por técnicas bioquímicas, que ela ocorre preferencialmente em organelas na fase larval e na fração solúvel em pupa (EGUCHI & IWAMOTO, 1975).

1.4 FISILOGIA DA DIGESTÃO

Embora as secreções salivares possam conter algumas enzimas digestivas, o ventrículo é o principal órgão digestivo dos insetos, secretando a maioria das enzimas digestivas e supostamente absorvendo a maioria dos produtos da digestão, juntamente com os cecos (WIGGLESWORTH, 1972). A produção de extrusões vesiculares nos ápices de microvilosidades e pinocitose na região entre as microvilosidades de células ventriculares foram observadas em vários grupos de insetos e parecem estar relacionadas respectivamente com secreção e absorção (WIGGLESWORTH, 1972).

O alimento, como já foi comentado acima, não entra em contacto com as células ventriculares porque está envolvido pela membrana peritrófica. A função tradicionalmente atribuída a essa membrana é a de proteger as células do tubo digestivo do efeito abrasivo dos alimentos, da pressão devido ao embebedimento dos alimentos e/ou do contacto com a microflora intestinal, evitando assim possíveis infecções (ZHUZHIKOV, 1964; WIGGLESWORTH, 1972). Resultados mais recentes, entretanto, tem indicado que a principal função da membrana peritrófica é a de funcionar como um ultrafiltro especial. Assim, embora a membrana peritrófica permita a entrada para o seu lúmen de enzimas digestivas, ela permite a saída apenas de compostos de pequeno peso molecular como sais, substâncias orgânicas simples e os produtos de hidrólise de macromoléculas como proteínas e amido (ZHUZHIKOV, 1964).

Dessa forma supõe-se que as macromoléculas permaneçam dentro da membrana peritrófica até a sua transformação em moléculas mais simples que atravessariam a membrana e seriam posteriormente absorvidas (DADD, 1970). Isto pressupõe a ocorrência de enzimas que atacam polímeros no interior da membrana peritrófica e a existência de enzimas capazes de hidrolizar os oligômeros resultantes fora da mesma membrana. Existem poucos trabalhos

que estudam a distribuição das enzimas entre o interior da membrana peritrôfica e as células e mesmo esses poucos trabalhos são geralmente qualitativos (cf. DADD, 1970; HOUSE, 1974). Esses trabalhos tem mostrado, por. ex., que a amilase é encontrada no suco digestivo do bicho-da-seda, enquanto que as glicosidases estão restritas ao tecido epitelial (HORIE, 1959). Por outro lado, proteinases tem sido encontradas no conteúdo do ventrículo, enquanto que as peptidases parecem ocorrer no epitélio (WIGGLESWORTH, 1972).

Tanto quanto sei nenhum trabalho considerou a possibilidade da ocorrência de enzimas digestivas verdadeiras (extracelulares) no espaço luminal do ventrículo e cecos, mas exterior à membrana peritrôfica. Enzimas que ocorressem nesses espaços não apareceriam no conteúdo da membrana peritrôfica e nem nos sucos digestivos que são geralmente material regurgitado do ventrículo. Essas enzimas poderiam então ter sido interpretadas como ocorrendo somente no interior das células. Este pode ser o caso de várias glicosidases e peptidases consideradas como restritas às células em vários trabalhos (cf. DADD, 1970; WIGGLESWORTH, 1972; HOUSE, 1974).

Por outro lado, os poucos trabalhos comentados que mostraram que algumas glicosidases e peptidases estavam restritas às células epiteliais ventriculares, não estudaram a sua distribuição intracelular. Existem, entretanto, trabalhos baseados em técnicas histoquímicas onde se procurou evidenciar a distribuição intracelular de algumas hidrolases do tubo digestivo tais como carboidrases, lipases, esterases e fosfatases (KHAN & FORD, 1967; COOK et al., 1969). Esses resultados padecem entretanto da dificuldade de interpretação de resultados histoquímicos, principalmente quando se procura evidenciar enzimas cujas características não foram anteriormente pesquisadas.

Um melhor conhecimento da distribuição das enzimas entre epitélio e lúmen (intra e extra membrana peritrôfica) e da distribuição intracelular das enzimas restritas ao epitélio é imprescindível para o entendi

mento do processo da digestão. Isto é acentuado pelo fato de que parece existir uma relação estreita entre várias hidrolases e transportadores ao nível da membrana das células intestinais, pelo menos em vertebrados, onde esse processo foi melhor estudado (BARNARD, 1973a).

1.5 OBJETIVOS DESTE TRABALHO

A presente tese deve ser vista como parte de um projeto maior, do qual deverão participar várias pessoas e cujos objetivos a longo prazo são os seguintes: detecção e caracterização das hidrolases restritas às células do tubo digestivo de Rhynchosciara americana e das hidrolases secretadas para o seu lúmen, tanto para fora quanto para dentro da membrana peritrófica, afim de se descrever as características principais da fisiologia da digestão nesse animal. A caracterização das enzimas secretáveis deverá envolver inicialmente apenas análises cinéticas e eletroforéticas dos homogeneizados (ou preparações semi-purificadas) embora determinando-se, sempre que possível, alguns parâmetros físico-químicos como peso molecular e pI. A caracterização das enzimas restritas às células deverá envolver o estudo de sua compartimentalização na célula e então será seguido enfoque similar ao dado para as hidrolases secretáveis. A longo prazo pretende-se tentar a purificação até a homogeneidade das hidrolases mais ativas, utilizando a informação obtida anteriormente, principalmente referente aos pesos moleculares, pIs e condições de ensaio.

O uso de larvas de R. americana para esse estudo é muito conveniente devido aos seus hábitos fitófagos e ao tamanho de seu tubo digestivo. É interessante ressaltar ainda que o fato da membrana peritrófica de R. americana estar permanentemente cheia de areia, cerca de 60% de seu peso seco (TERRA et al., 1975), facilita a dissecação dessa membrana com relativamente poucas perdas das enzimas presentes em seu interior.

Dentro do projeto referido acima, dois objetivos foram selecionados para serem alcançados nesta tese. Um consiste na descrição dos processos digestivos da larva de R. americana baseando-se na determinação quantitativa de grande número de hidrolases em diferentes segmentos do tubo digestivo. O outro objetivo é a caracterização físico-química das duas carboidrases principais encontradas no tubo digestivo da larva de R. americana, que são a trealase e a α -amilase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Glicose oxidase (Tipo II), peroxidase (Tipo II), substratos sintéticos, albumina de soro bovina (Fração V), amido solúvel, dissacarídeos, e ácido iodoacético foram adquiridos da Sigma. Ampholines (pH 3-10) foram comprados da LKB Corp. Acrilamida e bis-acrilamida vieram do Bio Rad Laboratories. Alfa-amilase cristalina de Bacillus subtilis foi suprida pela Calbiochem e a de pâncreas de porco, pela Worthington. As proteínas puras usadas como marcadores de peso molecular foram: albumina de ovo, catalase e ferritina da Sigma e alfa amilase de pâncreas de porco da Worthington. O tampão universal feito de ácido fosfórico 0,01M, ácido fenilacético 0,01 M e ácido bórico 0,01 M (PRIDEAUX & WARD, 1924) foi adquirido da BDH Chemical Ltd. O óleo de oliva utilizado foi um produto comercial (Ybarra), enquanto que o etanol foi obtido do produto técnico por destilação. Todos os demais reagentes empregados foram produtos analíticos obtidos principalmente da BDH, E. Merck A.G. e J.T. Baker. ácido iodoacético foi recristalizado e a ausência de iodo livre foi verificada antes do uso de acordo com WEBB (1966). Os tubos de celulose para diálise (Sigma) foram tratados de acordo com LEVITZKI & STEER (1974). Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada em destilador de vidro.

2.2 ANIMAIS

Rhynchosciara americana (Diptera Nematocera Sciaridae) foi criada no laboratório de acordo com LARA et al. (1965). As larvas utilizadas eram fêmeas e estavam no final do 2º período do 4º estágio. De-

talhes sobre a subdivisão do último (4º) estágio larval de R. americana podem ser encontrados em TERRA et al. (1973).

2.3 PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS DE TUBOS DIGESTIVOS

As larvas eram lavadas em água, dispostas em gelo picado para ficarem imóveis e em seguida dissecadas em NaCl 0,1 M gelado, como se segue. As larvas eram presas pela cápsula cefálica e, com o auxílio de uma pinça, a parede do corpo era estirada resultando no seu descolamento da cápsula cefálica. O segmento anal era então cortado com um estilete e, por meio de uma pinça, o tubo digestivo era removido pela parte anterior do animal aderido à cápsula cefálica. Os túbulos de Malpighi eram imediatamente removidos, seguido pela retirada das glândulas salivares e pelo seccionamento do tubo digestivo anterior junto à faringe (logo atrás da cavidade bucal). O conteúdo dos cecos era recolhido com um capilar seguido do seccionamento do tubo digestivo na altura do proventrículo e da abertura dos túbulos de Malpighi. A membrana peritrófica com o seu conteúdo pastoso era agora retirada do intestino médio, os cecos removidos e o ventrículo restante cortado em uma porção anterior e outra posterior. Os tubos digestivos inteiros, o intestino anterior, médio e o posterior, assim como os cecos, o ventrículo anterior e posterior eram, após extensiva lavagem em salina, homogeneizados a frio em homogeneizador Potter-Elvehjem em volume conveniente de água bidestilada e neutralizada. O conteúdo dos cecos era solubilizado em volume conhecido de água bidestilada. Todas as referidas preparações eram agora passadas em rede de Nylon de malha de 90 µm e em seguida em lã de vidro. O filtrado resultante era guardado a -10°C até o uso. A membrana peritrófica com o seu conteúdo era homogeneizada como as demais preparações, embora sem lavagem prévia em salina, e centrifuga

da a 10000 xg por 10 min a 4°C antes de se passar o sobrenadante resultante através de lã de vidro. Esta centrifugação é necessária afim de facilitar a remoção da areia, que corresponde a cerca de 60% do peso-seco do conteúdo da membrana peritrófica em R. americana (TERRA et al., 1975). Os homogeneizados continham material correspondente a 10 animais por ml.

2.4 DETERMINAÇÃO DO pH DO CONTEÚDO DO TUBO DIGESTIVO

Os tubos digestivos eram dissecados em água destilada (como em 2.3), após o que eram transferidos para uma lâmina de vidro seca. Ali os cecos eram picados com um estilete e o seu conteúdo absorvido em uma pequena tira de papel indicador universal (Merck, Darmstadt) cuja cor era comparada imediatamente com o padrão de cores da cartela. A porção remanescente do tubo digestivo era dissecada, a membrana peritrófica removida com o seu conteúdo pastoso e seccionada em uma porção anterior, média e outra posterior. A cada porção juntava-se 2 µl de água destilada, misturava-se e rapidamente o material era absorvido em papel indicador e a determinação do pH era realizada. Este procedimento permitiu medir os pHs do conteúdo do tubo digestivo com uma precisão de mais ou menos meia unidade de pH. Um método mais preciso foi realizado como se segue. O conteúdo do ceco era aspirado em um capilar de 4 µl (Drummond Microcaps), transferido para uma placa de toque onde juntava-se igual volume de um indicador de pH. O conteúdo das 3 seções da membrana peritrófica era misturado com 3 µl do indicador de pH e a cor resultante era comparada com padrões adequados. Os indicadores de pH usados foram: azul de bromotimol (pH 6,0-7,6), fenol vermelho (pH 6,8-8,4) e azul de timol (pH 8,0-9,6). Os resultados obtidos com azul de bromotimol não foram considerados devido a interferência pela cor do conteúdo do tubo digestivo.

2.5 ENSAIO DE HIDROLASES NOS SEGMENTOS DO TUBO DIGESTIVO

Os ensaios enzimáticos nos segmentos do tubo digestivo foram realizados como descrito nas Tabelas I e II. Os substratos derivados de nitrofenol, salvo quando especificado, foram ensaiados nos pHs indicados em um volume de reação de 0,2 ml e a reação interrompida pela adição de 1 ml de tampão bicarbonato 0,25M - carbonato 0,25M e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%. Experimentos controles mostraram que essa concentração de SDS é suficiente para desnaturar todas as enzimas ensaiadas. Nessas condições o coeficiente de extinção molar a 420 nm de p-nitrofenolato é 18000 e de o-nitrofenolato é 4600. O meio de incubação da fosfatase alcalina possuía, além do tampão indicado na Tabela II, Mg^{++} 1 mM.

2.6 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMILASE

Tubos digestivos inteiros homogeneizados e passados em lã de vidro como em 2.3 eram centrifugados a 10000 xg por 10 min a 4°C e os sobrenadantes eram armazenados a -10°C. Quando as amostras iam ser dialisadas, ou submetidas a eletroforese, os sobrenadantes de 10000 xg eram centrifugados a 100000 xg por 1 h a 4°C e os novos sobrenadantes eram coletados e armazenados a -10°C. Nesta temperatura, nenhum dos sobrenadantes teve perda notável de atividade após pelo menos um ano.

2.7 ENSAIOS DE AMILASE

A atividade de amilase foi determinada, salvo quando especificado de forma diferente, medindo-se o incremento dos grupos redutores durante a incubação com o reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), preparado de acordo com NOELTING & BERNFELD (1948). A mistura de

TABELA I

Condições de ensaio e métodos de determinação da atividade das carboidrases do tubo digestivo de R.americana¹

Substrato	Concentração	pH ²	Substância ou grupo determinado	Referência
Amido	0,5%	8 (4-9)	grupos redutores	Ver item 2.7
Amido	1,0%	6 (7 e 8)	glicose	Dahlqvist (1968)
CMC	1,0%	5 (4-9)	grupos redutores	Hoffman (1937)
Maltose, Celobiose,				
Lactose e Trealose	7 mM	6	glicose	Dahlqvist (1968)
Sacarose	500 mM	6	glicose	Dahlqvist (1968)
NP α Gli, NP β Gli,				
NP β Gal	10 mM	6	nitrofenol	Ver item 2.5
NP α Gal	4 mM	6	nitrofenol	Ver item 2.5

1- Os ensaios foram todos realizados a 37°C nos pHs indicados. Os tampões usados (0,05M) foram: citrato-fosfato (pH 4-7), Tris-HCl (pH 8,0) e Veronal (pH 9,0). Para cada determinação as incubações eram feitas por 30, 60 e 120 min e a atividade calculada expressa em n moles de substrato hidrolizado (ou nmoles de ligações quebradas) por min (mU). Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais.

2- Números entre parênteses correspondem a outros pHs estudados onde a atividade é menor e/ou a destruição espontânea do substrato é muito elevada.

TABELA II

Condições de ensaio e métodos de determinação da atividade das carboxilesterases, fosfatases e proteases do tubo digestivo de R. americana¹

Substrato	Concen- tração (mM)	pH ²	Substância ou grupo determinado	Referência
α NA	0,5	8 (6 e 7)	α -naftol	Hipps & Nelson (1974)
NPM	6	9 (6)	p-nitrofenol	Mahadevan & Tappel (1968)
Óleo de oliva	0,66%	8 (6)	ésteres carboxílicos	Park et al. (1975)
NPP, alcalino	4	9	p-nitrofenol	Ver ítem 2.5
NPP, ácido	4	5	p-nitrofenol	Ver ítem 2.5
LpNA	1,67	8 (6 e 9)	p-nitroanilina	Erlanger et al. (1961)
Gly-Gly-Gly	15	7 (8 e 9)	grupos amino	Rosen (1957)
Gly-Gly	15	7 (8 e 9)	grupos amino	Rosen (1957)
Glu β NA	0,088	7,2 (8 e 9)	β -naftilamina	Hopsu et al. (1966)
Arg β NA	0,5	8 (7,2 e 9)	β -naftilamina	Hopsu et al. (1966)
ZGlyPhe	15	8 (9)	grupos amino	Rosen (1957)
BGlyArg	1	7,2 (5 e 8)	grupos amino	Rosen (1957)
Albumina	0,125%	11 (5-13)	peptídeos TCA solúveis	Henrikson & Clever (1972)
BAPA	0,83	9 (8 e 10)	p-nitroanilina	Erlanger et al. (1961)
TAME, BTEE	5	9 (8-12)	ésteres carboxílicos	Webster & Prado (1970)

1- Os ensaios foram realizados a 37°C nos pHs indicados. Os tampões usados (0,05M) foram: acetato (pH 5,0), citrato-fosfato (pH 6,0), Veronal (pH 7-9), glicina-NaOH (pH 9-10,5), fosfato-NaOH (pH 11-12) e KCl-NaOH (pH 12,5-13). As exceções foram: pH 7,2 com Glu β NA e BGlyArg (Tris-HCl), pH 8,0 com Arg β NA e Óleo de oliva (Tris-HCl) e pH 8,0 com α NA e LpNA (fosfato). O meio de reação com Glu β NA continha além do tampão, CaCl₂ 10 mM e com ZGlyPhe, NaCl 50 mM. As incubações eram feitas em cada determinação por 30,60 e 120 min, exceto quando foram ensaiadas α NA (5,10 e 15 min) e albumina, TAME e BTEE (todos 15,30 e 60 min). Cálculo de atividade e controles como Tabela I.

2- Números entre parêntesis como Tabela I.

reação era formada por 0,05 ml de preparação de enzima, 0,45 ml de tampão 0,10 M e 0,5 ml de substrato. A reação enzimática era iniciada pela adição do substrato à mistura de enzima e tampão após esperar 5 min para equilibrar as temperaturas das soluções com o banho de incubação (37°C). Os controles sem enzima (brancos de substrato) e os controles sem substrato (brancos de enzima) foram incubados da mesma forma que os experimentais. A incubação foi interrompida pela transferência dos tubos para gelo picado seguido da adição de 2 ml de DNS e aquecimento em banho em ebulição. Após 5 min os tubos eram esfriados em água corrente e suas absorbâncias determinadas a 550 nm após adição de 2 ml de água. Utilizando curvas padrões obtidas pela reação direta de glicose ou maltose com ácido 3,5-dinitrossalicílico em condições similares aqueles das reações enzimáticas, pode-se expressar os resultados em massa de equivalente glicose ou maltose. Nessas condições, a velocidade de hidrólise do amido solúvel pela preparação de amilase era diretamente proporcional à quantidade de enzima adicionada e ao tempo de incubação até 3 h.

