

NEUZA . MARIA FERRAZ DE MELLO

Determinação de açúcares livres na hemolínfa  
do Triatominae - Panstrongylus meqistus.

Curitiba

1976

NEUZA MARIA FERRAZ DE MELLO

Determinação de açúcares livres na hemolínfa  
do Triatominae- Panstrongylus megistus .

Tese apresentada ao Departamento  
de Zoologia do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Fede  
ral do Paraná, para obtenção do  
grau de Mestre em Entomologia.

Curitiba

1976

Trabalho orientado por  
Dr. Luiz Alberto Veiga

À minha mãe, dedico esta tese

## ÍNDICE

Introdução .....	1
Materiais e Métodos .....	7
Resultados .....	11
Discussão .....	27
Sumário .....	30
Referências Bibliográficas .....	31
Agradecimentos .....	41

## I N T R O D U Ç Ã O

- 1 -

Carboidratos em insetos . Insetos fazem uso, no que concerne ao Metabolismo de Carboidratos, dos mesmos substratos, enzimas e princípios operacionais conhecidos em outros grupos de organismos vivos. Entretanto se levarmos em consideração os mecanismos de interação e regulação metabólicos (15), eles proporcionam um sistema distinto, que somente agora começa a ser equacionado e que difere, em princípio, das vias conhecidas que ocorrem normalmente em mamíferos e outros vertebrados.

Como nosso conhecimento do metabolismo de carboidratos em outros grupos de invertebrados está longe de ser completo, é muito difícil julgar até quanto ele é singular em insetos.

Um dos pontos muito particulares é sem sombra de dúvida o da ocorrência da Trealose como o açúcar predominante no sangue de algumas espécies deste tipo de organismos.

Outra característica dos insetos e artrópodos em geral é a presença da quitina como componente da estrutura do exo-esqueleto (24,30), a qual está relacionada intimamente com o metabolismo dos carboidratos.

Os mucopolissacarídeos presentes na hemolínfa e nos tecidos somente agora começaram a ser investigados, mas nada ainda de muito concreto ficou estabelecido a respeito.

Afortunadamente para os entomologistas, o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas torna possível a realização de experiências usando pequeníssimas quantidades de tecidos. Isto é muito importante pois proporciona meios de in

## Introdução.

investigar órgãos isolados, não havendo mais necessidade de se trabalhar com homogenizados totais de insetos, como era feito até bem pouco tempo atrás. Isto tudo tem levado a descobertas bioquímicas muito originais. A entomologia é hoje um campo aberto para investigações metabólicas, principalmente a influência e ação de hormônios sobre o metabolismo geral. Há vários laboratórios de bioquímica que atualmente trabalham ou estão planejando trabalhar com insetos (Veiga, L.A., et al -56-)

Ocorrência de glucose e substância redutoras - Como em outros animais, nos insetos a glucose ocupa posição central no metabolismo de carboidratos (9,62). Porém, na maior parte, a quantidade de glucose livre é muito baixa. É conhecido que um grande número de componentes da hemolínfa que reagem positivamente aos testes tradicionais para verificação de açúcares no sangue (açúcares redutores), não são propriamente açúcares, mas alguns amino-ácidos, como tirosina e prolina, os quais ocorrem em altos níveis neste tipo de organismos. Assim, os carboidratos são hoje avaliados através de métodos mais específicos, como o da reação da antrona, o da glucose oxidase acoplado com trealase; vários tipos de cromatografias, etc. (Veiga, L.A. et al -56-)

Trealose - O açúcar mais característico da hemolínfa dos insetos, é a trealose ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosose), um dissacarídeo de glucose que não tem propriedade redutora por serem ambos os átomos do carbono anomérico das unidades de glucose, ligadas entre si por ligações glicosídicas (62).

## Introdução

---

Após o centenário da Trealose ser exibida em Paris, na Exposição Universal de 1855, trazida da Síria (Trehala), este açúcar foi redescoberto em três laboratórios diferentes (Wyatt & Kalf, 1956 (60); Howden & Kilby, 1956 (27) e Evarø & Dethier, 1957 (18)). Foi determinado que a hemolínfa de insetos continha um açúcar desconhecido como sendo a antiga "Trehala" dos sírios. Em certas espécies existia em tal quantidade que poderia ser extraído da hemolínfa em estado cristalino. Howden & Kilby (27) demonstraram a presença de  $\alpha$ ,  $\beta$  trealose no sangue de locusta (Schistocerca gregaria). Desde então tem sido verificado na maioria dos insetos cuidadosamente examinados. Não foi ainda encontrado em plantas florescentes (superiores) e vertebrados, apesar de já ter sido em leveduras, fungos, helmintos e algas (64).