2.8 EFEITO DE VÁRIOS COMPOSTOS NA ATIVIDADE AMILÁSICA

Os ensaios foram realizados essencialmente como descritos anteriormente (2.7), diferindo no fato de que 0,1 ml dos compostos estudados substitua volume igual de tampão. Soluções de compostos capazes de alterar o pH do meio de incubação eram acertadas para pH 8,0 antes de sua adição à mistura de reação. Brancos de substrato e enzima foram incluídos como acima. Nos experimentos onde se pretendia medir o efeito de haletos e nitrato, as soluções de enzima e amido foram dialisadas previamente contra 100 volumes de tampão fosfato 10 mM pH 8,0 por 48 h a 4°C.

2.9 DIÁLISE DE HOMOGENEIZADÔS DE INTESTINO MÉDIO PARA ESTUDAR O PAPEL DO CÁLCIO NA AMILASE

Um volume de enzima era dialisado 48h a 4°C contra 100 volumes de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ou EDTA 10 mM pH 8,0 ou ainda EDTA 10 mM pH 8,0, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) (FAHRNEY & GOLD, 1963) 1 mM, isopropanol 10%. Neste último caso, antes de iniciar a diálise, 1,8 volumes de enzima era reunido a 0,2 volumes de PMSF 10 mM em isopropanol e mantido 1 h a 30°C. Amostras com e sem PMSF foram mantidas a 4°C durante todo o tempo da diálise para servirem de controle. Estes, juntamente com os dialisados, foram a seguir incubados em diversas circunstâncias e o aumento dos grupos redutores foi medido com o reagente de ferricianeto alcalino segundo HOFFMAN (1937). Este reagente foi preferido neste experimento porque, contrariamente ao que ocorre com o reagente de DNS, não é afetado pela presença de cálcio nas amostras (ROBYT et al., 1972; ROBYT & WHELAN, 1972).

2.10 PADRÃO DE AÇÃO DE AMILASES

Amostras de 20 mU (U, uma Unidade Internacional, é a quantidade de enzima que hidrolizará um μ mol de ligações por min a 40°C no pH ótimo da enzima) de α -amilase cristalina de Bacillus subtilis, de 50 mU de α -amilase pancreática de porco e de homogeneizados de tubos digestivos de R.americana contendo cerca de 0,125 tubos digestivos (cerca de 20 mU) foram incubadas com amido solúvel 0,5% nas condições ótimas para cada enzima. Após vários tempos durante 240 min, amostras eram transferidas para gelo picado e 4 ml de TCA 0,125M a 0°C eram adicionados e os tubos deixados descansar no gelo. Após 30 min o pH de todos os tubos era ajustado para 6 (verificado com papel indicador de pH) pela adição de NaOH 5 M. Aliquotas de 1 ml das amostras neutralizadas eram usadas para a determinação do valor de redução com o reagente de ferricia-

neto alcalino segundo HOFFMAN (1937), enquanto que alíquotas de 0,5 ml eram usadas para medir a capacidade de coloração por iodo segundo McCREADY & HASSID (1943). O reagente de ferricianeto alcalino foi escolhido para medir o valor de redução neste experimento porque ele não é afetado pelo tamanho da cadeia de maltodextrinas, como ocorre com o reagente de DNS, sendo portanto adequado para comparações da ação de amilases (ROBYT et al., 1972, ROBYT & WHELAN, 1972).

2.11 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE AMILASE

Amostras de homogenatos contendo 0,5 tubos digestivos (cerca de 80 mU) eram aplicadas a géis de acrilamida 4% preparados segundo DAVIS (1964). A separação eletroforética foi conseguida com uma corrente de 2,5 mA por coluna por 1h, 3h ou 6h a 4°C. Após as corridas os géis eram fracionados em um fracionador de gel de acrilamida (Autogeldivider Savant Instruments, Inc.) com tampão fosfato 0,1M pH 8,0. Frações de doze gotas (correspondendo a 2 mm de gel) foram coletadas com o auxílio de um coletor de frações (Micro Fractionator, Gilson). A cada fração uma quantidade suficiente de solução de amido tampão do foi adicionado para ficar amido 0,5%, NaCl 10 mM, tampão fosfato 0,05M pH 8,0. As incubações eram terminadas após 2 h a 37°C pela adição de reagente de DNS como descrito anteriormente (2.7). A recuperação da atividade de amilase aplicada aos géis variou entre 64 e 71%.

2.12 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TREALASE

Ela foi realizada como descrito para amilase (2.6) seguido de centrifugação a 105 000 xg por 1h a 4°C e diálise do sobrenadante por 24h a 4°C contra

100 volumes de água destilada. A solução de enzima pode ser armazenada por pelo menos 12 meses a -10°C sem perda notável de atividade.

2.13 ENSAIO PADRÃO DE TREALASE

Os ensaios padrões foram realizados a 37°C em tampão citratofosfato 0,05M, pH 6,0, trealose 15mM em um volume final de 0,5 ml. A reação era terminada colocando-se os tubos em banho de água fervente por 2 min. A glicose formada era determinada com o reagente de Tris-Glicose oxidase-peroxidase (DALQVIST, 1968). Para cada determinação, as incubações eram realizadas por 30, 60 e 120 min e as velocidades iniciais calculadas. Brancos de substrato e de enzima eram incubados do mesmo modo que os experimentais. Nas condições padrões de ensaio, a velocidade de hidrólise de trealose pela preparação de trealase era diretamente proporcional à quantidade de enzima adicionada e ao tempo de incubação até pelo menos 240 min. Uma unidade de enzima (U) é definida como a quantidade que catalisa a clivagem de 1 μmol de substrato por min.

2.14 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE TREALASE

Estas eletroforeses foram realizadas de maneira análoga às de amilase (2.11). Amostras de homogenatos contendo cerca de 25 mU de trealase (0,5 tubos digestivos) foram aplicadas a géis de poliacrilamida de diferentes concentrações. A separação eletroforética foi realizada com uma corrente de 2,5 mA/coluna por cerca de 1h a 4°C . Após as corridas os géis eram fracionados em um fracionador de géis de acrilamida com tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0. Frações de 12 gotas (correspondendo a 2 mm de gel) foram coletadas com o auxílio de um coletor de frações. A cada fração foi adicionada trealose tamponada para

ficar trealose 15 mM, tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0. As incubações foram terminadas após 2 h a 37°C pela adição de DNS como descrito acima (2.7). A recuperação da atividade de trealase aplicada aos géis variou entre 68 e 77%.

2.15 PESO MOLECULAR DA TREALASE

O peso molecular da trealase foi determinado medindo-se a sua migração eletroforética em géis de poliacrilamida de diferentes concentrações (4, 5,5, 7, 8,5 e 10%) (DAVIS, 1964) e comparando-se o seu comportamento eletroforético com aquele de proteínas de peso molecular conhecido de acordo com HEDRICK & SMITH (1968). As proteínas utilizadas como padrões foram albumina de ovo (PM = 43000), alfa amilase de pâncreas de porco (PM = 45000), catalase (PM = 232000) e ferritina (450000). A posição das proteínas padrões no gel foram reveladas por coloração com negro de amido (amido black), enquanto que aquela da trealase foi evidenciada após fracionamento do gel e ensaios como descrito acima. A tangente m , que é proporcional ao peso molecular da proteína, foi calculada por regressão linear a partir de gráfico de $100 \times \log (R_m \times 100)$ contra concentração do gel, onde R_m é a migração da proteína em relação ao corante marcador. Os coeficientes de correlação lineares encontrados foram superiores a 0,99 para as proteínas padrões e a 0,97 para a trealase.

2.16 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA DA TREALASE

Dois cilindros de gel de poliacrilamida 7,5% foram utilizados. Em ambos foi adicionado antes da polimerização uma alíquota da preparação da enzima contendo 12,5 mU e um volume de Ampholine 40% (pH 3-10) suficiente para o gel ficar 1,5% em Ampholine. A eletrofo

calização foi realizada a 4°C usando 31 V/cm até que a corrente se tornasse invariável em relação ao tempo. Após a eletrofocalização, um cilindro foi fracionado e ensaiado como descrito acima (2.14), enquanto que o outro cilindro após ter sido fracionado da mesma forma utilizando água bidestilada no lugar do tampão, teve o pH de suas frações medido com um eletrodo de vidro, após descansar durante a noite a 4°C. A recuperação da atividade de trealase aplicada nos géis foi cerca de 67%.

2.17 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA TREALASE

Amostras de trealase do tubo digestivo de R. americana foram separadas eletroforéticamente em várias colunas de géis de acrilamida 8,5%. As regiões dos diferentes géis que deveriam conter a trealase, baseando-se na sua migração, foram cortadas, homogeneizadas em tampão citrato-fosfato 0,02M pH 6,0 e, após ajustar o pH do homogeneizado para 6,0 com HCl 3N, ele foi deixado a 4°C durante a noite. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante dialisado contra 100 volumes de água destilada por 12h. O dialisado apresenta cerca de 55-65% da atividade aplicada no gel. A combinação de ultracentrifugação e separação eletroforética resulta em uma recuperação de 53-63% da atividade do homogeneizado inicial e numa atividade específica (1,6 unidades/mg proteína, a 37°C, pH 6,0) 26 vezes maior. A trealase parcialmente purificada é bastante estável e nenhuma alteração em sua atividade foi notada após dois meses mantida a -10°C em água neutralizada.

2.18 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE IONIZAÇÃO DA TREALASE

Ensaio de trealase foram realizados em tampão universal em pelo menos 10 pHs diferentes, nos quais

a enzima permanece estável, e os $V_{\max}$ ap e K_m aparentes (K_m ap) foram determinados em cada pH a partir de plotes de Lineweaver-Burk. O pH do tampão foi ajustado por titulação com NaOH 0,2N na temperatura do ensaio. Os pKs dos grupos ionizáveis do sítio ativo da enzima livre (pK_{e1} e pK_{e2}) e do complexo enzima substrato (pK_{es1} e pK_{es2}) foram determinados por plotes lineares de $K_m \text{ ap} / V_{\max \text{ ap}}$ em função de $[H^+]$ e $1/V_{\max \text{ ap}}$ contra $1/[H^+]$, respectivamente, a concentração elevadas (pK_{e1} e pK_{es1}) e baixas de H^+ (pK_{e2} e pK_{es2}) (cf. SEGEL, 1975). As entalpias padrão de ionização ($\Delta H_{\text{ion}}^{\circ}$) foram calculadas a partir das inclinações dos plotes lineares de pK em função do inverso da temperatura absoluta que obedecem a equação:

$$pK = \frac{\Delta H_{\text{ion}}^{\circ}}{2,303 R} \times \frac{1}{T} + \text{constante}$$

As inclinações das retas de regressão linear e seus limites de erro foram calculados segundo SALZBERG et al. (1969). As energias livres padrão de ionização ($\Delta G_{\text{ion}}^{\circ}$) foram calculadas pela equação

$$\Delta G^{\circ} = -2,303 RT \text{ pK}$$

a partir dos pKs interpolados no gráfico de pK contra $1/T$. Os limites de erro dos pKs foram calculados segundo CAMPBELL (1967). A entropia padrão de ionização ($\Delta S_{\text{ion}}^{\circ}$) foi calculada pela equação:

$$\Delta S_{\text{ion}}^{\circ} = (\Delta H_{\text{ion}}^{\circ} - \Delta G_{\text{ion}}^{\circ})/T$$

2.19 pKs DA TREALASE EM DIOXANA

O pH do tampão universal-dioxana foi ajustado por titulação com NaOH 0,2N na temperatura de ensaio (25°C) como recomendado por BACARELLA et al. (1958). Tampões acetato em dioxana foram usados para padronizar o

pHmetro. Os pKs do ácido acético nas concentrações de dioxana usadas foram interpolados a partir dos dados da literatura como recomendado por HARNED & FALLON (1939). Os ensaios enzimáticos e as determinações dos pKs foram realizados como descrito anteriormente (2.18).

2.20 INIBIÇÃO MÚLTIPLA DE TREALASE

A inibição múltipla de uma enzima por dois inibidores competitivos lineares simples diferentes (I e j) é descrita pelos equilíbrios mostrados abaixo:

A equação pertinente é:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{[S] v_{\max}} \left(1 + \frac{[j]}{\alpha K_j} \right) \frac{[I]}{K_i} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{K_m [j]}{[S] K_j} \right)$$

Uma maneira muito conveniente de realizar uma análise de inibição múltipla consiste em plotar $1/v$ contra a concentração de um inibidor (I) a concentração constante de substrato e a diferentes concentrações fixas do outro inibidor (j) (YONETANI & THEORELL, 1964, SEMENZA & von-BALTHAZAR, 1974). Entretanto, quando dioxana é um dos

inibidores, surgem algumas dificuldades, uma vez que ela muda a constante dielétrica do meio, resultando em deslocamentos do pH ótimo da trealase. Devido a isso, as modificações nas velocidades iniciais da trealase a diferentes concentrações de dioxana são consequências tanto de inibição competitiva quanto de deslocamentos do pH ótimo da enzima. Afim de evitar este problema, nós plotamos $1/v$ $[I]/K_i$ em apenas uma concentração de dioxana. A linha reta resultante foi comparada com linhas teóricas calculadas a partir da equação de velocidade acima, assumindo diferentes valores para α .

3. RESULTADOS

3.1 HIDROLASES DO TUBO DIGESTIVO DE *R. americana*

3.1.1 Determinação do pH no conteúdo do tubo digestivo

A Tabela III apresenta as determinações de pH para as diferentes seções do tubo digestivo de R. americana como descrito em 2.4. Uma vez que o método de determinação de pH utilizado está baseado na diluição da amostra pelo indicador de pH, ele só é rigorosamente aplicável se a solução testada for tamponada adequadamente. Para testar isso as amostras foram diluídas entre 3 e 5 vezes em relação ao método descrito (2.4) com os mesmos indicadores de pH usados anteriormente e as determinações foram refeitas. Os resultados obtidos foram essencialmente os mesmos apresentados na Tabela III.

3.1.2 Carboidrases do tubo digestivo de R. americana

As carboidrases listadas na Tabela IV foram ensaiadas preliminarmente no tubo digestivo anterior, médio e posterior e também nas glândulas salivares. Toda atividade considerada significativa (superior a 3% da atividade encontrada no tubo digestivo inteiro) restringe-se ao intestino médio. Devido a isso estes foram divididos em vários segmentos e ensaiados. Os resultados são mostrados na Tabela IV.

A atividade recuperada nos vários segmentos variou na maioria dos casos entre 100⁺15% daquela encontrada no tubo digestivo inteiro. Entretanto, a recuperação das atividades observadas sobre maltose, NP β Gal, NP α Gal, lactose e celobiose foi superior a 120%, chegando no caso de NP β Gal a 205%. É interessante observar que es-

TABELA III

pH do conteúdo do tubo digestivo médio de Rhynchosciara
americana

Região do tubo digestivo médio	Nº de determinações	pH	
		Intervalo	Média
Ceco	14	7,2 - 7,5	7,3
Parte anterior	13	8,7 - 9,0	8,8
Parte média	12	8,8 - 9,2	8,9
Parte posterior	12	8,4 - 8,8	8,6

TABELA IV

Distribuição das carboidrases no intestino médio de *R. americana*¹

Enzimas possíveis			EC		CC		EVA		EVP		CMP		Soma	
Nome	EC 3.2.1	Substrato	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)
α -amilase ²	1	amido	23,1	7,8	150,2	31,3	98,8	17,2	30,5	4,2	144,1	39,5	88,4	100
Glicoamilase ³	3	amido	9,0	33,2	1,9	4,3	11,8	22,7	20,9	32,0	2,6	7,8	8,0	100
Celulase	4	CMC	36,1	25,8	56,7	25,1	12,4	4,6	38,2	11,3	56,9	33,2	41,5	100
α -glicosidase	20	maltose	30,0	53,8	0,0	0,0	15,4	14,4	42,7	31,8	0,0	0,0	28,8	100
α -glicosidase	20	sacarose	15,1	53,6	0,0	0,0	14,1	26,1	13,8	20,3	0,0	0,0	14,6	100
α -glicosidase	20	NP α Gli	31,0	58,4	4,0	4,7	6,6	6,4	38,4	30,0	0,4	0,5	15,7	100
β -glicosidase	21	Celobiose	39,2	78,7	0,0	0,0	0,6	0,6	25,0	20,7	0,0	0,0	25,8	100
β -glicosidase	21	NP β Gli	43,9	83,0	0,0	0,0	0,6	0,5	21,0	16,5	0,0	0,0	27,3	100
α -galactosidase	22	NP α Gal	1,5	79,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	9,0	0,3	11,5	0,5	100
β -galactosidase	23	lactose	12,6	61,8	0,0	0,0	2,0	5,2	16,2	33,0	0,0	0,0	10,5	100
β -galactosidase	23	NP β Gal	208	75,4	0,0	0,0	14,8	2,8	146	21,8	0,0	0,0	143	100
Trealase	28	Trealose	26,7	9,3	345	74,8	15,2	2,8	41,6	6,0	24,8	7,1	84,8	100

1. As carboidrases foram determinadas no epitélio dos cecos (EC), conteúdo luminal dos cecos (CC), epitélio ventricular anterior (EVA), epitélio ventricular posterior (EVP) e no conteúdo da membrana peritrófica (CMP). Soma refere-se à somatória das atividades recuperadas nas diferentes partes do intestino médio.

2. Determinado a partir do aumento de grupos redutores. Ver Material e Métodos.

3. Determinado a partir do aparecimento de glicose. Ver Material e Métodos.

as atividades são restritas às células. Devido a isso é possível que elas sejam particularmente sensíveis a enzimas proteolíticas (que ocorrem principalmente fora das células, ver abaixo), enquanto que nos homogeneizados de epitélios lavados elas manteriam a sua atividade intacta, resultando em recuperações superiores a 100%.

A amilase determinada por aparecimento de grupos redutores a pH 8,0 é uma α -amilase, conforme será mostrado por estudos de seu padrão de ação (3.2.4). A determinação da α -amilase não é afetada pela presença de glicoamilase porque esta tem uma atividade a pH 8,0 30 vezes menor que a da α -amilase (resultados não apresentados).

A maior parte da atividade de glicoamilase ocorre nas células, seu pH ótimo é 6,0 e sua atividade específica é sempre inferior à da maltase e da α -amilase nos mesmos segmentos do tubo digestivo (Tabela IV). Isso sugere que a atividade medida como glicoamilase em células consiste realmente no produto da ação de α -amilase acoplada à da maltase. A minúscula atividade de glicoamilase encontrada extracelularmente pode corresponder à pequena quantidade de glicose produzida sob a ação da α -amilase, que é extremamente ativa nesses locais. Usualmente o ensaio de glicoamilase é feito na presença de EDTA (p. ex. O'DONNELL & McGEENEY, 1975) para inibir a α -amilase e assim evitar os problemas descritos acima. Entretanto, a presença de EDTA no meio de reação não inibe a α -amilase de R. americana (3.2.3). Dessa forma, a verificação segura da existência de glicoamilase em R. americana deverá aguardar estudos que envolvam a sua separação física da α -amilase.

A atividade celulásica (Tabela IV) foi medida com CMC como substrato, o qual é clivado em extensões variáveis pelos diferentes componentes do sistema celulase (WOOD, 1975). Embora esta medida não permita saber que componente do sistema da celulase está sendo ensaiado, resultados preliminares usando papel de filtro como substrato sugeriram que R. americana possui um sistema de celu

lase completo. Papel de filtro é o substrato recomendado para a determinação prática da atividade celulásica completa (MANDELS et al., 1976).

Como a atividade de celulase foi medida pelo aumento de grupos redutores, ela deverá estar superestimada nas frações celulares devido a presença de β -glicosidase. Experimentos controles, nos quais o aparecimento de glicose foi medido no meio de reação, mostraram que cerca da metade do incremento de grupos redutores, quando se utilizava frações celulares como fonte de enzimas, era devido ao aparecimento de glicose. Como ao se utilizar frações extracelulares não aparece glicose no meio de reação, o surgimento desta nas incubações com material celular deve ser o resultado da ação da β -glicosidase sobre celobiose ou moléculas pequenas de celodextrinas produzidas pelo sistema celulase. Esse problema poderia ter sido evitado ensaiando-se a celulase com CMC por um método viscosimétrico, embora assim apenas a atividade endocelulásica do sistema celulase teria sido ensaiada (cf. WOOD, 1975).

A elevada atividade celulásica remanescente nos segmentos intestinais lavados, mesmo levando-se em conta que estão superestimados, em comparação com aquela do tubo digestivo inteiro (Tabela IV), torna razoável supor que a atividade celulásica seja uma secreção do ventrículo, e não um produto de microorganismos presentes no lúmen do tubo digestivo. Em contraste com esses resultados, existem os de P. americana onde os segmentos do tubo digestivo perdem praticamente toda a sua atividade celulásica após lavagem extensiva, o que foi interpretado como sendo devido à remoção de microorganismos celulolíticos (WHARTON et al., 1965).

A atividade hidrolítica sobre maltose, NP α Gli e sacarose é restrita às células e possui uma distribuição entre os segmentos aproximadamente igual (Tabela IV). Isso sugere que a existência de uma α -glicosidase geral (EC 3.2.1.20). Por outro lado, resultados preliminares

indicam a ocorrência de maltases solúveis e ligadas a membranas, além da existência de pelo menos duas maltases solúveis por cinética de inativação térmica.

A enzima que hidroliza celobiose parece ser a mesma que hidroliza NP β Gli, uma vez que as atividades específicas em relação a ambos substratos é a mesma nos diferentes segmentos (Tabela IV), sugerindo que o radical aglicone não influencia em nada a ação enzimática. Essa enzima deve ser, portanto, uma β -glicosidase geral (EC 3.2.1.20). Contrariamente ao demonstrado em outros insetos (p. ex. MORGAN, 1975c), essa enzima parece não clivar lactose em R. americana, uma vez que a razão das atividades sobre celobiose e lactose variam muito entre os diferentes segmentos (Tabela IV). O significado fisiológico da enzima que cliva β -galactosídeos em R. americana fica inexplicado, porque esses substratos não devem ocorrer na dieta destas larvas. Segundo BARNARD (1973b) essa enzima sem função conhecida, que também ocorre em vários outros invertebrados, deve ser considerada como vestigial.

Parece ocorrer uma α -galactosidase geral (EC 3.2.1.22) em R. americana conforme ensaios com NP α Gal (Tabela IV) e com melibiose (não mostrados). Os ensaios com melibiose só foram realizados com tubos digestivos inteiros, devido às grandes quantidades de material necessário para cada determinação e, por isso, não constam da Tabela IV.

A trealase é uma das principais carboidrases do tubo digestivo de R. americana, juntamente com a α -amilase, e ocorre principalmente no lúmen dos cecos e em menor quantidade nos epitélios (Tabela IV).

3.1.3 Proteases do tubo digestivo de R. americana

Da mesma forma que as carboidrases, nenhuma atividade significativa de proteases foi detectada nas glândulas salivares, intestino anterior e posterior de R.

americana. As atividades de proteases determinadas em diferentes segmentos do intestino médio são mostradas na Tabela V.

A atividade recuperada nos diferentes segmentos variou entre 100⁺20% daquela encontrada no tubo digestivo inteiro para as hidrolases de ZGly Phe, BGly Phe e Gly-Gly. A recuperação das demais atividades foi sempre inferior a 65%, atingindo no caso da hidrolase de BTEE apenas 42% da atividade determinada no tubo digestivo inteiro. Uma explicação para essas recuperações baixas seria admitir a existência de formas inativas das enzimas nas frações celulares que seriam ativadas no homogeneizado de tubo digestivo inteiro. A ausência de atividade hidrolítica sobre BTEE nas células (Tabela V) fortalece essa hipótese. Embora a não detecção da hidrolase de BTEE em células pudesse sugerir também que essa enzima não é produzida pela larva, mas consistiria em uma contaminação presente no alimento e/ou microorganismos do lúmen da membrana peritrófica, o fato da atividade específica da hidrolase de BTEE ser maior no lúmen do ceco que no da membrana peritrófica (Tabela V), torna pouco provável essa possibilidade.

A atividade proteínásica total dos segmentos do tubo digestivo foi medida usando-se albumina como substrato (Tabela V). Baseando-se apenas na hidrólise de diferentes substratos, distinguiu-se uma atividade do tipo tripsina (hidrólise de TAME e BAPA) e outra do tipo quimotripsina (hidrólise de BTEE) das quais a atividade triptíca parece ser a mais importante (Tabela V).

Estudos preliminares com PMSF indicaram que este inibe cerca de 50% da atividade proteínásica de homogeneizados de tubos digestivos de R. americana. Isto sugere por um lado a existência de serina-proteinases, o que suporta a hipótese de que as atividades sobre TAME (e BAPA) e BTEE sejam respectivamente de enzimas similares a tripsina e a quimotripsina e, por outro lado, torna possível admitir a existência de outros tipos de proteinases como as descritas para T. bisselliella (WARD 1975a,d,e).

TABELA V

Distribuição das proteases no intestino médio de R. americana¹

Enzimas possíveis			EC		CC		EVA		EVP		CMP		Soma	
Nome	EC3.4	Substrato	U		U		U		U		U		U	
			mU/mg	(%soma)	mU/mg	(%soma)	mU/mg	(%soma)	mU/mg	(%soma)	mU/mg	(%soma)	mU/mg	(%soma)
Aminopeptidase	11.-	LpNA	1257	44,5	1348	29,7	187,6	3,5	599,8	8,8	464,8	13,5	836,3	100
Aminopeptidase	11.-	ArgβNA	256,9	43,5	307,6	32,4	32,1	2,8	108,1	7,6	98,5	13,7	174,9	100
Carboxipeptidase A	12.2	ZGlyPhe	212,3	50,2	120,6	17,7	104,7	12,9	90,4	8,8	53,9	10,4	125,5	100
Carboxipeptidase B	12.3	BGlyArg	17,1	77,5	2,1	5,8	0,0	0,0	4,9	9,3	2,0	7,4	6,5	100
Glicilglicina dipeptidase	13.1	Gly-Gly	114,5	58,8	59,4	18,9	29,0	7,7	36,4	7,7	16,3	6,9	54,6	100
Proteinase	21.-	Albumina	150,2	8,9	1620	59,7	5,5	0,1	0,0	0,0	645	31,3	498,6	100
Quimotripsina	21.1	BTEE	0,0	0,0	637,5	49,8	0,0	0,0	0,0	0,0	486,4	50,2	201,3	100
Tripsina	21.4	TAME	555,9	12,2	3854	52,6	259,7	3,0	322,5	2,9	1626	29,3	1348	100
Tripsina	21.4	BAPA	7,1	9,3	61,8	50,5	2,5	1,7	2,8	1,5	34,4	37,0	22,5	100

1. As determinações foram realizadas nos mesmos segmentos do tubo digestivo descritos para carboidrases (TABELA IV)

As aminopeptidases foram estudadas utilizando-se como substratos Arg β NA e LpNA (Tabela V). Outros substratos de aminopeptidases foram utilizados (Gly-Gly-Gly, GluNA), mas devido às baixas atividades encontradas eles foram abandonados.

Os resultados mostrados na Tabela V sugerem a existência de duas carboxipeptidases em R. americana que foram denominadas de carboxipeptidase A e carboxipeptidase B conforme os substratos hidrolizados. Será necessária, entretanto, uma maior caracterização dessas enzimas para se assegurar que as denominações adotadas são convenientes.

3.1.4 Carboxilesterases e fosfatases do tubo digestivo de R. americana

Todas as enzimas listadas na Tabela VI foram ensaiadas preliminarmente no intestino anterior, médio e posterior, além das glândulas salivares. Da mesma forma que para carboidrases e proteases toda atividade significativa restringe-se ao intestino médio.

A recuperação das atividades ensaiadas nos vários segmentos do intestino médio e apresentadas na Tabela VI foi sempre superior a 150% da atividade encontrada no tubo digestivo inteiro. Esse resultado concorda com o anteriormente observado para várias glicosidas (3.1.2) e deve ter a mesma explicação.

A esterase inespecífica (EC 3.1.1.1.) ensaiada com α NA é restrita às células e apresenta uma atividade específica aproximadamente constante em todas as células do intestino médio (Tabela VI).

NPM foi utilizado como substrato de lipases devido ao fato dele não formar soluções em meio aquoso e ser fácil de ensaiar por ser cromogênico. Embora ensaios com homogeneizados de intestinos médios inteiros, usando óleo de oliva como substrato, mostraram a existência

TABELA VI

Distribuição das carboxilesterases e fosfatases no intestino médio de R. americana¹

Enzimas possíveis			EC		CC		EVA		EVP		CMP		Soma	
Nome	EC3.1	Substrato	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)	mU/mg	U (%soma)
Carboxilesterase	1.1	α NA	552,4	56,8	0,0	0,0	528,3	28,2	351,2	27,5	0,0	0,0	502,9	100
Lipase	1.1	NPM	0,0	0,0	0,0	0,0	202,2	91,2	0,0	0,0	12,5	8,8	34,2	100
Fosfatase alcalina	3.1	NPP (pH9)	19,7	78,3	0,0	0,0	1,5	3,1	11,3	18,6	0,0	0,0	13,0	100
Fosfatase ácida	3.2	NPP (pH5)	7,9	62,1	0,0	0,0	6,3	25,6	3,8	12,3	0,0	0,0	6,6	100

1. As determinações foram realizadas nos mesmos segmentos do tubo digestivo descritos para carboidrases (TABELA IV)

de uma triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3), não se pode assegurar que essa enzima seja a mesma que hidroliza NPM. A lipase (NPM) ocorre apenas no ventrículo anterior. A atividade encontrada na membrana peritrôfica deve ser uma contaminação por material do ventrículo anterior, a julgar pela sua atividade específica extremamente baixa.

A fosfatase alcalina de R. americana (Tabela VI) é semelhante a descrita para outros organismos (cf. FERNLEY, 1971) pelo fato de ser ativada por Mg^{++} . A adição de Mg^{++} 1 mM em homogeneizados de tubos digestivos inteiros de R. americana ativa a enzima de 214 %. Ela é restrita às células e ocorre preponderantemente no epitélio do ceco e do ventrículo posterior (Tabela VI).

A fosfatase ácida é restrita às células e tem uma distribuição diferente da fosfatase básica, ocorrendo preferencialmente no epitélio do ceco e do ventrículo anterior (Tabela VI).

3.2 A AMILASE DO TUBO DIGESTIVO DE *R. americana*

3.2.1 Efeito do pH, concentração de substrato e temperatura

O pH ótimo da amilase intestinal de R. americana é 6,8 na ausência de ativadores (Fig. 1). Na presença de cloreto 10 mM, entretanto, a amilase é ativada e o pH ótimo é deslocada para 8,0 (Fig. 1).

O efeito da concentração de substrato na amilase intestinal é mostrado na Figura 2 usando um plote de Lineweaver-Burk. É interessante notar que soluções frescas de amido apresentam desvios da linearidade somente a concentrações muito maiores (2%) do que soluções de amido mais velhas (0,5%). O K_m aparente calculado dos dados da Figura 2 é 0,14% da presença e na ausência de cloreto.

FIGURA 1. Efeito do pH na atividade da amilase intestinal de *R. americana*. A linha contínua corresponde aos ensaios realizados na presença de NaCl 10 mM, enquanto que a linha tracejada, na sua ausência. Os tampões utilizados (0,05M) foram citrato-fosfato (O), fosfato (Δ), Glicina-NaOH (O) e fosfato-NaOH (■). Os ensaios foram realizados com amido solúvel 0,5% por 2 h a 37°C.

FIGURA 2. Efeito da concentração de substrato na atividade da amilase intestinal de *R. americana*. v , mg de maltose aparente/intestino/h. $[S]$, concentração de amido solúvel (%). Os ensaios foram realizados em tampão fosfato 0,05M pH 8,0 por 2 h a 37°C na presença de NaCl ($\bullet, \circ$) ou na sua ausência (Δ) usando soluções de enzima e amido dialisados como descrito em Material e Métodos (2.8). As soluções foram preparadas imediatamente ($\bullet, \Delta$) ou 3h ($\circ$) antes do uso. A linha reta foi ajustada aos pontos ($\bullet$) entre 0,025 e 1,0 % ($r = 0,9976$) e aos pontos (Δ) ($r = 0,9986$) usando o método dos quadrados mínimos. r é o coeficiente de correlação linear.

A Figura 3 mostra, usando um plote de Arrhenius, um aumento exponencial na velocidade com a temperatura até esta alcançar um ótimo de 50°C , que é seguido por um acentuado declínio a temperaturas mais elevadas. A energia de ativação aparente (E_a) para catálise de amilase intestinal calculada entre 12 e 35°C é 4,8 Kcal/mol, enquanto que a energia de ativação aparente para a reação de desnaturação determinada entre 50 e 80°C é 37,5 Kcal/mol. A temperaturas acima de 35°C os pontos desviam-se de forma crescente da reta (Fig. 3) sem se ajustar, entretanto, em outra reta. Isto sugere que uma desnaturação térmica irreversível está ocorrendo e não uma modificação na energia de ativação aparente na temperatura de transição (35°C) como descrito anteriormente para várias enzimas (DIXON & WEBB 1964), incluindo-se α -amilases (MARKOVITZ et al., 1956). Uma inspeção na Figura 4 confirma a existência de uma crescente desnaturação térmica irreversível a temperaturas superiores a 35°C .

3.2.2 Efeito de ânions e de inibidores de enzimas

A ligação de cloreto à amilase do tubo digestivo foi medida por cinética de ativação a 37°C , como mostrado na Figura 5. A constante de dissociação (K_D) do complexo enzima-cloreto é igual a 1,6 mM a 37°C , que é da mesma ordem do K_D medido para α -amilase de mamíferos (LEVITZKI & STEER, 1974). A menor concentração de cloreto que ativa completamente a enzima é 10 mM (não mostrado na Figura 5). A ligação do cloreto à amilase do tubo digestivo não altera o K_m para amido, mas aumenta o $V_{\max}$ por um fator de 34 (Fig. 2). Desde que o $V_{\max}$ em ambas as curvas é calculado para a mesma quantidade de enzima, podemos concluir que cloreto causa um aumento de 34 vezes no K_{cat} .

Os ânions brometo, nitrato e iodeto ativam a amilase intestinal de R. americana de, respectivamente, 91, 27 e 14% em relação ao cloreto. Esses resultados são similares àqueles encontrados para a α -amilase de mamí-

FIGURA 3. Efeito da temperatura na amilase intestinal de R. americana. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato 0,05M pH 8,0, amido solúvel 0,5%, NaCl 10 mM por 2h. Uma linha reta foi ajustada aos pontos entre 12 e 35 $^\circ C$ ($r = 0,9944$) e entre 50 e 80 $^\circ C$ ($r = 0,9976$) usando o método dos quadrados mínimos. r e v como na Figura 2.