Açúcares encontrados na hemolínfa - O açúcar mais característico da hemolínfa de insetos é, sem dúvida, a trealose, mas já foi verificada a existência de outros açúcares, além de trealose e mínimas quantidades de glucose. Sua ocorrência parece ser produzida pela dieta especializada a qual o inseto foi submetido (15). A frutose encontrada em larvas de Gastrophilus intestinalis, que parasitam intestino de cavalos, (37) pode ser atribuída a dieta rica em "levano", um polissacarídeo de unidades de frutose, ingerido pelos animais que se encontram estabulados. As pequenas quantidades de frutose e sacarose encontradas no bicho da seda e afídeo Mecoura viciae (17) provavelmente derivam dos sucos das plantas com as quais se alimentam. Este fato foi comprovado experimentalmente. Hansen, 1964 (26) quando verificou a presença de frutose na hemolínfa de

## Introdução

---

insetos provou também que os gafanhotos examinados tinham frutose na hemolínfa, quando eram alimentados com peras (fruto rico em frutose), mas não com trigo ou repolho de Bruxelas, que não contém aquele açúcar.

A hemolínfa da abelha, contém tanto trealose como glucose e frutose, sendo os três açúcares em quantidades da ordem de 1% (21,40).

Experiência interessante foi realizada por Gray & Fraenkel, 1954 (25) para mostrar a influência da dieta no aparecimento de outros açúcares na hemolínfa. Eles alimentaram colônias de abelhas com açúcares puros e verificaram que as abelhas alimentadas 24 horas com frutose apresentavam quase que somente este açúcar no sangue; as alimentadas com glucose, maltose ou trealose apresentavam somente glucose e as alimentadas com galactose apresentavam somente galactose no sangue. Nestas experiências foram dosados unicamente os açúcares redutores, excluindo portanto a trealose.

Absorção intestinal de açúcares - Vaney & Maignon, 1906 (55) realizaram experimentos com bicho da seda e concluíram que "os açúcares eram destruídos no decorrer da digestão, ao nível do epitélio intestinal, ou imediatamente ao seu aparecimento no sangue". Entretanto, a respeito do mecanismo de absorção, nada ficou estabelecido até 1957-1958, quando Treherne, (50,51) usou glucose radioativa. Verificou que glucose radioativa injetada no intestino era difundida através da parede intestinal, não se acumulando na hemolínfa, mas sim se convertendo em trealose, que entretanto não era encon

## Introdução

---

trada no intestino. Verificou também que manose e frutose eram absorvidas com menor intensidade e convertidas também em trealose. Quando era injetada glucose radioativa diretamente na hemolínfa, aquele açúcar era convertido em trealose com a mesma velocidade da glucose intestinal. Isto mostrou que a síntese de trealose poderia independe da absorção pela parede intestinal e que poderia ocorrer na própria hemolínfa.

Shyamala & Bhat, 1965 (45) em seus experimentos usando intestinos de bicho da seda em perfusão, mostraram que a glucose radioativa passava através das paredes em ambas as direções indicando um fenômeno de difusão, o que não acontece com os vertebrados, cuja absorção se faz por transporte ativo.

Mais uma prova de que açúcares atravessam a parede intestinal por difusão e não por transporte ativo é a dos experimentos de Maurizio, 1965 (40) com abelhas. Mostrou que mesmo dissacarídeos e trissacarídeos, que são moléculas maiores, podem ser absorvidos intactos, aparecendo na hemolínfa. Porém, este fenômeno parece estar restrito somente a insetos que se alimentam diretamente de sucos de plantas com alto teor de açúcares, como é o caso das abelhas.

Biossíntese da trealose -É evidente de que a síntese de trealose deve ser um processo de alguma economia em insetos. Assim, a conversão de glucose em trealose in vitro é muito rápida. Treherne, 1958 (52) mostrou a velocidade desta transformação. Quando 0,14mg de  $^{14}\text{C}$  glucose era injetada em Schistocerca gregaria (adulto) ,

## Introdução

---

92% da radioatividade encontrada na hemolínfa após 15 minutos, correspondia a trealose.

Clegg & Evans, 1961 (10), quando injetaram  $^{14}\text{C}$  glucose em Phormia regina, verificaram que a radioatividade encontrada nos açúcares da hemolínfa, depois de cromatografados, era de 50% de trealose, após 2 minutos e de 90% depois de 10 minutos.

Foram escolhidos Triatomíneos para o desenvolvimento da pesquisa realizada, por ser o estudo deste tipo de insetos, vulgarmente conhecidos por "barbeiros", "chupanças", "chupões" ou "fincoês" (1,5), de grande importância no que concerne à Saúde Pública em nosso país. Sendo o "barbeiro" o vetor do Trypanosoma cruzi, causador da doença de Chagas, um dos maiores flagelos da população rural de certas regiões brasileiras, é justificado tudo que se fizer para o esclarecimento tanto do seu metabolismo quanto da composição química dos fluidos biológicos destes insetos. (6,12,23,33,38,39).

O escopo do presente trabalho é analisar a hemolínfa do Panstrongylus meqistus, determinando sua composição em carboidratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Produtos Químicos - Os componentes químicos utilizados durante o desenvolvimento do presente trabalho foram todos produtos puros obtidos de fontes comerciais da mais alta confiança.

D-ribose, D-glucose, D-glucosamina, D-frutose,  $\alpha$ -D-Treose, D-galactose, D-manose, i-Inositol, Sorbitol, Turanose, Lactose, Maltose, Sacarose, Melibiose e Rafinose foram adquiridos da Calbiochem; Prolina e Tirosina da Sigma Chemical Company ( St., Louis, Mo., U.S.A.)