FIGURA 4. Estabilidade térmica da amilase intestinal de *R. americana*. Amostras de homogeneizados em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 foram submetidas às temperaturas indicadas por 2h, antes da determinação da atividade de amilase nas condições descritas na Figura 3, a 37°C.

FIGURA 5. Ativação da amilase intestinal de *R. americana* por cloreto; plote dos duplosrecíprocos. O efeito do cloreto foi calculado subtraindo-se a velocidade na ausência de cloreto, v_0 , daquela na presença de cloreto, v_{Cl} , em idênticas condições. Os ensaios foram realizados como na Figura 4, exceto que o cloreto variou como indicado na figura e as soluções de enzima e amido foram dializadas como descrito em Material e Métodos (2.8). A linha reta ($r = 0,9998$) foi ajustada aos pontos usando o método dos quadrados mínimos. v como na Figura 2.

feros (LEVITZKI & STEER, 1974), embora nitrato e iodeto sejam comparativamente ativadores menos eficientes da amilase de R. americana do que daquela de mamíferos.

A Figura 6 mostra o efeito de Cu^{++} e a Figura 7 o efeito de Hg^{++} sobre a amilase de R. americana usando plotes de Dixon (DIXON, 1953a). Cu^{++} inibe a amilase de forma não competitiva com $K_i = 0,23 \text{ mM}$, enquanto que a inibição causada por Hg^{++} é do tipo competitivo com um $K_i = 0,21 \text{ mM}$. Ambas inibições são lineares simples, tais como demonstrado pelos replotes das inclinações de gráficos de Lineweaver-Burk contra concentração de inibidor. A Figura 8 mostra que a inibição da amilase de R. americana por diferentes concentrações de Hg^{++} atinge o equilíbrio após 20-30 min de incubação na ausência de substrato.

As α -amilases de Bacillus subtilis (Di CARLO & REDFERN, 1947) e saliva humana (MUUS et al., 1956) são inativadas por Cu^{++} e Hg^{++} em uma extensão aproximadamente a mesma daquela de R. americana. Os poucos trabalhos que fazem referência a esse assunto em insetos são geralmente incompletos (p. ex. APPLEBAUM et al., 1961).

p-Mercuribenzoato (0,1 mM) e iodoacetato (50 mM) não inibem a amilase intestinal de R. americana. Resultados similares foram publicados para outras α -amilases como a de pâncreas (CALDWELL et al., 1945), B. subtilis (Di CARLO & REDFERN, 1947) e Drosophila melanogaster (DOANE, 1969).

3.2.3 Efeito de cálcio

Amostras de amilase do tubo digestivo de R. americana dialisadas 48h contra tampão e contra EDTA 10 mM perdem cerca de 20 e 70% de sua atividade respectivamente. A perda de atividade contra tampão parece ser consequência da exposição prolongada a algum contaminante presente no tampão, uma vez que a adição de EDTA 10 mM ao meio de reação restaura completamente a atividade do dialisado contra tampão. Nesse sentido é interessante notar que metais

FIGURA 6. Inibição da amilase intestinal de *R. americana* por CuSO_4 . Amostras de homogeneizados em tampão Veronal 0,1 M pH 8,0 foram mantidos por 60 min a 4°C com concentrações diferentes de CuSO_4 antes da adição do substrato e ensaio em tampão Veronal 0,05M pH 8,0, NaCl 10 mM, por 2 h a 37°C . S_1 , amido solúvel 0,125%; S_2 , amido solúvel 0,25%. As linhas retas ($r_1 = 0,9964$; $r_2 = 0,9969$) foram ajustados aos pontos usando o método dos quadrados mínimos.

FIGURA 7. Inibição da amilase intestinal de *R. americana* por HgCl_2 . Os ensaios foram realizados como descrito na Figura 6 exceto que Tris-HCl substituiu o tampão Veronal e HgCl_2 substituiu CuSO_4 . $r_1 = 0,9994$, $r_2 = 0,9921$.

FIGURA 8. Inibição da amilase intestinal de *R. americana* por HgCl_2 em função do tempo. Amostras de homogeneizados em tampão Tris-HCl pH 8,0 foram mantidas pelos tempos indicados a 4°C com concentrações diferentes de HgCl_2 antes da adição de amido solúvel (0,25%, final) e ensaio em tampão Tris-HCl pH 8,0, NaCl 10 mM, por 2h a 37°C.

pesados presentes em drogas "pro análise" de boa procedência são capazes de inibir parcialmente a amilase salivar (MUUS et al., 1956).

A adição de excesso de Ca^{++} aos dialisados de amilase intestinal de R. americana contra EDTA não reativa a amilase, embora este íon interrompa sua inativação durante uma incubação prolongada (90h) na presença de EDTA. Afim de evitar degradação proteolítica da amilase durante a diálise, homogeneizados de tubos digestivos de R. americana foram preparados e dialisados na presença de PMSF 1 mM. Os resultados obtidos foram iguais aos encontrados na ausência de PMSF. Uma vez que evidências recentes (resultados não publicados) sugerem que existem outras proteinases além das serina proteinases no tubo digestivo de R. americana, não se pode decidir entre a possibilidade da amilase estar sofrendo degradação proteolítica e/ou estar em condições inadequadas durante a diálise contra EDTA. Os resultados, embora não conclusivos, sugerem que um metal divalente, que poderia ser cálcio, é essencial para a amilase de R. americana, da mesma forma que para as amilases de várias fontes (VALLEE et al., 1959), incluindo insetos (APPLEBAUM, 1964; DOANE, 1969; BUONOCORE et al., 1976).

3.2.4 Padrão de ação de amilase

A Figura 9 mostra que a amilase do tubo digestivo de R. americana é uma endoamilase (α -amilase, EC 3.2.1.1) porque sob sua ação ocorre uma grande diminuição de peso molecular do amido (medido pelo valor azul) como consequência de um pequeno número de ligações glicosídicas hidrolizadas (medido pelo valor de redução). A Figura 9 mostra também que o padrão de ação da amilase do tubo digestivo de R. americana é diferente daqueles da amilase do pâncreas de porco e de B. subtilis. É importante notar que os resultados apresentados não estão afetados pelo processo de envelhecimento da suspensão de amido, porque este não ocorre em soluções de concentração 0,5% em tempos inferiores a 5h (Fig. 2).

FIGURA 9. Comparação da ação de amilases de diferentes fontes sobre amido solúvel 0,5%. Valor azul é definido como $(A_t/A_0) \times 100$, onde A_0 e A_t são as absorvâncias (620 nm) do complexo de iodo das amostras incubadas no tempo zero e a t min de hidrólise. (●) RA, amílase intestinal de *R. americana* em tampão fosfato 0,05M pH 8,0, NaCl 10 mM, 37°C; (▲) PP, α-amílase de pâncreas de porco em tampão fosfato 0,05M pH 6,9, NaCl 10 mM, 40°C; (○) BS, α-amílase de *Bacillus subtilis* em tampão fosfato 0,05M, pH 6,4, NaCl 10 mM, 40°C.

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A α -amilase de R. americana pode ser separada eletroforeticamente em duas isozimas principais em gel de poliacrilamida (Fig. 10). Um e algumas vezes dois picos menores de atividade são encontrados nos géis com uma mobilidade maior do que aquele do segundo pico principal. Na Figura 10 apenas um de tais picos é visível (Fração 19). A recuperação da atividade amilásica aplicada nos géis é da ordem de 64-71%, o que concorda com os resultados de MUUS & VNENCHAK (1964) para amilase salivar medida em condições aproximadamente iguais às nossas. O pico principal corresponde a aproximadamente 80% da atividade encontrada nos géis, enquanto que o segundo pico varia entre 10 e 20% dependendo da ocorrência das isozimas minoritárias de mobilidade elevada.

3.3 A TREALASE DO TUBO DIGESTIVO DE *R. americana*

3.3.1 Distribuição intracelular

A atividade de trealase encontrada em homogenatos do intestino médio de R. americana é completamente solúvel (Tabela VII) e não é aumentada por repetidos congelamentos e descongelamentos.

3.3.2 Propriedades físicas e ausência de isozimas

Existe apenas uma espécie molecular responsável pela atividade trealásica solúvel encontrada no intestino médio de R. americana. Esta afirmação é baseada no fato de que amostras de homogeneizados de intestino médio, após separação eletroforética em cinco concentrações diferentes de gel de poliacrilamida ou após focalização isoelétrica em gel, apresentam apenas um pico de atividade. Os dados de migração em gel foram usados para estimar o peso molecular de trealase como sendo 122000 daltons (Fig. 11) e a focalização isoelétrica mostrou que o pI da trealase é 4,6 (Fig. 12).

FIGURA 10. Atividade amilásica em uma coluna de gel de poliacrilamida após uma corrida eletroforética de 6h. As condições da corrida e ensaio estão descritas em Material e Métodos (2.11).

TABELA VII

Distribuição da trealase nas frações subcelulares do
intestino médio de R.americana¹

Fração	Atividade	
	mU/intestino	%
Homogeneizado	50,1	100,0
Sedimento, 10000g, 10 min	0,05	0,1
Sobrenadante, 10000g, 10 min	49,8	99,5
Sedimento, 105000g, 60 min	0,0	0,0
Sobrenadante, 105000g, 60 min	48,4	97,0

- 1- Intestinos médios de R. americana após lavados e-exaustivamente com salina foram homogeneizados em água bidestilada e neutralizada e então passados em lã de vidro. O filtrado resultante foi submetido a centrifugação diferencial. Os sedimentos foram dispersos em Triton X-100 0,1%, NaCl, 0,1 M antes de ensaiar nas condições padrões da mesma forma que os sobrenadantes. Os dados correspondem à média de duas determinações independentes.

FIGURA 11. Peso molecular da trealase intestinal de *R. americana* determinado por eletroforese em diferentes concentrações de gel de poliacrilamida (2.15). EA, albumina de ovo; AA, alfa amilase de pâncreas de porco; C, Catalase; F, Ferritina; m , função que descreve a diminuição da migração da proteína em concentrações de gel crescentes. Ver Métodos (2.15) para maiores detalhes.

FIGURA 12. Focalização isoelétrica da trealase intestinal de *R. americana* em gel de poliacrilamida. As condições são descritas em Métodos (2.16).

3.3.3 Estequiometria da reação e efeito do pH, temperatura e concentração de substrato

Dois moles de glicose são formados por mol de trealose pela ação da trealase, conforme determinações feitas pelos métodos da glicose oxidase-peroxidase ou DNS.

O efeito da concentração de substrato na trealase intestinal é mostrado na Figura 13 usando um plote de Lineweaver-Burk, do qual foi calculado um K_m aparente de 0,67 mM para trealose. A enzima é altamente estável ao calor, desde que uma exposição a 50°C por 2h diminui apenas 40% de sua atividade (Fig. 14). A energia de ativação da trealase do tubo digestivo determinada em condições de saturação por substrato entre 10 e 30°C é 16,7 Kcal/mol (Fig. 14).

O efeito do pH sobre a atividade trealásica sugere a existência de um grupo desprotonado ($pK_1 = 4,9$) e um grupo protonado ($pK_2 = 8,3$) no sítio ativo da forma funcional da enzima, a qual apresenta um ótimo de atividade funcional aparente em pH 6,0 (Fig. 15). Um plote de $\log(V_{max\ ap}/K_{m\ ap})$ contra pH é ligeiramente deslocado para pHs menores em relação ao mostrado na Figura 15, sugerindo que a ligação do substrato altera pouco a ionização dos grupos prototrópicos do sítio ativo. Consequentemente, plotes de pK_m contra pH são muito pouco reveladores.

3.3.4 Natureza dos grupos prototrópicos do sítio ativo

Numa tentativa de identificar os grupos prototrópicos do sítio ativo da trealase, a partir de suas entalpias de ionização, determinamos os respectivos pKs em diferentes temperaturas. Devido a dificuldade em se determinar pKs a partir de plotes de Dixon (DIXON, 1953b), principalmente do grupo desprotonado em nosso caso, uma vez que a trealase é instável em pHs menores do que 5, opta

FIGURA 13. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da trealase intestinal de *R. americana*. Os ensaios foram realizados nas condições padrões. A linha reta foi ajustada aos pontos pelo método dos quadrados mínimos. r é o coeficiente de correlação linear.

FIGURA 14. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da trealase intestinal. Os ensaios para o plot de Arrhenius foram realizados nas condições padrões a diferentes temperaturas. A linha reta foi ajustada aos pontos entre 10 e 30°C ($r = 0,9978$). A estabilidade térmica da trealase foi determinada incubando-se as amostras de enzima em tampão citrato-fosfato 0,2M (pH 6,0) em diferentes temperaturas por 2h antes de ensaiar nas condições padrões.

FIGURA 15. Efeito do pH na atividade e estabilidade da trealase. As amostras de enzima foram incubadas nos diferentes pHs a várias concentrações de trealose e o $V_{\max}$ aparente foi extrapolado de plotes de Lineweaver-Burk. Os ensaios foram realizados em tampão universal (ácido fosfórico 0,01M, ácido fenilacético 0,01M e ácido bórico 0,01M) a 30°C. Para a determinação da estabilidade ao pH a enzima permaneceu por 2H a 30°C no tampão universal a diferentes pHs, antes de ser diluída 10 vezes pela adição de tampão citrato fosfato 0,2M (pH 6,0) seguido por ensaios nas condições padrões.

mos pelo uso de gráficos lineares não logarítmicos, como descrito em Material e Métodos (2.18).

Os resultados das determinações de pK_s são mostrados na Figura 16 e os parâmetros termodinâmicos calculados a partir destes são apresentados na Tabela VIII. De acordo com o que foi comentado anteriormente (3.3.3), os grupos prototrópicos presentes na enzima livre e no complexo enzima-substrato comportam-se de maneira similar. Embora as entalpias determinadas apresentem desvios consideráveis, o único grupo cuja entalpia de ionização cai dentro dos limites de erro determinados para as entalpias dos grupos prototrópicos do sítio ativo da trealase é o grupo carboxila (compare Tabela VIII, com a compilação de dados em COHN & EDSALL, 1943). Isso significa que devem existir duas carboxilas no sítio ativo da trealase: uma com pK 4,9 e outra com pK 8,3. Carboxilas com pK 4,9 já foram descritas anteriormente (cf. COHN & EDSALL, 1943), enquanto que para apresentar um pK 8,3 o grupo carboxila teria que estar em um meio bastante hidrofóbico. A hidrofobicidade do meio eleva o pK dos grupos, que ao ionizar-se o fazem com separação de cargas, quase inteiramente devido a uma entropia mais negativa (FROST & PEARSON, 1961). Em relação a isso é interessante observar, como exemplo, que a ionização do ácido acético em água apresenta um $pK = 4,76$, $\Delta H_{ion}^{\circ} = -0,09$ Kcal/mol e $\Delta S_{ion}^{\circ} = -22,1$ cal/mol/grau que mudam para $pK = 10,51$, $\Delta H_{ion}^{\circ} = -1,34$ Kcal/mol e $\Delta S_{ion}^{\circ} = -50,8$ cal/mol/grau em dioxana 82% em água (HARNED & OWEN, 1958). Uma inspeção na Tabela VIII mostra que ΔS_{ion}° da carboxila de maior pK é consideravelmente mais negativa do que a de menor pK , de acordo com a suposição de que ela estaria em um ambiente mais hidrofóbico.

Usando raciocínio similar ao precedente, a determinação dos pK_s dos grupos prototrópicos da trealase em solventes com concentrações crescentes de dioxana deveria resultar em pK_s crescentes se os grupos ionizarem-se com separação de cargas e em pK_s inalterados se a ionização não envolver separação de cargas. Este tipo de experiência foi realizado anteriormente para ribonuclease (FINDLAY et al.,

FIGURA 16. Efeito da temperatura nos pK_s dos grupos ionizáveis no sítio ativo da trealase intestinal de *R. americanus*. pK_e , pK_s da enzima livre; pK_{es} , pK_s do complexo enzima-substrato. Ver Métodos (2.18) para detalhes.

TABELA VIII

Parâmetros termodinâmicos de ionização dos grupos prototrópicos do sítio ativo da trealase intestinal a 25°C¹

Grupo Prototrópico	ΔG_{ion}^0 (Kcal/mol)	ΔH_{ion}^0 (Kcal/mol)	ΔS_{ion}^0 (cal/mol/grau)
e ₁	6,70 [±] 0,19	0,6 [±] 0,9	-19,3 [±] 3,8
es ₁	6,73 [±] 0,31	1,0 [±] 1,3	-19,2 [±] 5,6
e ₂	11,23 [±] 0,40	1,8 [±] 2,4	-31,5 [±] 9,4
es ₂	11,32 [±] 0,42	1,9 [±] 2,5	-31,5 [±] 9,8

- 1- Os dados são médias seguidas dos limites de erro com 95% de confiança. Os grupos prototrópicos são numerados de acordo com seus pKs. e, grupos ionizáveis na enzima livre; es, no complexo enzima-substrato. Ver texto para maiores detalhes.

1963) e quimotripsina (KAPLAN & LAIDLER, 1967). A Tabela IX mostra que os pKs da enzima livre se alteram de forma crescente com o aumento de dioxana no meio, dando suporte à hipótese de que os grupos prototrópicos do sítio ativo da trealase são carboxilas. Por outro lado, os pKs do complexo enzima-substrato não são alterados nas mesmas condições, sugerindo a existência de competição entre substrato e dioxana pelo sítio de ligação da trealase. Os valores de $V_{\max}$ e K_m independentes do pH em água e em dioxana (Tabela IX) confirmam a hipótese de que dioxana e trealase competem pelo sítio ativo da trealase. Um plote de K_m independente do pH em função da concentração de dioxana resulta em uma linha reta ($r = 0,9984$) demonstrando que a inibição é do tipo competitivo linear simples e permite determinar o K_i da dioxana como sendo 0,48M.

3.3.5 Especificidade de substrato e inibidores da trealase

A trealase intestinal de R. americana hidroliza apenas α, α' -trealose entre vários outros dissacarídeos (Tabela X). Ela é fortemente inibida competitivamente por sacarose e NP β Gli e em menor extensão por outros carboidratos (Tabela X). Os reagentes sulfidrílicos PMB (0,1 mM) e IA (50 mM) não inibem significativamente a trealase intestinal.

A inibição da trealase por Tris a força iônica constante (500 mM) é do tipo competitivo linear simples a pH 6,0 (Fig. 17) e do tipo não competitivo linear a pH 9,2 (Fig. 18). Os resultados sugerem que Tris protonado liga-se mais ($K_i = 74$ mM) do que o Tris desprotonado (K_i 182 mM) à enzima. Por outro lado, a ligação das duas formas de Tris deve ser diferente, uma vez que o Tris protonado presente no sítio ativo impede a ligação da trealose, enquanto que o Tris desprotonado torna-a difícil (α 4,7), mas não impede a ligação. Em ambos os casos, contudo, há ligação de apenas uma molécula de Tris por sítio

TABELA IX

Efeito da dioxana na ionização dos grupos prototrópicos do sítio ativo da trealase intestinal e sobre $V_{\max}$ e K_m independentes do pH a 25°C.¹

Solvente	pK_{e_1}	pK_{es_1}	pK_{e_2}	pK_{es_2}	$V_{\max}$ (mU)	K_m (mM)
Água	4,97	4,83	8,30	8,26	2,56	0,48
Dioxana 7%	5,20	4,94	8,48	8,18	2,53	1,42
Dioxana 15%	5,61	4,74	8,86	8,15	2,78	2,32

1- Os pKs são numerados da mesma maneira que na Figura 16. Ver texto para maiores detalhes.

TABELA X

Especificidade de substrato e inibição da trealase
intestinal purificada de R.americana¹

Carboidrato	% inibição	K_i (mM)	Carboidrato	% inibição
Sacarose	61,6	1,4	Lactose	8,3
NP β Gli	44,2	2,5	Celobiose	7,2
Turanose	23,1	5,9	Melibiose	6,4
P β Gli	18,3	6,5	Maltose	2,0
NP α Gli	25,2	7,1		

- 1- Trealase intestinal de R.americana purificada por eletroforese em gel de poliacrilamida foi incubada com cada um dos carboidratos (15 mM) listados com e sem trealose (5 mM) nas condições padrões de ensaio. Nenhum dos carboidratos tem propriedades de substrato, embora eles afetassem em extensão variada a ação da enzima sobre a trealose. Os K_i foram determinados a partir de replotes das inclinações de plotes de Lineweaver-Burk contra a concentração do inibidor. Quatro concentrações diferentes de inibidor foram utilizadas em cada caso e os resultados mostraram que todos eles eram inibidores competitivos lineares simples.

FIGURA 17. Inibição por Tris a pH 6,0 da trealase intestinal purificada eletroforéticamente. Plotes de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de Tris; inserção, replote dos $K_{m,ap}$ calculados dos plotes de Lineweaver-Burk contra a concentração de Tris. A força iônica nos ensaios foi mantida constante (500 mM) pela adição de quantidades adequadas de NaCl.

FIGURA 18. Inibição por Tris a pH 9,2 da trealase intestinal purificada eletroforéticamente. Plotes de Lineweaver-Burk para concentrações diferentes de Tris; inserção, replote de inclinações (incl) e interceptos (intcp) dos plotes de Lineweaver-Burk contra a concentração de Tris. Força iônica = 500 mM.

ativo, conforme sugerido pelas retas obtidas com os replotes de inclinações e interceptos (Figuras 17 e 18).

3.3.6 Inibição múltipla de trealase

Uma inibição múltipla de trealase por Tris mais sacarose e por dioxana mais sacarose foi realizada afim de se assegurar que dioxana e Tris realmente ligam-se ao sítio ativo. Sacarose foi escolhida como um dos inibidores pelo fato dela ser estruturalmente semelhante ao substrato da trealase, e pela sua alta afinidade pela enzima (K_i 1,4 mM), o que deve implicar em um ajuste perfeito ao sítio ativo da trealase. Os resultados mostrados na Figura 19 indicam que Tris e sacarose ligam-se ao mesmo sítio, uma vez que o fator de interação (α) de Tris e sacarose no complexo enzima-inibidor deve ser ∞ para que o plote resulte em uma família de retas paralelas e o plote de Yagi-Ozawa (linhas interrompidas na Figura 19) seja linear (YONETANI & THEORELL, 1964). O fator de interação (α) de dioxana e sacarose no complexo enzima-inibidor é, dentro do erro experimental, ∞ (Fig. 20). Isto suporta a afirmação anterior que dioxana liga-se ao sítio ativo da trealase. Por outro lado, esses resultados são uma evidência de que a equação e os processos de plotação comentados anteriormente (2.20) são adequados para a análise de inibição múltipla, quando dioxana é um dos inibidores.

O fator de interação (α) entre dioxana e Tris no complexo enzima-inibidor é 1,9 (Fig. 21). Isto significa que Tris e dioxana ligam-se a sítios diferentes, mas um pouco interpenetrados, no centro ativo da trealase.

FIGURA 19. Inibição múltipla de trealase intestinal eletroforéticamente purificada por Tris e sacarose a pH6,0; plote de Yonetani-Theorell (YONETANI & THEORELL, 1964).

FIGURA 20. Inibição múltipla por dioxana e sacarose a pH 6,0 da trealase intestinal eletroforeticamente purificada. As barras verticais representam os desvios padrões das médias. A linha cheia é a reta que melhor se encaixa aos pontos experimentais usando o método dos quadrados mínimos. As linhas interrompidas são teóricas. α é o fator de interação entre os dois inibidores no complexo enzima-inibidor.

FIGURA 21. Inibição múltipla por Tris e dioxana a pH 6,0 da trealase intestinal eletroforéticamente purificada. As barras verticais representam os desvios padrões das médias. α é o fator de interação entre os dois inibidores no complexo inibidor-enzima. As linhas para $\alpha = 1$ e $\alpha = \infty$ são teóricas, enquanto que aquela para $\alpha = 1,9$ corresponde à linha reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais usando o método dos quadrados mínimos.

4. DISCUSSÃO

4.1 FISIOLOGIA DA DIGESTÃO DE *R. americana*

4.1.1 pH no tubo digestivo

Os pHs determinados no ceco e ventrículo de *R. americana* concordam com aqueles de várias espécies de Culicidae, cujos pHs foram medidos por técnicas similares às nossas (cf. CLEMENTS, 1963). Entretanto, o pH intestinal de algumas das referidas espécies foram redeterminados "in vivo" e os resultados indicaram que os dados tabulados por CLEMENTS (1963) estavam subestimados de cerca de uma unidade de pH (cf. DADD, 1975). Esta discrepância parece ser consequência do fato de que manipulações traumáticas induzem diminuições no pH intra-intestinal das larvas, o que só pode ser evitado por determinações realizadas "in vivo" (DADD, 1975). Devido a isso é possível que os pHs determinados para *R. americana* estejam um pouco subestimados.

DADD (1975) baseando-se em seus resultados e nos encontrados na literatura propôs que intestinos médios altamente alcalinos seriam uma característica taxonômica de Culicidae, da mesma forma que o são para Lepidoptera, e não uma consequência de adaptação à fitofagia, como proposto anteriormente. Da mesma forma que os Lepidoptera, o fato de *R. americana* apresentar uma elevada alcalinidade no tubo digestivo pode ser apenas uma característica taxonômica e não devido ao fato de ser fitófaga. Não está afastada a possibilidade de que a proposição de DADD (1975) possa ser estendida dos Culicidae para outras famílias de Nematocera, como os Sciaridae que incluem a *R. americana*.

4.1.2 Distribuição das enzimas entre os segmentos do tubo digestivo

Existem vários fatores que podem introduzir erros na interpretação dos resultados de distribuição de enzimas entre os segmentos do tubo digestivo. Assim, o conteúdo luminal do ceco pode estar contaminado por material celular devido a descamações de células "in vivo" e/ou como uma consequência da ruptura de células durante a dissecação. Nesse sentido é importante recordar as pesquisas realizadas em vertebrados onde propôs-se inicialmente a existência do "suco entérico", secreção enzimática das células intestinais, a partir das determinações de dissacaridases, enteroquinase e certas peptidases no lúmen do intestino. Sabe-se hoje que as referidas enzimas estão firmemente presas às células e que as atividades encontradas no lúmen são devidas a fragmentos de células resultantes de descamações das vilosidades intestinais (cf. BARNARD, 1973b).

As preparações de membrana peritrófica, por sua vez, estão necessariamente contaminadas pelo material presente no lúmen do ceco, cujo conteúdo é contínuo ao espaço ventricular ao redor da membrana peritrófica e por isto está fisicamente em contacto com a superfície externa daquela membrana. A referida contaminação não pode ser evitada por lavagem da membrana peritrófica recém dissecada porque qualquer manipulação excessiva dessa membrana leva a grandes perdas de seu conteúdo.

Devido aos problemas comentados acima, alguns critérios foram estabelecidos para se analisar a distribuição das enzimas entre os vários segmentos do tubo digestivo. As enzimas consideradas como secretadas foram aquelas cuja atividade específica no material do conteúdo do ceco era maior do que nas células; as demais enzimas foram consideradas como restritas às células e sua eventual ocorrência no lúmen intestinal foi interpretada como um artefato. As enzimas cuja atividade específica nos homogeneizados de membrana peritrófica era maior do que nos de células foram

assumidas como sendo enzimas que penetravam na membrana peritrófica. Embora este critério seja mais arbitrário que o anterior, ele parece satisfatório porque todas as enzimas que o satisfazem apresentam pelo menos 30% da atividade total recuperada nos segmentos do tubo digestivo de R. americana nas preparações de membrana peritrófica (Tabelas IV, V), enquanto que as demais apresentam ali sempre menos do que 14% da atividade total.

Baseando-se nos critérios comentados acima e inspecionando-se as Tabelas IV, V e VI assumiu-se que as enzimas distribuem-se no tubo digestivo de R. americana da seguinte maneira: a) Enzimas restritas às células: glicoamilase, α e β -glicosidase, α e β -galactosidase, carboxipeptidase A, carboxipeptidase B, glicil-glicina dipeptidase, carboxilesterase, lipase (NPM), fosfatase alcalina e fosfatase ácida; b) Enzimas secretadas para o lúmen do intestino médio, mas que não penetram na membrana peritrófica: trealase e aminopeptidases; c) Enzimas secretadas para o lúmen do intestino médio e que penetram na membrana peritrófica: α -amilase, celulase, tripsina, quimotripsina e provavelmente as proteinases de especificidade não determinadas.

Embora a carboxipeptidase A e a glicil-glicina dipeptidase tenham sido consideradas como restrita às células, a atividade específica relativamente alta que elas apresentam no conteúdo do ceco não permite que se afaste a possibilidade delas serem secretadas para o lúmen intestinal em pequenas quantidades.

O fato de glicosidases, esterase e fosfatases, não serem detectadas fora das células, não invalida a hipótese acima de que os conteúdos luminais estariam contaminados por fragmentos celulares. Deve-se lembrar (ítems 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4) que a recuperação dessas enzimas nos homogeneizados de células é bem superior à atividade medida em homogeneizados de tubos digestivos inteiros, o que sugere que essas enzimas sejam sensíveis às proteases acumuladas nos conteúdos luminais.

As proteases de animais são usualmente secretadas na forma de zimógenos. Estes foram descritos em numerosos animais (cf. BARNARD, 1973b) inclusive em um inseto (FELSTED et al., 1973). Curiosamente, as proteases acima consideradas como sendo secretadas são recuperadas apenas parcialmente nos segmentos do intestino médio, o que poderia ser interpretado (item 3.1.3) como o resultado da ocorrência de zimógenos nas células. Por outro lado, as proteases consideradas como restritas às células são recuperadas totalmente nos segmentos do tubo digestivo. Caso a interpretação apresentada esteja correta isso significaria que as proteinases e aminopeptidases são secretadas em R. americana na forma de zimógenos e as carboxipeptidases seriam ligadas às células. É interessante notar que a situação em vertebrados é diferente. Nesses as proteinases e carboxipeptidases são secretadas na forma de zimógenos, enquanto que as aminopeptidases são ligadas às células (cf. BARNARD, 1973b).

4.1.3 Digestão de carboidratos e o papel da trealase

A hidrólise do amido ingerido pela larva de R. americana deve iniciar-se no interior da membrana peritrófica, onde se encontra a maior parte da α -amilase. À medida que as dextrinas formadas tornam-se pequenas o suficiente para atravessarem a membrana peritrófica elas continuarão sendo atacadas pela α -amilase, agora no conteúdo luminal do ceco e, certamente, nos espaços luminiais do ventrículo exteriores à membrana peritrófica. Esses espaços comunicam-se com o lúmen dos cecos. Uma vez que a α -amilase de R. americana possui uma atividade aproximadamente constante de pH 5,5 a 9,0 ela deve ser igualmente ativa no interior da membrana peritrófica e dos cecos.

As moléculas de maltose, e talvez de pequenos oligossacarídeos, resultantes da ação da α -amilase sobre amido, são posteriormente clivados pela α -glicosidase ao nível das células do ceco e do ventrículo posterior.

É possível que essa atividade hidrolítica ocorra ao nível das microvilosidades das células e que a hidrólise esteja acoplada ao processo de absorção, como ocorre em vertebrados (BARNARD, 1973a). Alguns fatos dão suporte a essa hipótese. Entre eles temos as evidências comentadas anteriormente (3.1.2) da existência de maltases ligadas à membrana e o fato da fosfatase básica, enzima presente nas microvilosidades de células de mucosa intestinal de vertebrados e implicada em processos de transporte (BARNARD, 1973b), ocorrer principalmente no epitélio dos cecos e ventrículo posterior de R. americana, da mesma forma que a maltase (Tabelas IV e VI). Devido às considerações anteriores é possível que o fato da maior parte da atividade maltásica nas células estar localizada no epitélio dos cecos, e do ventrículo posterior, seja uma consequência da diferenciação dessas células ao nível de bordo estriado. Infelizmente não existem estudos ao nível de microscopia eletrônica em R. americana a fim de apoiar ou não a hipótese referida acima. Estudos realizados em Sarcophaga bullata, entretanto, mostraram a existência de uma diferenciação regional no bordo estriado das células epiteliais do ventrículo. As células epiteliais do ventrículo posterior desse Diptera apresentam microvilosidades maiores que os da região anterior, e, frequentemente, são ramificados (NOPANITAYA & MISCH, 1974).

A degradação de celulose em R. americana provavelmente segue processo similar ao descrito acima para amido. A celulose deve ser hidrolizada inicialmente no interior da membrana peritrófica, seguido pela digestão das celodextrinas de baixo peso molecular nos espaços luminiais externos à membrana peritrófica. Em ambos os sítios a hidrólise ocorre sob ação do sistema celulase, que funciona com atividade máxima no pH do lúmen do ceco e a 70% de sua atividade máxima no pH do conteúdo da membrana peritrófica. As moléculas de celobiose, e talvez de outras celodextrinas, formadas nos espaços luminiais devem ser agora clivadas pela β -glicosidase presente principalmente no epitélio dos cecos e ventrículo posterior. Não está afastada a hipó

tese da β -glicosidase ocorrer nas microvilosidades das células como proposto acima para a α -glicosidase, embora não tenhamos nenhuma evidência nesse sentido, a não ser o fato da distribuição da atividade de β -glicosidase nos segmentos do tubo digestivo ser similar à da α -glicosidase.

A ocorrência da trealase somente no conteúdo do ceco e células do intestino médio se encaixa bem na hipótese de WYATT (1967) segundo a qual o papel da trealase do tubo digestivo de insetos seria evitar a perda da trealose hemolinfática por difusão através da parede do tubo digestivo. Assim, a trealose seria clivada dentro da parede do tubo digestivo, onde o pH está dentro da faixa ótima de atividade da enzima, permitindo reabsorção da glicose formada a favor de gradiente, uma vez que a concentração de glicose na hemolinfa de insetos é usualmente baixa, enquanto que a da trealose é alta, cerca de 4 mM em R. americana, onde corresponde a pelo menos 70% do carboidrato total presente na hemolinfa (TERRA et al., 1974). A trealase presente no lúmen dos cecos, em cujo pH a enzima apresenta 70% de sua atividade máxima, serviria como uma segunda linha de defesa, provavelmente necessária devido à grande superfície dos cecos (quase o dobro do ventrículo).

4.1.4 Digestão de proteínas

A digestão de proteínas na larva de R. americana deve iniciar-se no interior da membrana peritrófica sob a ação de várias proteinases como tripsina, quimotripsina e, provavelmente, outras proteinases de especificidade desconhecida. Embora essas enzimas ocorram em grandes quantidades no lúmen dos cecos, o fato de seu pH ótimo ser superior a 9 faz com que sua atividade ali sejam bem inferior àquela observada no interior da membrana peritrófica. Devido a isso, os oligopeptídeos pequenos o bastante para atravessarem a membrana peritrófica devem ser atacados no lúmen do ceco principalmente pelas aminopep-

tidases cujo pH ótimo é de cerca de 8. As carboxipeptidases e a dipeptidase são bem menos ativas do que as aminopeptidases e parecem ser restritas às células, ocorrendo principalmente nos cecos. É possível que as carboxipeptidases ocorram nas microvilosidades das células a fim de poderem cooperar com as aminopeptidases na hidrólise dos oligopeptídeos, antes de sua absorção. Entretanto não existe, até o presente, nenhuma evidência nesse sentido.