As experiências com compostos radioativos foram executadas usando D-glucose-U- $^{14}$ C, atividade específica .... 55mC/mM; D-frutose-U- $^{14}$ C, atividade específica 198mC/mM e D-manose-U- $^{14}$ C, atividade específica 3,05mC/mM. Todos adquiridos da Calbiochem (Cal. Atomic). California, U.S.A.

Trease purificada de Panstrongylus megistus foi gentilmente cedida pela Sr<sup>a</sup> Ema Chandelier.

Métodos Analíticos - Cromatografia descendente em papel foi realizada em papel whatmann números 1 e 4 e cromatografia preparativa em Whatmann 3MM. Os cromatogramas foram realizados em dois tipos distintos de solventes (v/v): I - benzol+n-butanol+ piridina+água (1:5:3:3), (fase superior) e II - n-butanol:piridina : água (6:4:3) (B). Os valores de RG referem-se ao movimento do composto, com relação a migração da glucose.

A visualização dos açúcares, foi realizada com nitrato de prata alcalino (Trevelyan-54-) e p-anidina - HCl

## Materiais e Métodos

---

(Hougt-29-). Amino-ácidos foram visualizados com ninidrina (Jepson & Stevens-31- e Dent-13-).

Eletroforese em papel foi realizada em papel Whatmann nº 1, usando tampão Borato 0,05 M, pH 9,2; tampão Acetato de Piridina 0,07 M, pH 6; Molibdato de Sódio a 2%, pH 5; a 24 volts por centímetro, durante 90 minutos. As substâncias eletroforeto grafadas foram visualizadas no papel pelos métodos de Trevelyan (54) no caso de carboidratos e por ninidrina (31) quando o composto era amino-ácido.

D-glucose foi também determinada pela técnica da glucose oxidase-peroxidase (28) adquirida da Sigma Chemical Company.

Substâncias radioativas foram localizadas no papel pela passagem através de um detector a gás Q, Nuclear Chicago, modelo D-47 acoplado a um contador analítico, modelo 1620B, com registrador, todos da Nuclear Chicago Corporation.

### Correção após a defesa de Tese

<u>Página</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia-se</u>
8	24	durante 1 hora	durante 1 hora, a não ser quando indicado no texto.

cuo e os açúcares extraídos com piridina anidra; II- com ácido sulfúrico 1N a 100°C, durante 1 hora, sendo o excesso de ácido precipitado com hidróxido de bário.

## Materiais e Métodos

---

A hemolínfa, antes de ser ensaiada, foi desionizada pela passagem em coluna de resina mista de troca iônica, Amberlite MB-3.

As centrifugações foram realizadas em centrífuga Servall, modelo M., a 6.000 r.p.m.

As hidrólises enzimáticas foram realizadas usando extrato purificado de hepatopancreas de Megalobulimus paranaquensis, gentilmente cedido pelo Prof. J.D. Fontana, do Departamento de Bioquímica desta Universidade.

As operações de liofilização foram realizadas em aparelho Virtis, modelo 10-145-MR-Ba,

Leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Coleman, modelo 6-a.

Os eluatos das colunas foram concentrados em "Flash-E vaporator", da Laboratory Glass Instruments Corporation.

Insetos - Para a realização deste trabalho foram utilizados ninhas de 5º estágio e insetos adultos de Panstrongylus megistus. Os insetos foram criados em cubas de plásticos de 12 cm de base por 25 cm de altura, fechados com tela de nylon para facilitar a alimentação. As cubas foram deixadas em ambiente escurecido, a temperatura e umidade constantes.

A alimentação (duas a três vezes por semana) foi realizada em galinhas.

Extração da hemolínfa - A hemolínfa, de coloração amarela clara, foi extraída por seccionamento de um dos espinhos da parte fron

## Materiais e Métodos

---

tal do pronoto do inseto. Sob pressão a hemolínfa aflora pelo orifício e era coletada com auxílio de um tubo capilar.

Foram utilizadas 632 ninfas de 5º estágio, que renderam 25,8 ml de hemolínfa, e 27 insetos adultos de onde foram extraídos 1,3 ml de fluido estudado.

## RESULTADOS

Análise de Açúcares Livres da Hemolínfa. Foi extraída hemo línfa de 230 ninfas de 5<sup>o</sup> es tágio de Panstrongylus meqis tus, com um rendimento médio de 50  $\mu$ l por inseto, dando um volume total de 12ml. Para a realização dos ensaios, as pro teinas foram eliminadas pelo calor e por precipitação com álcool a 66%, etapas sempre se guidas de centrifugação com e liminação de precipitado. Açú cares totais foram determina dos pelo método do Fenol- Áci do Sulfúrico (16) e os açúca res redutores pela técnica de Somogyi e Nelson (47,42). Uti lizando as técnicas citadas a cima foram obtidos valores de 0,54 mg/ml de açúcares totais e 0,05 mg/ml de açúcares redu tores.

Com a finalidade de anali sar cromatograficamente estes

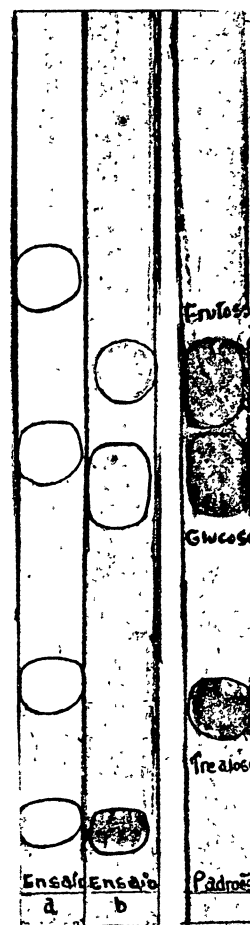


Figura 1 - Cromatografia em papel Whatman nº 1 (descen dente) dos açucares neutros. Solvente: n-butanol-piridina -água (6:4:3). Revelador: Nitrato de prata (b) e ninidrina (c).

## Resultados

---

compostos foram realizadas uma série de experiências :

A) Uma alíquota de 2 ml do sobrenadante da hemolínfa tratada foi desionizada por passagem em coluna de Amberlite MB-3 , forma acetato. O eluato da coluna foi concentrado em atmosfera reduzida, até a secura e o resíduo foi<sup>re</sup>dissolvido em 0,1 ml de água destilada. Esta solução foi cromatografada em papel Whatmann nº 1 por 40 horas, usando n-butanol-piridina-água (6:4:3) como solvente (8). Depois de corrido o cromatograma foi cortado longitudinalmente em duas partes. Uma foi revelada com nitrato de prata alcalino (54) e outra com ninidrina (31), (Figura 1).

Pode ser visto na Figura 1 que com nitrato de~~prata~~ alcalino foi revelado traços de um composto de  $RG=1,12$ , tentativamente identificado como sendo frutose; traços de glucose, que foi identificado posteriormente usando glucose oxidase-peroxidase (28); e positivamente a presença, também, de outro composto com  $RG=0,32$ , que reduzia fortemente a parte do reativo de Trevelyan (54).

A parte do cromatograma que foi revelada com ninidrina, (31) o foi no sentido de se investigar a possível presença de amino-açúcares (provavelmente glicosamina e seus derivados). Inesperadamente porém, surgiram manchas no cromatograma que correspondiam a amino-ácidos.

B) Uma alíquota maior (6 ml) da hemolínfa desionizada foi levada até secura, a vácuo, e dissolvida em 0,2 ml de água destilada. A solução foi colocada em papel Whatmann 3MM para desenvolver uma cromatografia preparativa com a finalidade de uma melhor identificação dos açúcares (32). O Cromatograma foi corrido

## Resultados

---

durante 40 horas em n-butanol-piridina-água (6:4:3) (8). Uma tira foi cortada do cromatograma e revelada com nitrato de prata amoniacal a fim de visualizar os distintos compostos. A parte maior do cromatograma, a não revelada, foi cortada em tiras a fim de eluir do papel os compostos separadamente. A eluição foi feita com água destilada. O composto com  $RG=1$  foi identificado posteriormente pela reação com glucose oxidase-peroxidase (28). O de  $RG=1,12$  por apresentar quantidade insuficiente para a realização de testes químicos, foi definido como sendo frutose.

A solução do composto com  $RG=0,32$  quantitativamente a maior fração, foi igualmente concentrada a vácuo e dissolvida em 0,1 ml de água destilada. Com ela foram realizados os seguintes testes na tentativa de sua identificação:

a) Fenol-Ácido Sulfúrico (16). Por este método foi determinada a concentração em carboidratos totais que equivaleram a 12  $\mu$ moles de glucose, referidos à alíquota de 6 ml de hemolínfa utilizados no início do ensaio.

b) Somoqvi e Nelson (47,42). O resultado deste teste demonstrou que o composto com  $RG=0,32$  não apresentou poder redutor.

c) Tratamento com extrato de hepatopancreas de molusco. Uma alíquota foi incubada com extrato de molusco (Megalobulimus paranaguensis) e tampão acetato de sódio a pH 5,0 durante 18 horas a 37°C. A mistura de reação foi desproteïnizada sendo utilizada uma alíquota para a determinação de glucose pelo método da glucose oxidase-peroxidase (28). O resultado demonstrou que 80% do material

## Resultados

---

que havia dado reação positiva pelo método do Fenol-Ácido Sulfúrico, havia se hidrolisado dando unidades de glucose.

O restante do material foi utilizado para levar a efeito uma cromatografia analítica em papel Whatmann nº 1, usando o mesmo solvente n-butanol-piridina-água (6:4:3), durante 40 horas. Depois de revelado com o reativo de Trevelyan (54), o cromatograma mostrou a presença de glucose, pequenos traços de frutose e outra mancha mais intensa na região de  $R_G=0,32$ . O Resultado deste cromatograma está mostrado na figura 2.