4.1.5 Organização espacial do processo digestivo e seu significado biológico

As glândulas salivares da larva de R. americana, assim como, o intestino anterior e posterior, não apresentam nenhuma quantidade significativa de enzimas digestivas. Consequentemente, todo o processo digestivo da larva ocorre sob a ação de enzimas presentes no intestino médio, da mesma forma que descrito anteriormente para numerosos outros insetos (cf. WIGGLESWORTH, 1972).

Baseando-se na distribuição das enzimas no intestino médio discutida acima (4.1.2), pode-se propor a existência de três fases no processo digestivo de R. americana que estão espacialmente organizadas. A primeira fase ocorre no interior da membrana peritrófica e consiste no ataque às ligações internas de polímeros, resultando em oligômeros com tamanho molecular pequeno o suficiente para difundir-se para fora da membrana peritrófica. A segunda fase da digestão ocorre nos espaços luminais exteriores à membrana peritrófica. Esses espaços consistem majoritariamente no lúmen dos cecos e, em menor escala em pequenos bolsões formados entre o epitélio ventricular e as pregas da membrana peritrófica. Essas pregas são consequência do fato do diâmetro da membrana peritrófica de R. americana ser maior do que o do ventrículo (MARQUES, 1976). Deve-se ressaltar que os referidos bolsões devem ser estruturas dinâmicas, mudando de posição sob a ação dos movimentos ventriculares, e, por isso, devem estar em continuidade periódica com o

lúmen dos cecos. O tipo de enzimas envolvidas nessa segunda fase da digestão dependerá da natureza do oligômero. Se este for de um homopolímero (amido ou celulose) ele será hidrolizado pelos mesmos tipos de enzimas presentes no interior da membrana peritrôfica, enquanto se for originado de um heteropolímero (proteína), as enzimas serão diferentes. Finalmente, a terceira fase da digestão ocorre nas células epiteliais dos cecos e, em menor proporção, nas células epiteliais do ventrículo posterior. Conforme foi comentado acima, existe a possibilidade de que pelo menos parte desta fase da digestão ocorra nas microvilosidades das células epiteliais referidas.

A existência de dois sítios extracelulares para a digestão de R. americana parece ser uma adaptação para poupar enzimas digestivas, uma vez que, somente as enzimas que penetrarem na membrana peritrôfica serão perdidas rapidamente, como consequência da membrana permitir a entrada, mas não a saída de macromoléculas. Por outro lado, as enzimas incapazes de atravessar a membrana peritrôfica devem ser perdidas muito lentamente porque tenderão a ser retidas nos bolsões formados entre o epitélio ventricular e as pregas da membrana peritrôfica.

4.2 A AMILASE DE *R. americana*

4.2.1 Propriedades cinéticas

A amilase intestinal de R. americana tem um pH ótimo alcalino (Fig. 1) como poderia ser esperado do pH prevalecente no interior de seu tubo digestivo (3.1.1) e de acordo com os achados de SHINODA (1930) que mostrou que a amilase em insetos herbívoros tem um pH ótimo alcalino.

A energia de ativação aparente de catálise da amilase intestinal de R. americana é baixa (4,8 Kcal/mol) em comparação a de outras amilases de animais (cf.

GREENWOOD & MILNE, 1968), mas é maior do que a E_a determinada por LEVITZKI & STEER (1974) para a α -amilase de pâncreas de porco. A amilase tem apenas uma E_a na faixa de 10-40°C (Fig. 3), que parece ser uma característica das α -amilases de animais (cf. GREENWOOD & MILNE, 1968).

A diminuição na velocidade de hidrólise de amido em concentrações maiores do que 2% (soluções frescas de amido) e 0,5% (soluções velhas de amido) pela amilase de R. americana (Fig. 2) pode ser explicada por envelhecimento (BERNFELD & STUDER-PÉCHA, 1947).

O K_m aparente da amilase do tubo digestivo de R. americana é 0,14% em relação a amido e é o dobro da maioria dos valores conhecidos para outras α -amilases (cf. GREENWOOD & MILNE, 1968), embora concorde com aquele determinado por LEVITZKI & STEER (1974) para a α -amilase de pâncreas de porco. Os valores de K_m , entretanto, são dificilmente comparáveis entre si, uma vez que eles diferem, algumas vezes amplamente, para a mesma fonte entre autores diferentes (cf. GREENWOOD & MILNE, 1968). Essas diferenças podem surgir se não se levar em consideração a influência da extensão de hidrólise sobre a determinação da velocidade inicial da ação da α -amilase (Van DYK et al., 1956; Van DYK & CALDWELL, 1956).

4.2.2 Ativação por cloreto

A ativação por cloreto parece ser uma característica das α -amilases animais; ela foi descrita para mamíferos (FISCHER & STEIN, 1960), crustáceos (BLANDAMER & BEECHEY, 1966) e insetos (GILMOUR, 1961). A ativação de α -amilases por outros ânions além de cloreto, assim como deslocamentos do pH ótimo da enzima na presença desses íons foram descritas em mamíferos (FISCHER & STEIN, 1960) e em insetos (HORI, 1972).

A amilase do tubo digestivo de R. americana liga-se a cloreto resultando em um aumento de 34

vezes na K_{cat} sem aparentemente afetar a afinidade da enzima pelo substrato (Fig. 2), mas causando o deslocamento do pH ótimo da enzima para o lado alcalino (Fig. 1). A ativação também ocorre com outros ânions além do cloreto e essa parece ser dependente do tamanho iônico.

A similaridade dos resultados obtidos com a amilase dos tubos digestivos de R. americana com aqueles descritos para α -amilases de mamíferos comentados acima, suporta a hipótese de que as α -amilases de insetos são ativadas por cloreto da mesma maneira que foi proposta para as α -amilases de mamíferos (cf. WAKIM et al., 1969; LEVITZKI & STEER, 1974).

4.2.3 Grupos sulfidrilas

A existência de grupos sulfidrilas no centro ativo da amilase do tubo digestivo de R. americana é improvável, uma vez que a enzima é resistente a altas concentrações dos reagentes sulfídrilicos PMB e IA. Devido a isto e ao fato de que a inibição por Hg^{++} foi medida depois que o equilíbrio foi alcançado (Fig. 8), o comportamento competitivo observado com Hg^{++} (Fig. 7) parece ser uma consequência dele romper a conformação normal da enzima que seria estabilizada pelo substrato. Nossos resultados estão de acordo com considerável quantidade de resultados que demonstraram que os grupos sulfidrilas não são essenciais para a atividade de α -amilase (THOMA et al., 1961; STEER et al., 1974; GRANGER et al., 1975) e que cisteína parece estar ausente da molécula da amilase de Tenebrio molitor (BUONOCORE et al., 1976a).

4.2.4 Padrão de ação de amilases

As alfa-amilases hidrolizam amido segundo um ataque múltiplo, isto é, através da clivagem de várias ligações durante a existência de um complexo enzima-substrato particular (ROBYT & FRENCH, 1967). As diferenças observadas nas curvas de valores azul - valores de redução

refletem diferenças no grau de ataque múltiplo das alfa-amilases (ROBYT & FRENCH, 1967). Este tipo de curva para a α -amilase de Bacillus subtilis é similar àquela de Aspergillus oryzae (KUNG et al., 1953) que tem um grau de ataque múltiplo de 1,7, enquanto que aquela do pâncreas de porco é de 6 (ROBYT & FRENCH, 1967). Devido a isso, e aos resultados mostrados na Figura 9, podemos supor que o grau de ataque múltiplo da amilase intestinal de R. americana é maior do que aquele da amilase de A. oryzae e menor do que o da amilase pancreática, isto é, deve estar entre 1,7 e 6.

O padrão de ação das amilases de insetos foram estudados por determinação da razão entre atividade de dextrinizante e sacarogênica (WIGGLESWORTH, 1927), determinação do ponto acrômico (APPLEBAUM, 1964), identificação dos produtos de hidrólise (APPLEBAUM, 1964; HORI, 1972) e determinação dos espectros do complexo iodo-amilose a diferentes tempos durante a hidrólise (McGEACHIN et al., 1972). Ele foi estudado também através do uso de curvas de valores azul - valores de redução, embora sem comparar com outras em zimas com grau de ataque múltiplo conhecido (PODOLER & APPLEBAUM, 1971) e usando amilose nativa e amilose oxidada como substrato (BUONOCORE et al., 1976a).

4.2.5 Isozimas de alfa-amilases

Isozimas de α -amilase tem sido descritas e purificadas em alguma extensão somente em alguns poucos casos como a partir de saliva humana (MUUS & VNENCHAK, 1964; KAUFFMAN et al., 1970), pâncreas de porco (MARCHIS-MOUREN & PASERO, 1967; COZZONE et al., 1970) e pâncreas humano (STIEFEL & KELLER, 1973). Em todos esses casos as isozimas consistiam em proteínas monoméricas tendo aproximadamente o mesmo peso molecular e apresentando pequenas diferenças na composição de aminoácidos (COZZONE et al., 1970) ou no conteúdo de carboidratos (KAUFFMAN et al., 1970).

Isozimas de amilase em insetos tem sido estudadas principalmente de um ponto de vista genético, usando Drosophila melanogaster (KIKKAWA, 1964; DOANE, 1967; BAHN, 1968). Embora aquelas isozimas de amilase não tenham sido purificadas, estudos cinéticos usando homogenatos de diferentes linhagens homozigotas indicaram que elas devem ser muito similares (DOANE, 1969).

Um enfoque genético para as isozimas de amilase é muito interessante, mas isso dificilmente poderia ser realizado com R. americana, devido a dificuldade de manutenção de linhagens dessas moscas (p.ex. TERRA et al., 1976). Por outro lado um enfoque bioquímico como desenvolvido para isozimas de amilase de mamíferos poderia ser desenvolvido em certa extensão com R. americana.

4.3 A TREALASE DE R. americana

4.3.1 Propriedades físicas e cinéticas

A trealase intestinal de R. americana é completamente solúvel e insensível a repetidos congelamentos e descongelamentos, como descrito previamente para outras trealases solúveis (WYATT, 1967). O pH ótimo de 6,0 e o Km de 0,67 mM determinado para a trealase de R. americana é similar àqueles encontrados para outras trealases do tubo digestivo de insetos (GUSSIN & WYATT, 1965; GILBY et al. 1967; YANAGAWA, 1971; FRIEDMAN, 1975; TALBOT & HUBER, 1975).

As trealases solúveis de insetos caem em duas grandes classes de peso molecular. Existem as trealases de alto peso molecular (115-135000 daltons) como descrito para Phormia regina (FRIEDMAN, 1975) e Apis mellifera (TALBOT & HUBER, 1975) e aquelas de peso molecular menor (70-90000 daltons) encontradas em Blaberus discoidalis (GILBY et al., 1967), Bombyx mori (YANAGAWA, 1971) e Phormia regina (FRIEDMAN, 1975). É interessante notar que a trealase de alto peso molecular de P. regina ocorre no in-

testino médio, enquanto que a de peso molecular menor ocorre nas papilas retais (FRIEDMAN, 1975).

A trealase do tubo digestivo de R. americana com um peso molecular de 122000 daltons cai na classe das trealases de alto peso molecular e ocorre principalmente no intestino médio. O pI da trealase de R. americana é 4,6 e, tanto quanto sabemos, esta é a primeira trealase solúvel cujo pI foi determinado.

4.3.2 O sítio ativo da trealase

Existem poucos estudos sobre a natureza dos grupos ativos na trealase. Os grupos sulfidrila parecem não fazer parte do sítio ativo, baseando-se nas concentrações elevadas de reagentes sulfidrílicos necessária para inibir trealases de várias fontes tais como insetos (GUILLOUX et al., 1968; HUBER & LEFEBVRE, 1971; TALBOT & HUBER, 1975; TALBOT et al., 1975; GIEBEL & DOMNAS, 1976; esta tese), fungos (AVIGAD et al., 1975) e mamíferos (LABAT et al., 1974; SASAJIMA et al., 1975).

A determinação do efeito do pH sobre V_{max} e/ou Km permitiu a determinação dos pKs de dois grupos prototrópicos do sítio ativo de uma trealase de fungo (AVIGAD et al., 1965), mamífero (LABAT et al., 1974) e inseto (TALBOT & HUBER, 1975). Esses estudos levaram à hipótese de que o grupo desprotonado (básico) das trealases seria uma carboxila (LABAT et al., 1974; TALBOT & HUBER, 1975) ou um imidazol (AVIGAD et al., 1965), enquanto que o grupo protonado (ácido) seria um imidazol (LABAT et al., 1974; TALBOT & HUBER, 1975) ou um grupo amino (AVIGAD et al., 1965). Contudo, como podem ocorrer deslocamentos dos pKs de grupos específicos, conforme sua vizinhança na cadeia polipeptídica (SEGEL, 1975), as referidas identificações devem ser confirmadas por outros métodos. Isso foi feito para a trealase renal de porco por LABAT et al. (1974). Estes, baseando-se na perda de 75% da atividade da

trealase por fotooxidação a pH 7,5, sugeriram que o grupo ácido da enzima (pK 6,7) seria um imidazol. Entretanto, como os próprios autores o reconhecem, a fotooxidação poderia afetar outros grupos e inativar a enzima simplesmente por modificação na sua conformação. Nesse sentido é interessante notar que a lisozima também sofre uma inativação de 70% por fotooxidação a pH 7,0 e não possui nenhum grupo imidazol no seu sítio ativo, mas sim duas carboxilas (COHEN, 1970).

Os dados apresentados nesse trabalho sugerindo a existência de duas carboxilas no sítio ativo da trealase do tubo digestivo são, tanto quanto sabemos, a melhor evidência sobre a natureza dos grupos ativos das trealases. Embora nossa hipótese deva ser confirmada por outros métodos, o fato dela estar baseada em estudos de enzimas nativas confere-lhe considerável confiabilidade.

A ocorrência de dois grupos carboxila no sítio ativo das glicosidases lisozima (Revisão em IMOTO et al., 1972), β -glicosidase (LEGLER & GILLES, 1970) e sacarase intestinal (BRAUN et al., 1977) está bem demonstrada. Admite-se nesses casos que as duas carboxilas estejam envolvidas no processo catalítico, uma agindo como um ácido para protonar o oxigênio glicosídico e a outra agindo como uma base para estabilizar o íon carbonium em formação (IMOTO et al., 1972; LEGLER, 1975; COGOLI & SEMENZA, 1975). É possível que o referido mecanismo ocorra em outras glicosidases, inclusive nas trealases.

4.3.3 Especificidade da trealase e sua inibição por Tris e dioxana

A trealase do tubo digestivo de R.americana é altamente específica para trealose, como descrito anteriormente para trealases de várias outras fontes (ELBEIN, 1974). Esta especificidade parece ser consequência da simetria de seu centro ativo, uma vez que epímeros assimétricos de trealose são maus substratos ou são inibidores competitivos da trealase (GUILLOUX et al., 1975).

Tris é conhecido como um bom inibidor competitivo de glicosidases desde muito tempo (LARNER & GILLESPIE, 1956; WALLENFELS & FISCHER, 1960). Na sacarase intestinal, o Tris liga-se na forma desprotonada ao subsítio da glicose no centro ativo da enzima (SEMENZA & von-BALTHAZAR, 1974). Embora Tris também iniba competitivamente as trealases (HUBER & LEFEBVRE, 1971; TALBOT et al. 1975; TALBOT & HUBER, 1975; esta (tese), os K_i s encontrados são muito maiores do que os encontrados para as demais glicosidases sugerindo que as trealases são inibidas por um mecanismo diferente. Estudos de inibição com Tris e compostos relacionados sugeriram que pelo menos dois grupos hidroxilas e o grupo amino do Tris são necessários para inibir a trealase solúvel de Drosophila (HUBER & LEFEBVRE, 1971). Estes últimos achados foram confirmados na presente tese com trealase intestinal de R. americana por um enfoque diferente.

Um modelo especulativo do ajuste de Tris e dioxana ao sítio ativo da trealase foi desenvolvido baseando-se nos dados de inibição e em modelos de bolas e bastões. De acordo com este modelo, a dioxana ligar-se-ia à porção média do sítio de ligação da trealose, nas vizinhanças de uma hipotética cavidade hidrofóbica que conteria a carboxila ativa protonada. Tris ligar-se-ia ao sítio da trealose de um modo assimétrico, envolvendo o seu grupo amino protonado, para se conformar aos dados cinéticos que sugerem que apenas uma molécula de Tris liga-se por sítio ativo e ao fato de K_i de Tris ser maior em pHs elevados. Uma possibilidade é o Tris ligar-se por duas de suas hidroxilas aos pontos de ligação das hidroxilas 6 e 2' da trealose e a um outro ponto através do seu grupo amino protonado. Os sítios propostos de ligação de Tris e dioxana seriam suficientemente separados para explicar a pequena interação observada entre Tris e dioxana no complexo enzima-inibidor. Em pHs elevados, o Tris desprotonado sofreria uma rotação permanecendo ligado à enzima somente por uma ou duas hidroxilas de tal forma a permitir uma ligação defeituosa da trealose.