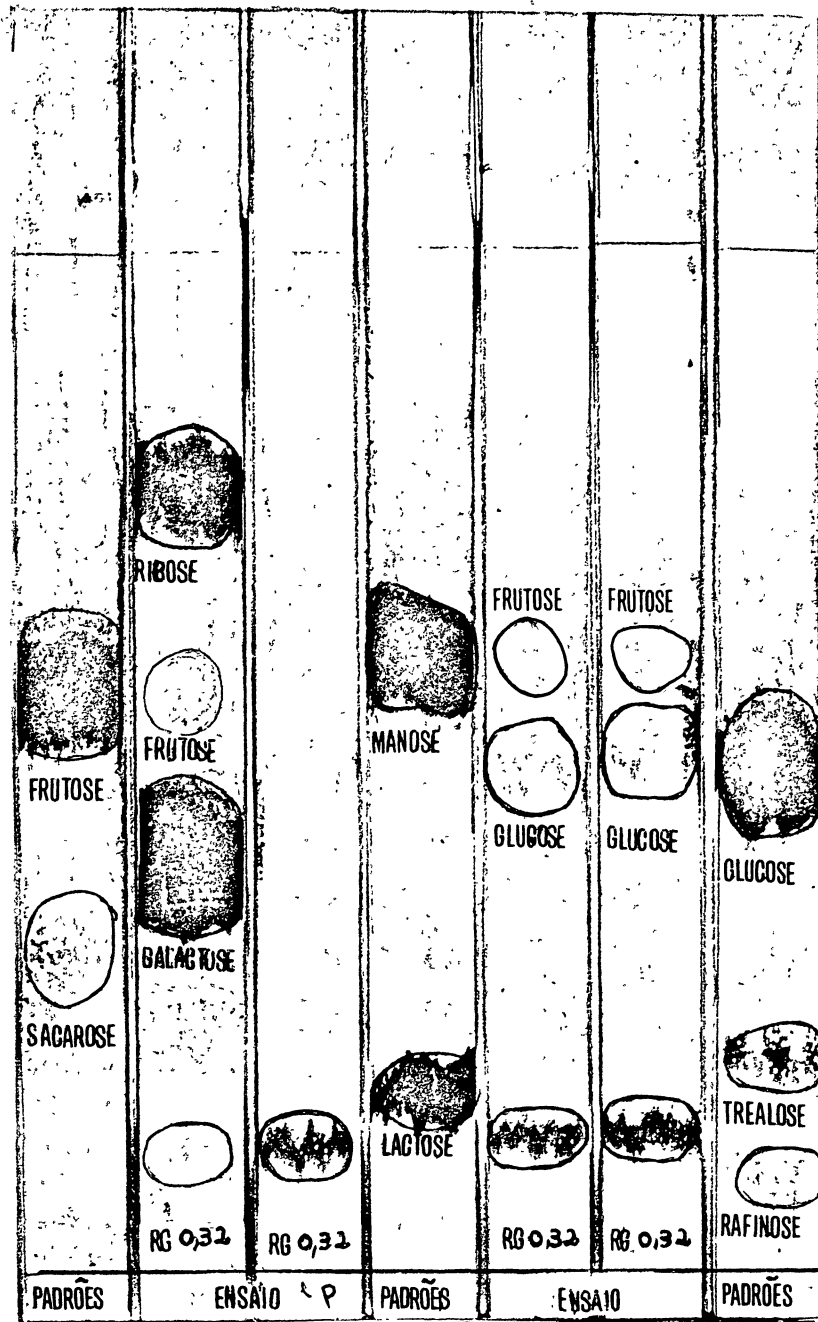


Figura 2 - Cromatografia em papel Whatmann nº 1 (descendente) da hemolinfa de Panstrongylus megalobulimus tratada com extrato purificado de hepato pancreas (Megalobulimus paranaguensis).

Solvente : n-butanol-piridina-água (6:4:3).  
 Revelador: reativo de Trevelyan (54).

## Resultados

---

d) Tratamento com Trealase de Panstrongylus megistus •

Outra alíquota do composto em questão foi tratada com trealase de Panstrongylus megistus durante 18 horas com tampão acetato de sódio, pH 5,0. O material, depois de desproteínizado e desionizado, deu reação negativa pela técnica de glucose oxidase-peroxidase(28) e não demonstrou presença de nenhum composto com RG semelhante ao da glucose por cromatografia em papel Whatmann nº 1

e) Hidrólise ácida - Nova alíquota foi utilizada para ser submetida a hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1N durante 2 horas. Após a hidrólise o material foi neutralizado com hidróxido de bário, centrifugado e o sobrenadante foi evaporado a vácuo, dissolvido em 0,1 ml de água destilada; foi analisado por cromatografia (2). Pode-se observar na figura 3 o resultado desta experiência, que mostra traços de frutose, glucose, de um composto com RG=0,7, que provavelmente é um dissacarídeo, e do composto original de RG=0,32 sem sofrer modificações pela hidrólise.

Resultados

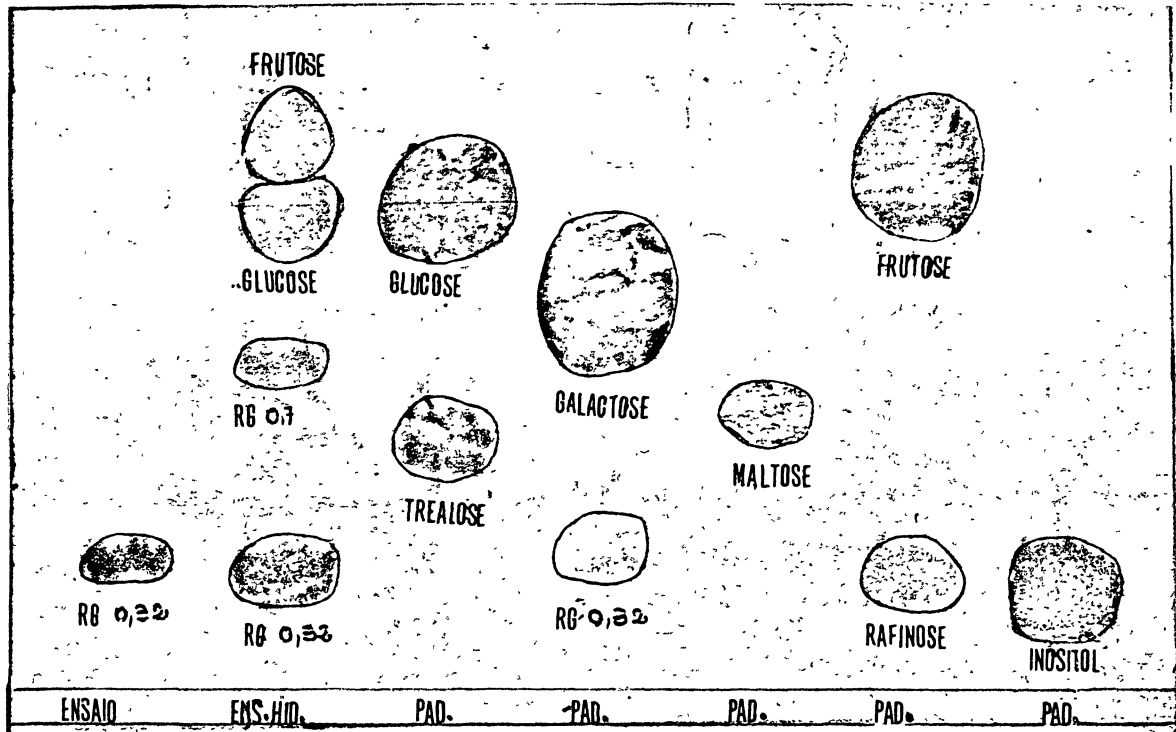


Figura 3 - Cromatografia em papel Whatmann nº 1 (descendente), de hemolínfa de Panstrongylus megalistus (hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1N). Solvente : n-butanol-piridina-agua (6:4:3). Revelador : reativo de Trevelyan (54).

Resultados

f) Outros testes. Foram realizadas outras experiências com a finalidade de ser identificado o composto de  $RG=0,32$ . Ele troforese em papel (11,36,46) utilizando soluções tampões ácidas, neutras, alcalinas; cromatografias em papel usando diferentes sistemas de solventes (3,4) e tipos distintos de papel cromatográfico; hidrólise ácida em vários espaços de tempo, etc., foram os métodos usados na tentativa da identificação do composto. Os resultados obtidos foram infrutíferos, já que não foi possível sua identificação e nem seu desdobramento em outros mais simples.

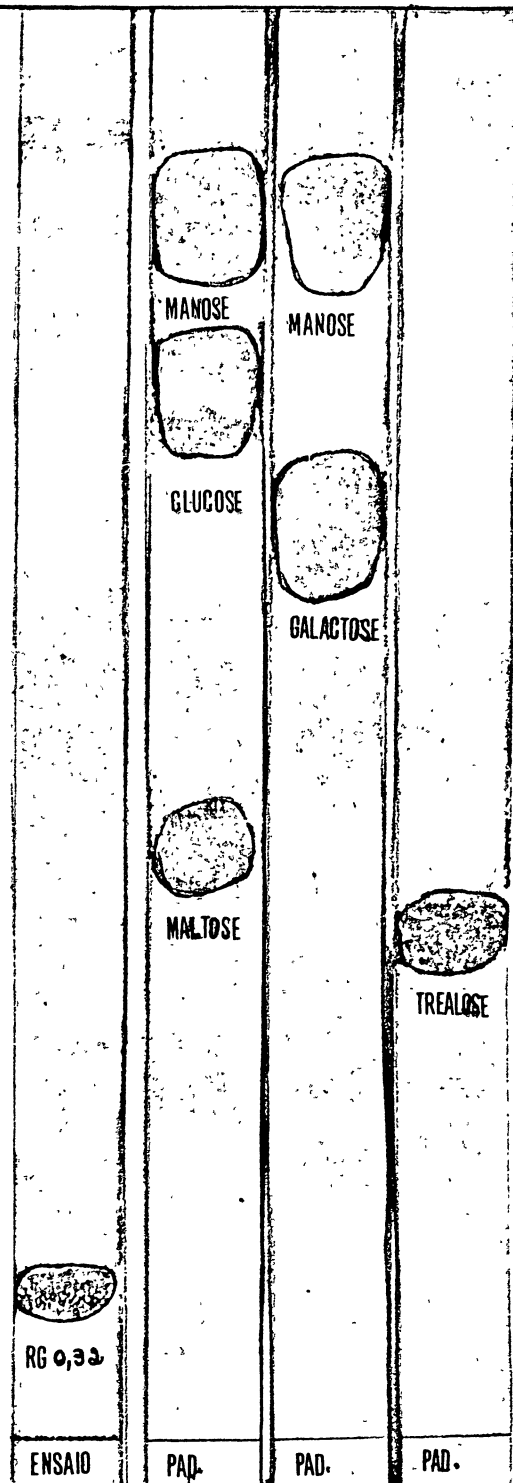


Figura 4 - Cromatografia em papel Whatmann nº 1 (descendente) do composto de  $RG=0,32$  eluído de uma preparativa.  
Solvente :  $\eta$ -butanol-piridina-água (6:4:3).  
Revelador : reativo de Trevelyan (54).