5. RESUMO

Os ensaios quantitativos de grande número de enzimas em diferentes segmentos do tubo digestivo da larva de Rhynchosciara americana, mostraram que o processo digestivo ocorre no intestino médio, e permitiram propor a existência de tres fases espacialmente organizadas naquele processo. A primeira fase ocorreria no interior da membrana peritrófica e consistiria no ataque às ligações internas de polímeros, resultando em oligômeros que se difundiriam para fora da membrana peritrófica. A segunda fase da digestão consistiria na hidrólise dos oligômeros nos espaços luminais exteriores à membrana peritrófica, que incluem o lúmen dos cecos. Se o oligômero for derivado de um homopolímero (amido ou celulose) ele será hidrolizado pelos mesmos tipos de enzima presentes no interior da membrana peritrófica, enquanto se for originado de um heteropolímero (proteína), as enzimas serão diferentes. Finalmente, a terceira fase da digestão ocorre nas células epiteliais dos cecos e, em menor proporção, nas células epiteliais do ventrículo posterior. A existência de dois sítios extracelulares para a digestão de R.americana é considerada como uma adaptação para poupar enzimas digestivas, pois somente aquelas que penetrarem na membrana peritrófica serão perdidas rapidamente.

A amilase e a trealase presentes no tubo digestivo de R. americana foram escolhidas, devido a sua elevada atividade, para estudos mais detalhados.

A amilase de R. americana liga cloreto ($K_D = 1,6 \text{ mM}$ a 37°C) resultando em um aumento de 34 vezes no K_{cat} sem afetar o K_m , mas deslocando o pH ótimo da enzima de 6,8 para 8,0. Os íons Br^- , NO_3^- e I^- também ativam a enzima mas com eficiência decrescente. Um plote de Arrhenius de atividade em função da temperatura mostra que

a amilase apresenta apenas uma inclinação com uma energia de ativação aparente de 4,8 K cal/mol. A amilase parece ser uma metaloenzima que mostra uma inibição competitiva linear simples para Hg^{++} e uma inibição não competitiva linear simples para Cu^{++} com K_i respectivamente de 0,21 mM e 0,23 mM. A resistência aos reagentes sulfidrílicos p-mercurobenzoato e iodoacetato juntos com o alto K_i para Hg^{++} sugerem que grupos sulfidrilas não são essenciais para a atividade da amilase intestinal. Curvas de valores azul em função de valores de redução mostraram que a amilase intestinal é uma α -amilase (EC 3.2.1.1) com um grau de ataque múltiplo entre 1,7 e 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida de homogeneizados de intestino médio mostraram a existência de duas amilases principais, uma das quais predomina por larga margem. Os resultados são comparados com α -amilases de várias fontes.

A trealase (EC 3.2.1.28) intestinal de R. americana é solúvel, tem um peso molecular de $1,22 \times 10^5$ daltons e um pI de 4,6. O pH ótimo da enzima é 6,0, seu K_m aparente para trealose é 0,67 mM e sua energia de ativação é 16,7 Kcal/mol. Reagentes sulfidrílicos não inibem a trealase. Um estudo do efeito do pH sobre o $V_{\max}$ e $V_{\max}/K_m$ a diferentes temperaturas permitiu determinar os pKs dos grupos prototrópicos essenciais presentes na enzima e estimar $\Delta G^{\circ}_{\text{ion}}$, $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ e $\Delta S^{\circ}_{\text{ion}}$. Os resultados sugerem a existência de dois grupos carboxila no sítio ativo, um dos quais tem um pK muito alto (8,3). O aumento dos pKs dos grupos essenciais da enzima livre na presença de concentrações crescentes de dioxana suporta a hipótese de que aqueles grupos sejam carboxilas. A enzima purificada por eletroforese em gel de poliacrilamida hidroliza somente α, α' -trealose e é competitivamente inibida por vários compostos dos quais destacam-se sacarose e p-nitrofenil- β -D-glicosídeo. Tris e dioxana são inibidores competitivos fracos que se ligam a dois sítios diferentes no centro ativo da trealase, embora um pouco interpenetrados.

6. ABSTRACT

The quantitative assay of several enzymes in different sections of the Rhynchosciara americana larval gut showed the digestion occurs only in the midgut, and it gave support to the proposition that digestion takes place in three spatially organized steps. The first one occurs inside the peritrophic membrane and consists of an attack to the internal bonds of polymers, resulting in oligomers which diffuse out the peritrophic membrane. The second step in digestion is the hydrolysis of oligomers in the luminal spaces outside the peritrophic membrane, which include the lumina of the caeca. If the oligomer comes from a homopolymer (starch or cellulose) it will be hydrolyzed by the same kind of enzymes present inside the peritrophic membrane, while if it is derived from a heteropolymer (protein), the enzymes will be different. Finally, the third step in digestion occurs at the epithelial cells of caeca and, in a less extent, in the epithelial cells of the posterior ventriculus. The existence of two extracellular sites for digestion in R. americana is supposed to be an adaptation to conserve digestive enzymes, since only those which pass into the peritrophic membrane will be lost quickly.

The R. americana midgut amylase and trehalase, due to their high activity, have been chosen as the subjects of more detailed studies.

R. americana midgut amylase binds chloride ($K_D = 1.6 \text{ mM}$ at 37°C) resulting in a 34-fold increase in the K_{cat} without affecting the K_m , but causing a shift in the optimum pH of the enzyme from 6.8 to 8.0. The ions Br^- , NO_3^- , and I^- also activate the amylase but with a decreasing efficiency. An Arrhenius plot of activity ver-

sus temperature show that the amylase display only one slope with a corresponding apparent energy of activation of 4.8 Kcal/mole. The amylase seems to be a metalloenzyme which shows a simple linear competitive inhibition by Hg^{++} and a simple linear non-competitive inhibition by Cu^{++} with K_i respectively of 0.21 mM and 0.23 mM. The resistance to the sulfhydryl reagents p-mercuribenzoate and iodoacetate together with the high Hg^{++} K_i suggest that sulfhydryl groups are not essential for the midgut amylase activity. Curves of blue-reducing values showed the midgut amylase is an α -amylase (EC 3.2.1.1) with a multiple attack degree between 1.7 and 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of midgut homogenates shows the existence of two major isoamylases one of which is largely predominant. The results are compared with α -amylases from several sources.

The R. americana midgut trehalase (EC 3.2.1.28) is soluble and have a molecular weight of 1.22×10^5 daltons and a pI 4.6. The optimum pH of the enzyme is 6.0, its apparent K_m for trehalose is 0.67 mM and its energy of activation is 16.7 K cal/mole. Sulfhydryl reagents do not inhibit the trehalase. A study of the effect of pH on $V_{\max}$ and $V_{\max}/K_m$ at different temperatures make it possible to determinative the pKs of the essential prototropic groups present in the enzyme and to estimate $\Delta G_{\text{ion}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{ion}}^{\circ}$ and $\Delta S_{\text{ion}}^{\circ}$. The results suggest the existence of two carboxyl groups in the active site, one of which have a very high (8.3) pK. The increase of the pKs, of the essential groups of the free enzyme in the presence of increasing concentrations of dioxane supports the hypothesis those groups are carboxyls. The enzyme purified by polyacrylamide gel electrophoresis hydrolyzes only α, α' -trehalose and it is competitively inhibited by several compounds from which sucrose and p-nitrophenyl- β -D-glucoside are strong and Tris and dioxane are weak inhibitors. The latter inhibitors bind at two different, although a little interpenetrated sites in the active center of trehalase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAI H. (1969) Ultrastructural localization of phosphatases in the midgut of the silkworm, Bombyx mori. J. Insect Physiol. 15, 1623-1628.
- APPLEBAUM S.W. (1964) The action pattern and physiological role of Tenebrio larval amylase. J. Insect Physiol. 10, 897-906.
- APPLEBAUM S.W., JANKOVIC' M. & BIRK, Y. (1961) Studies on the midgut amylase activity of Tenebrio molitor L. larvae. J. Insect Physiol. 7, 100-108.
- AVIGAD G., ZIV O. & NEUFELD E. (1965) Intracellular trehalase of a hybrid yeast. Biochem. J. 97, 715-722.
- BACARELLA A.L., GRUNWALD E., MARSHALL H.P. & PULER E.L. (1958) Proof of the accuracy of pH measurements with the glass electrode in the system methanol-water. J. Phys. Chem. 62, 856-857.
- BAHN E. (1968) Crossing over in the chromosomal region determining amylase isozymes in Drosophila melanogaster. Hereditas 58, 1-12.
- BARNARD E.A. (1973a) Digestion. In Animal Comparative Physiology (Ed. by Prosser C.L.), pp 133-139, Saunders, Philadelphia.
- BARNARD E.A. (1973b) Comparative biochemistry of digestive enzymes. In Comparative Animal Physiology (Ed. by Prosser C.L.), pp 139-146, Saunders, Philadelphia.
- BERNFELD P. & STUDER-PÉCHA H. (1947) Recherche sur l'amidon. XXXV. La dégradation de l'amylose par l' α -amylase. Helv. Chim. Acta 30, 1895-1903.

- BLANDAMER A. & BEECHEY R.B. (1966) The purification and properties of an α -amylase from the hepatopancreas of Carcinus maenas, the common shore crab. Biochim. Biophys. Acta 118, 204-206.
- BOLLADE D., PARIS R. & MOULINS M. (1970) Origine et mode d'action de la lipase intestinale chez les blattes. J. Insect Physiol. 16, 45-53.
- BRAUN H., COGOLI A. & SEMENZA G. (1977) Carboxyl groups at two active centers of sucrase-isomaltose from rabbit small intestine. Eur. J. Biochem. 73, 437-442.
- BREUER M.E. (1969) Revision of the genus Rhynchosciara Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. Arch. Zool. S. Paulo 17, 167-198.
- BUONOCORE V., POERIO E., PACE W., PETRUCCI T., SILANO V. & TOMASI M. (1976b) Interaction of Tenebrio molitor L. α amylase with a wheat flour protein inhibitor. FEBS lett. 67, 202-206.
- BUONOCORE V., POERIO E., SILANO V. & TOMASI M. (1976a) Physical and catalytic properties of α -amylase from Tenebrio molitor L. larvae. Biochem. J. 153, 621-625.
- CALDWELL M.L., WEILL C.E. & WEILL R.S. (1945) Further studies of the essential groups of pancreatic amylase. J. Am. Chem. Soc. 67, 1079-1080.
- CAMPBELL R.C. (1967) Statistics for biologists. Cambridge University Press, Cambridge.
- CLEMENTS A.N. (1963) The Physiology of mosquitoes. Pergamon Press, New York.
- CLEMENTS A.N., PAGE J., BORCK K & Van DOYEN A.J.J. (1970) Trehalases of the fleshfly Sarcophaga barbata. J. Insect Physiol. 16, 1389-1404.

- COHEN L.A. (1970) Chemical modification as a probe of structure and function. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.), 3rd ed., V.1, pp 147-221, Academic Press, New York.
- COHN E.S. & EDSALL J.T. (1943) Proteins, amino acids and peptides. Reinhold Publishing Co., New York.
- COGOLI A. & SEMENZA G. (1975) Probable oxocarbonium ion in reaction mechanism of small intestine sucrase and iso maltase. J. biol. Chem. 250, 7802-7809.
- COOK B.J. & FORGASH A.J. (1965) The identification and distribution of the carboxylic esterases in the American cockroach, Periplaneta americana (L.). J. Insect Physiol. 11, 237-250.
- COOK B.J., NELSON D.R. & HIPPS P. (1969) Esterases and phosphatases in the gastric secretion of the cockroach Periplaneta americana. J. Insect Physiol. 15, 581-589.
- COUCH E.F. & MILLS R.R. (1968) The midgut epithelium of the American cockroach: acid phosphomonoesterase activity during the formation of autophagic vacuoles. J. Insect Physiol. 14, 55-62.
- COZZONE P., PASERO L., BEAUPOIL B. & MARCHIS-MOUREN G. (1970) Characterization of porcine pancreatic isoamylases: chemical and physical studies. Biochim. Biophys. Acta 207, 490-504.
- DADD R.H. (1970) Digestion in Insects. In Chemical Zoology (Ed. by Florkin M. and Scheer B.T.) Vol.5, Arthropoda Part A, pp 117-145, Academic Press, New York.
- DADD R.H. (1975) Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. J. Insect Physiol. 21, 1847-1853.
- DAHLMAN D.L. (1971) Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larvae. J. Insect Physiol. 17, 1677-1687.

- DAHLQVIST A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 22, 99-107.
- DAVIS B.J. (1964) Disc electrophoresis - II. Methods and applications to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- DAY M.F. (1949) The distribution of alkaline phosphatase in insects. Aust. J. Sci. Res. 2, 31-41.
- DERR R.F. & RANDALL D.D. (1966) Trehalase of the differential grasshopper, Melanoplus differentialis. J. Insect Physiol. 12, 1105-1114.
- DESNUELLE P. (1971) The lipases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.) 3rd ed., V. 7, pp. 575-616, Academic Press, New York.
- Di CARLO F.J. & REDFERN S. (1974) α -Amylase from Bacillus subtilis. II. Essential groups. Arch. Biochem. Biophys. 15, 343-350.
- DIXON M. (1953a) The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171.
- DIXON M. (1953b) The effect of pH on the affinities of enzymes for substrates and inhibitors. Biochem. J. 55, 161-170.
- DIXON M. & WEBB E.C. (1964). Enzymes, 2nd ed., Longmans, London.
- DOANE W.W. (1967) Quantification of amylases in Drosophila separated by acrylamide gel electrophoresis. J.exp. Zool. 164, 363-378.
- DOANE W.W. (1969) Amylase variants in Drosophila melanogaster: linkage studies and characterization of enzyme extracts. J. exp. Zool. 171, 321-342.

- EGUCHI M. & IWAMOTO A. (1975) Changes in protease, esterase, and phosphatases in the alimentary canal of the silkworm during metamorphosis. *Insect Biochem.* 5, 495-507.
- ELBEIN A.D. (1974) The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 29, 227-256.
- ERLANGER B.F., KOKOWSKY N. & COHEN W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- FAHRNEY, D.E. & GOLD, A.M. (1963) Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin, and trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 997-1000.
- FELSTED R.C., KRAMER K.J., LAW J.H., BERGER E. & KAFATOS F. (1973) Cocoonase. IV. Mechanism of activation of prococoonase from Antheraea polyphemus. *J. biol. Chem.* 248, 3012-3020.
- FERNLEY H.N. (1971) Mammalian alkaline phosphatases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.) 3rd ed., Vol. 4, pp 417-447, Academic Press, New York.
- FINDLAY D., MATHIAS A.P. & ROBIN B.R. (1963) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 5. The charge types at the active centre. *Biochem. J.* 85, 139-144.
- FISCHER E.H. & STEIN E.A. (1960) α -amylases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D., Lardy M. & Myrbäck K) 2nd ed., vol. 4, pp 313-343, Academic Press, New York.
- FREEMAN M.A. (1967) Proteolytic enzymes of the crop fluid from Locusta migratoria L. *Comp. Biochem. Physiol.* 20, 1013-1015.

- FRIEDMAN S. (1960) The purification and properties of trehalase isolated from Phormia regina, Meig. Arch. Biochem. Biophys. 87, 252-258.
- FRIEDMAN S. (1961) Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of Phormia regina Meig. Arch. Biochem. Biophys. 93, 550-554.
- FRIEDMAN S. (1975) Multiple forms of trehalase in Phormia regina. Partial purification, tissue specificities, and some kinetic properties of adult enzymes. Insect Biochem. 5, 151-164.
- FRIEDMAN S. & ALEXANDER S. (1971) Multiple forms of trehalase in Phormia regina. Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 818-823.
- FROST A.A. & PEARSON R.G. (1961) Kinetics and mechanism. John Wiley, New York.
- GIEBEL P.E. & DOMNAS A.J. (1976) Soluble trehalases from larvae of the mosquito, Culex pipiens, and the fungal parasite, Lagenidium giganteum. Insect Biochem. 6, 303-311.
- GIEBEL W., ZWILLING R. & PFLEIDERER G. (1971) The evolution of endopeptidases - XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (Apis mellifica L.) Comp. Biochem. Physiol. 38B, 197-210.
- GILBERT L.I., CHINO H. & DOMROESE K.A. (1965) Lipolytic activity of insect tissues and its significance in lipid transport. J. Insect Physiol. 11, 1057-1070.
- GILBY A.R., WYATT S.S. & WYATT G.R. (1967) Trehalases from the cockroach, Blaberus discoidalis: activation, solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. Acta Biochim. polon. 14, 83-100.

- GILMOUR D. (1961) The Biochemistry of Insects. Academic Press, New York.
- GOODING R.H. & HUANG C.T. (1969) Trypsin and chymotrypsin from the beetle Pterostichus melanarius. J. Insect Physiol. 15, 325-339.
- GOODING R.H. & ROLSETH B.M. (1976) Digestive processes of haematophagous insects. XI. Partial purification and some properties of six proteolytic enzymes from the tsetse fly Glossina morsitans morsitans Westwood (Diptera: Glossinidae). Can. J. Zool. 54, 1950-1959.
- GRANGER M., ABADIE B., MAZZEI Y. & MARCHIS-MOUREN G. (1975) Enzymatic activity of TNB blocked porcine pancreatic amylase. FEBS lett 50, 276-278.
- GREENWOOD C.T. & MILNE N.A. (1968) Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. Carbohydrate Chem. 23, 281-366.
- GUILLOUX E., COURTOIS J.E. & PERCHERON F. (1968) Étude d'une tréhalase purifiée extraite du hanneton (Melolontha vulgaris). Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1915-1931.
- GUILLOUX E.B., DEFAYE J., DRIGUEZ H. & ROBIC D. (1975) Synthèse, conformation et affinité tréhalasique des α -D-glucopyranosyl- α -D-xylopyranoside, α -D-glucopyranosyl- α -D-mannopyranoside et α -D-allopyranosyl- α -D-glucopyranoside. Carbohydr. Res. 45, 217-236.
- GUSSIN A.E.S. & WYATT G.R. (1965) Membrane-bound trehalase from cecropia silkworm muscle. Arch. Biochem. Biophys. 112, 626-634.
- HARNED H.S. & FALLON L.D. (1939) The properties of electrolytes in mixtures of water and organic solvents. III. Ionization constant of acetic acid in an 82% dioxane-water mixture. J. Am. Chem. Soc. 61, 2377-2379.