RESULTADOS

Ensaio com glucose-U-<sup>14</sup>C - A fim de se chegar a um mais profundo conhecimento das transformações metabólicas ocorridas em Panstrongylus megistus, procurou-se um caminho diferente utilizando açúcares marcados com <sup>14</sup>C.

Foram injetados na zona dorsal de ninfas de 5º estágio e do inseto adulto, 5-20 µl de glucose-U-<sup>14</sup>C. Após 15 e 30 minutos, respectivamente, a hemolínfa foi extraída e coletada em álcool a 66%, contendo 2 µmoles de trealose como "carrier", conforme está descrito em Material e Métodos. A análise radioativa permanecia solúvel, após precipitação com álcool.

Tabela I Resultados da administração de glucose-U-<sup>14</sup>C em insetos adultos e ninfas de 5º estágio de Panstrongylus megistus. Conjunto das experiências realizadas.

Experiência	Nº de insetos.	Quantidade de glucose-U- <sup>14</sup> C injetada	Tempo minuto	Volume de hemolínfa extraída	c.p.m. recuperados.
1	1 ninfa	5µl (2.10 <sup>6</sup> c.p.m)	15	40	400.000
2	1 adulto	5µl (2.10 <sup>6</sup> c.p.m)	30	40	400.000
3	2 ninfas	10µl (4.10 <sup>6</sup> c.p.m)	10	120	400.000
4	1 ninfa	10µl (4.10 <sup>6</sup> c.p.m)	10	20	1.100.000
5	1 ninfa	10µl (4.10 <sup>6</sup> c.p.m)	20	65	830.000

## Resultados

A hemolínfa assim desproteïnizada foi desionizada pela passagem através de uma coluna de Amberlite MB-3. O eluato foi concentrado à vácuo até 0,05 ml e este volume foi aplicado em papel Whatmann nº 1 e cromatografado por 40 horas usando o solvente tipo II (8).

Observou-se pela análise cromatográfica da hemolínfa da ninfa de 5º estágio, a presença de dois compostos, um de  $RG = 0,47$  (aproximadamente 40% da radioatividade) e outro com  $RG=0,7$  (aproximadamente 50% da radioatividade total).

Como se pode observar na figura 5, o composto de  $RG = 0,47$  apresentou o mesmo índice migratório da trealose usada como "standard" e o composto de  $RG=0,47$  migrou como sacarose.

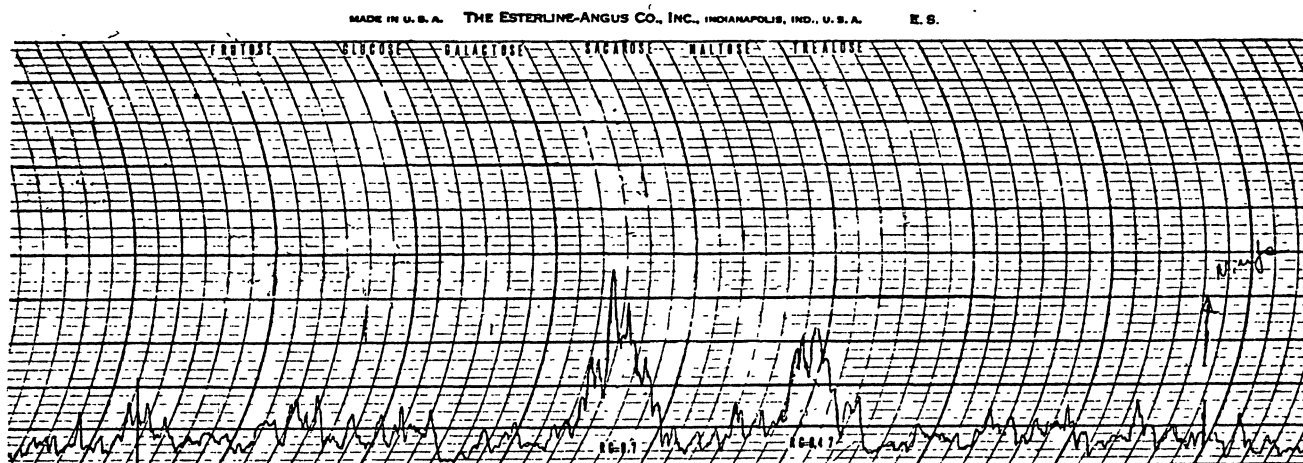


Figura 5 - Radiocromatograma da hemolínfa de ninfa de 5º estágio de Panstrongylus megistus, injetado com glucose- $U-^{14}C$ . (Exp. 1. Tabela I). Foram utilizados glucose, frutose, sacarose, trealose, maltose como padrões, os quais foram revelados com nitrato de prata alcalino (54).