- HARNED H.S. & OWEN B.B. (1958) The physical chemistry of electrolyte solutions. 3rd ed., Reinhold, New York.
- HEDRICK J.L. & SMITH A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.
- HENRIKSON P.A. & CLEVER V. (1972) Protease activity and cell death during metamorphosis in the salivary gland of Chironomus tentans. J. Insect Physiol. 18, 1981-2004.
- HILL E.P. & SUSSMAN A.S. (1963) Purification and properties of trehalases from Neurospora. Arch. Biochem. Biophys. 102, 389-396.
- HIPPS P.P. & NELSON D.R. (1974) Esterases from the midgut and gastric caecum of the American cockroach, Periplaneta americana (L.). Isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta 341, 421-436.
- HOFFMAN W.S. (1937) A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. J. biol. Chem. 120, 51-55.
- HOLLANDER V.P. (1971) Acid phosphatases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.) 3rd ed., vol. 4, pp 449-498, Academic Press, New York.
- HOLMES R.S. & MASTERS C.J. (1967) The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. Biochim. Biophys. Acta 132, 379-394.
- HOPSU V.K., MÄKINEN K.K. & GLENNER, G.G. (1966) Purification of a Mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: aminopeptidase B. Arch. Biochem. Biophys. 114, 557-566.
- HORI K. (1970) Some properties of amylase in the salivary gland of Lygus disponsi (Hemiptera). J. Insect Physiol. 16, 373-386.

- HORI K. (1972) Comparative study of a property a salivary amylase among various Heteropterous insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 42B, 501-508.
- HORIE Y. (1955) Alkaline phosphatase in the gut of silkworm larva. *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 20, 68-74.
- HORIE Y. (1959) Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm, Bombyx mori. II. Carbohydases in the digestive fluid and in the midgut tissue. *Bull. seric. Exp. Sta. Japan* 15, 365-382.
- HOUSE H.L. (1974) Digestion. In The physiology of Insecta (Ed. by Rockstein M.) 2nd ed., V.5, pp 63-117, Academic Press, New York.
- HUBER R.E. (1975) The purification and study of a honey bee abdominal sucrase exhibiting unusual solubility and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 198-209.
- HUBER R.E. & LEFEBVRE Y.A. (1971) The purification and some properties of soluble trehalase and sucrase from Drosophila melanogaster. *Can. J. Biochem.* 49, 1155-1164.
- HUBER R.E. & MATHISON R.D. (1976) Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (Apis mellifera). *Can. J. Biochem.* 54, 153-164.
- HUBER R.E. & THOMPSON D.J. (1973) Studies on a honey bee sucrase exhibiting unusual kinetics and transglucolytic activity. *Biochemistry* 12, 4011-4020.
- IMMS A.D. (1957) A general textbook of entomology (Revised to por Richards O.W. & Davis R.G.), 9th ed., Methuen & Co Ltd. London.
- IMOTO T., JOHNSON L.N., NORTH A.C.T., PHILLIPS D.C. & RUPLEY J.A. (1972) Vertebrate lysozymes. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.) 3rd ed., V.7, pp 665-868, Academic Press, New York.

- KALF G.F. & RIEDER S.V. (1958) The purification and properties of trehalase. *J. biol. Chem.* 230, 691-698.
- KAUFFMAN D.L., ZAGER N.I., COHEN E. & KELLER P.J. (1970) The isoenzymes of human parotid amylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 325-339.
- KAPLAN H. & LAIDLER K.J. (1967) Kinetics of α -chymotrypsin action. I. pH, solvent, and temperature effects. *Can J. Chem.* 45, 547-557.
- KHAN M.R. & FORD J.B. (1967) The distribution and localization of digestive enzymes in the alimentary canal and salivary glands of the cotton stainer Dysdercus fasciatus. *J. Insect Physiol.* 13, 1619-1628.
- KIKKAWA H. (1964) An electrophoretic study on amylase in Drosophila melanogaster. *Jap. J. Genet.* 39, 401-411.
- KNECHT M., HAGENMAIER H.E. & ZEBE E. (1974) The proteases in the gut of the locust, Locusta migratoria. *J. Insect Physiol.* 20, 461-470.
- KRISCH K. (1971) Carboxylic ester hydrolases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.), 3rd ed., V.5, pp 43-63, Academic Press, New York.
- KUNG J.T., HANRAHAN V.M. & CALDWELL M.L. (1953). A comparison of the action of several alpha amylases upon a linear fraction from corn starch. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5548-5554.
- LABAT J., BAUMANN F. & COURTOIS J.E. (1974) La tréhalase rénale du porc et de l'homme: purification et quelques propriétés. *Biochimie* 56, 805-813.
- LARA F.J.S., TAMAKI H. & PAVAN C. (1965) Laboratory culture of R. angelae. *Am. Nat.* 99, 189-191.
- LARNER J. & GILLESPIE R.E. (1956) Gastrointestinal digestion of starch. II. Properties of the intestinal carbohydrases. *J. biol. Chem.* 223, 709-726.

- LASKER R. & GIESE A.C. (1956) Cellulose digestion by the silverfish Ctenolepisma lineata. J. exp. Biol. 33, 542-553.
- LEGLER G. (1975) The mechanism of action of glycosidases. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 87, 403-409.
- LEGLER G. & GILLES H. (1970) Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus glucosids paltender Enzyme, VI: Zur Kenntnis der Katalytisch wirkenden Gruppen einer β -Glucosidase aus Aspergillus wentii. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 741-748.
- LEVITZKI A. & STEER M.L. (1974) The allosteric activation of mammalian α -amylase by chloride. Eur. J. Biochem. 41, 171-180.
- LOCKSHIN R.A. & WILLIAMS C.M. (1965) Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. J. Insect Physiol. 11, 831-844.
- MAHADEVAN S. & TAPPEL A.L. (1968) Hydrolysis of higher fatty acid esters of p-nitrophenol by rat liver and kidney lysosomes. Arch. Biochem. Biophys. 126, 945-953.
- MANDELS M., ANDREOTTI T. & ROCHE C. (1976) Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. & Bioeng. Symp. n96, 21-33.
- MARCHIS-MOUREN G. & PASERO L. (1967) Isolation of two amylases in porcine pancreas. Biochim. Biophys. Acta 140, 366-368.
- MARKOVITZ A., KLEIN H.P. & FISCHER E.H. (1956) Purification, crystallization, and properties of the α -amylase of Pseudomonas saccharophila. Biochim. biophys. Acta 19, 267-273.

- MARQUES M.D. (1976) Aspectos anatômicos e histológicos dos estágios imaturos de Rhynchosciara americana (Wiedemann, 1821) (Diptera, Sciaridae), Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- MARSHALL J.J. (1975) α -Amylase inhibitors from plants. ACS Symposium Series Nº 15,, pp 244-266.
- MARZLUF G.A. (1969) Studies of trehalase and sucrase of Drosophila melanogaster. Arch. Biochem. Biophys. 134, 8-18.
- McCREADY R.M. & HASSID W.Z. (1943) The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. J. Am. Chem. Soc. 65, 1154-1157.
- McGEACHIN R.L., WILLIS T.G., ROULTON E.F. & LANG C.A. (1972) Variations in alpha-amylase during the life span of the mosquito. Comp. Biochem. Physiol. 43B, 185-191.
- MILLER J.W., KRAMER K.J. & LAW J.H. (1974) isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, Manduca sexta, Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). Comp. Biochem. Physiol. 48B, 117-129.
- MOLDENKE A.F. (1976) Larval gut phosphatases of Pieris rapae: isolation and partial characterization. Insect Biochem. 6, 187-191.
- MOORE C.A. & FRAZIER J.L. (1976) Partial characterization of acid phosphatases of the boll weevil Anthonomus grandis. Insect Biochem. 6, 525-527.
- MORGAN M.R.J. (1975a) Initial characterization of the gut cellobiase of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides. Insect Biochem. 5, 251-264.
- MORGAN M.R.J. (1975b) Initial characterization of the gut lactase of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides. Insect Biochem. 5, 479-487.

- MORGAN M.R.J. (1975c) Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl β -glucosidase, and aryl β -galactosidase activities of Locusta migratoria. Insect Biochem. 5, 609-617.
- MORGAN M.R.J. (1976) Gut carbohydrases in locusts and grasshoppers. Acrida 5, 45-58.
- MUUS J., BROCKETT F.P. & CONNELLY C.C. (1956) The effect of various ions on the stability of crystalline salivary amylase in solution. Arch. Biochem. Biophys. 65, 268-277.
- MUUS J. & VNENCHAK J.M. (1964) Isozymes of salivary amylase. Nature, Lond 204, 283-285.
- NEGRELLI A.M. (1973) Análise eletroforética das esterases durante o desenvolvimento de Rhynchosciara angelae. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- NOELTING G. & BERNFELD P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: Dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. Helv. Chim. Acta 31, 286-290.
- NONATO E. & PAVAN C. (1951) A new species of "Rhynchosciara" Rübsaamen, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). Rev. bras. Biol. 11, 435-437.
- NOPANITAYA W. & MISCH D.W. (1974) Developmental cytology of the midgut in the flesh-fly, Sarcophaga bullata (Parker). Tissue & Cell 6, 487-502.
- O'DONNELL M.D. & McGEENEY K.F. (1975) α -amylase and glucoamylase activities of canine serum. Comp. Biochem. Physiol. 50B, 269-274.
- PANEK A. & SOUZA N.O. (1964) Purification and properties of Baker's yeast trehalase. J. biol. Chem. 239, 1671-1673.

- PARK K.H., DUDEN R. & FRICKER A. (1975) A modified hydroxamic acid method for estimation of the activity of lipase. *Z. Lebensmittel-Untersuch Forsch.* 157, 327-331.
- PODOLER H. & APPLEBAUM S.W. (1971) The α -amylase of the beetle Callosobruchus chinensis: Purification and properties. *Biochem. J.* 121, 317-320.
- PRIDEAUX E.B.R. & WARD T. (1924) Calculations on the neutralization of mixtures of acids, and a universal buffer mixture. *J. Chem. Soc.* 125, 426-429.
- REAY, R.C. (1969) Insect and insecticides. Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh.
- REED W.D. & SACKTOR B. (1971) Localization of trehalase in flight muscle of the blowfly Phormia regina. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 392-401.
- RETIEF L.W. & HEWITT P.H. (1973) Purification and properties of trehalase from the harvester termite, Trinervitermes trinervoides. *Insect Biochem.* 3, 345-351.
- ROBERTS R.M. & TOVEY K.C. (1969) Trehalase activity in Selaginella martensii. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 408-412.
- ROBYT J.F., ACKERMAN R.J. & KENG J.G. (1972) Reducing value methods for maltodextrins. II. Automated methods and chain length independence of alkaline ferricyanide. *Analyt. Biochem.* 45, 517-524.
- ROBYT J.F. & FRENCH D. (1967) Multiple attack Hypothesis of α -amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and Aspergillus oryzae α -amylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 8-16.
- ROBYT J.F. & WHELAN W.J. (1972) Reducing value methods for malto dextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Analyt. Biochem.* 45, 510-516.

- ROSEN H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem. Biophys. 67, 10-15.
- SAITO S. (1960) Trehalase of silkworm, Bombyx mori: purification and properties of the enzyme. J. Biochem. (Tokyo) 48, 101-109.
- SALZBERG H.W., MORROW J.I., COHEN S.R. & GREEN M.E. (1969) Physical Chemistry: a modern laboratory course. Academic Press, New York.
- SASAJIMA K., KAWACHI T., SATO S. & SUGIMURA T. (1975) Purification & properties of α, α -trehalase from the mucosa of rat small intestine. Biochim. Biophys. Acta 403, 139-146.
- SEGEL I.H. (1975) Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, New York.
- SEMENZA G. & Von BALTHAZAR A.K. (1974) Steady-state kinetics of rabbit-intestinal sucrase. Kinetic mechanism, Na^+ activation, inhibition by Tris(hydroxymethyl)aminomethane at the glucose subsite. Eur. J. Biochem. 41, 149-
- SHINODA O. (1930) Contributions to the knowledge of intestinal secretion in insect - IV - A comparison of the pH optima of the digestive enzymes from different groups of insects. A preliminary note. Kyoto Imp. Univ. Anniv. Vol. Dedicated to Masumi Chikashige, 9-24.
- SLÁMA K. (1971) Insect juvenile hormone analogues. Ann. Rev. Biochem. 40, 1079-1102.
- STEER M.L., TAL N. & LEVITZKI A. (1974) The role of sulphydryl groups in the action and structure of mammalian α -amylase. Biochim. Biophys. Acta 334, 389-397.
- STIEFEL D.J. & KELLER P.S. (1973) Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase. Biochim. Biophys. Acta 302, 345-361.

- TALBOT B.G., MUIR J.G. & HUBER R.E. (1975) Properties of a free and a solubilized form of bound α,α -trehalase purified from honey bee thorax. *Can. J. Biochem.* 53, 1106-1117.
- TALBOT B.G. & HUBER R.E. (1975) Partial purification, stabilization, and characterization of adult honey bee midgut trehalase and a new trehalase specific disc gel stain method. *Insect Biochem.* 5, 337-347.
- TERRA W.R., De BIANCHI, A.G., GAMBARINI A.G. & LARA F.J.S. (1973) Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly, Rhynchosciara americana. *J. Insect Physiol.* 19, 2097-2106.
- TERRA W.R., De BIANCHI A.G., & LARA F.J.S. (1974) Physical properties and chemical composition of the hemolymph of Rhynchosciara americana (Diptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 47B, 117-129.
- TERRA W.R., De BIANCHI A.G., PAES DE MELLO M. & BASILE, R. (1976) Some metabolic disorders affecting the carotenoid-linked haemolymph proteins in Rhynchosciara americana (Diptera, Sciaridae). *Experientia* 32, 432-434.
- TERRA W.R., FERREIRA C. & De BIANCHI A.G. (1975) Distribution of nutrient reserves during spinning in tissues of the larva of the fly, Rhynchosciara americana. *J. Insect Physiol.* 21, 1501-1509.
- THOMA J.A., SPRADLIN J.E. & DYGERT S. (1971) Plant and animal amylases. In The Enzymes (Ed. by Boyer P.D.) 3rd ed., Vol. 5, pp 115-189, Academic Press, New York.
- VALLEE B.L., STEIN E.A., SUMERWELL W.N. & FISCHER E.H. (1959) Metal content of α -amylases of various origins. *J. biol. Chem.* 234, 2901-2905.
- Van DYK J.W. & CALDWELL M.L. (1956) A study of the kinetics of the hydrolysis of waxy maize starch by crystalli

ne pancreatic amylase from swine. J. Am. Chem. Soc. 78, 3345-3350.

Van DYK J.W., KUNG J.T. & CALDWELL M.L. (1956) Influence of the extent of hydrolysis upon the determination of the initial velocity of α -amylase action. J. Am. Chem. Soc. 78, 3343-3344.

VEERABHADRAPPA P.S., MARCUS S.R. & SHADAKSHARASWAMY M. (1976) Identification of the soluble esterases in the beetle Haltica caerulea Olivier. Indian J. Exp. Biol. 14, 553-556.

WAKIM J., ROBINSON M. & THOMA J.A. (1969) The active site of porcine pancreatic alpha amylase: factors contributing to catalysis. Carbohydrate Res. 10, 487-503.

WALLENFELS K. & FISHER J. (1960) Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme, X. Die Lactase des Kälberdarms. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 321, 223-245.

WARD C.W. (1975a) Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Aust. J. Biol. Sci. 28, 1-23.

WARD C.W. (1975b) Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of the enzymes of intermediate electrophoretic mobility. Biochim. Biophys. Acta 410, 361-369.

WARD C.W. (1975c) Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of enzymes of highest electrophoretic mobility. Aust. J. Biol. Sci. 28, 447-455.

WARD C.W. (1975d) Properties and specificity of the major metal-chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Biochem. Biophys. Acta 384, 215-227.

- WARD C.W. (1975e) Properties and specificity of a second metal chelator-sensitive proteinase in the keratolytic larvae of the webbing clothes moth. *Aust.J.Biol. Sci.* 28, 439-445.
- WEBB J.L. (1966) Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol.3 Academic Press, New York.
- WEBSTER M.E. & PRADO E.S. (1970) Glandular kallikreins from horse and human urine and from pancreas. *Meth.Enzymol.* 19, 681-699.
- WHARTON D.R.A., WHARTON M.L. & LOLA J.E. (1965) Cellulase in the cockroach, with special reference to Periplaneta americana (L.). *J. Insect Physiol.* 11, 947-959.
- WIGGLESWORTH V.B. (1927) Digestion in the cockroach. II. The digestion of carbohydrates. *Biochem. J.* 21, 797-811.
- WIGGLESWORTH V.B. (1972) The principles of insect physiology. 7th ed., Methuen & Co Ltd, London.
- WOOD T.M. (1975) Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* N° 5, 111-137.
- WYATT, G.R. (1967) The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4, 287-360.
- YANAGAWA H.A. (1971) Purification and properties of trehalases from larval muscle and midgut of the silkworm, Bombyx mori. *Insect Biochem.* 1, 102-112.
- YONETANI T. & THEORELL H. (1964) Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes. III. Multiple inhibition kinetics in the presence of two competitive inhibitors. *Arch.Biochem.Biophys.* 106, 243-251.
- ZHYZHIKOV D.P. (1964) Function of the peritrophic membrane in Musca domestica L. and Calliphora erythrocephala Meig. *J. Insect Physiol.* 10, 273-278.