## Resultados

Os resultados obtidos com o material extraído da hemolínfa do inseto adulto estão mostrados na figura 6. Foi verificado que além da quantidade de glucose-U-<sup>14</sup>C que não foi metabolizada, ocorreu a formação de um outro composto radioativo que migrou com o padrão de sacarose utilizado.

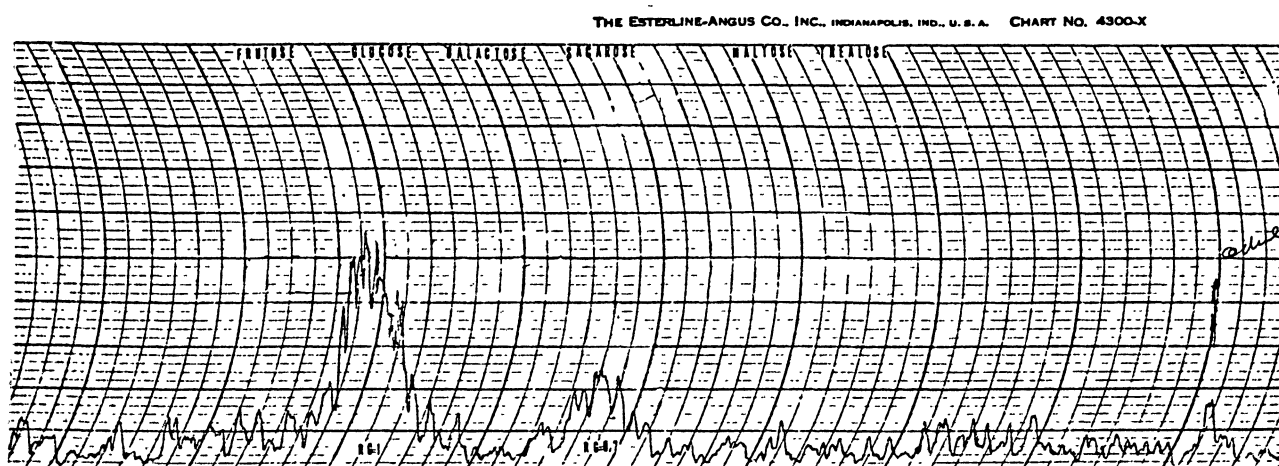


Figura 6 - Radiocromatograma da hemolínfa de inseto adulto de Panstrongylus megistus, injetado com glucose-U-<sup>14</sup>C. (Exp. 2, Tabela I). Foram utilizados padrões de glucose, frutose, galactose, sacarose, maltose e trealose, os quais foram revelados com nitrato de prata alcalino (54).

Pode-se deduzir dos resultados apresentados nas figuras 5 e 6 que a intensidade da radioatividade do composto RG=0,7 extraído da ninfa é cerca de três vezes maior do que a intensidade do mesmo composto sintetizado pelo inseto adulto.

Com base nestes resultados e tendo em vista a quantidade de significativamente alta de glucose não transformada pelo inse

## Resultados

---

to adulto, pode-se postular, que o inseto no estágio ninfal tem o seu metabolismo bem mais acelerado.

Em hemolínfa de Panstrongylus meqistus, que se alimentam de sangue, foi determinada a presença de trealose (figura 5) depois de injetada glucose radioativa no abdome do inseto (exp.1., Tabela I). Um fato interessante foi a deste dissacarídeo não ter sido observado no inseto adulto (figura 6).

Para confirmar o obtido, foi realizada a experiência 3, descrita na Tabela I, usando ninfas de 5<sup>o</sup> estágio. Foram aumentadas as quantidades de glucose radioativa para  $8.10^6$  c.p.m. e o tempo de extração da hemolínfa diminuído para 10 minutos. Após este período de tempo a hemolínfa foi coletada, desproteïnizada, passada por coluna de Amberlite MB-3 e o eluato concentrado à vácuo até a secura. O resíduo foi dissolvido em 0,1 ml de água destilada e cromatografado em papel Whatmann nº 1 por 40 horas, usando n-butanol-piridina - água (6:4:3) como solvente. Os cromatogramas foram corridos junto com os padrões de glucose, frutose, maltose, lactose, sacarose e trealose.

A análise cromatográfica revelou a presença de um com posto radioativo de  $RG=0,7$  que correspondia a sacarose, um de  $RG =1$  (glucose) e outro de  $RG=1,12$  que migrou como o padrão de frutose.

Os resultados da análise cromatográfica descrita acima estão especificados na Tabela II

Resultados

Tabela II Açúcares livres recuperados da hemolínfa da ninfa de 5º estágio de Panstrongylus megistus, 10 minutos após ser injetada glucose radioativa. (Experiência 3 da Tabela I).

Composto recuperado após 10 min. (270.000c.p.m.)	Quantidade recuperada (c.p.m.)	Quantidade (%)	RG
Glucose	210.000	78,0	1,0
Sacarose	21.000	7,7	0,7
Frutose	15.000	5,6	1,1

O diagrama apresentado na figura 7 representa a percentagem dos açúcares radioativos isolados da hemolínfa de ninfas de 5º estágio, por cromatografia, e que estão referidos na Tabela II.

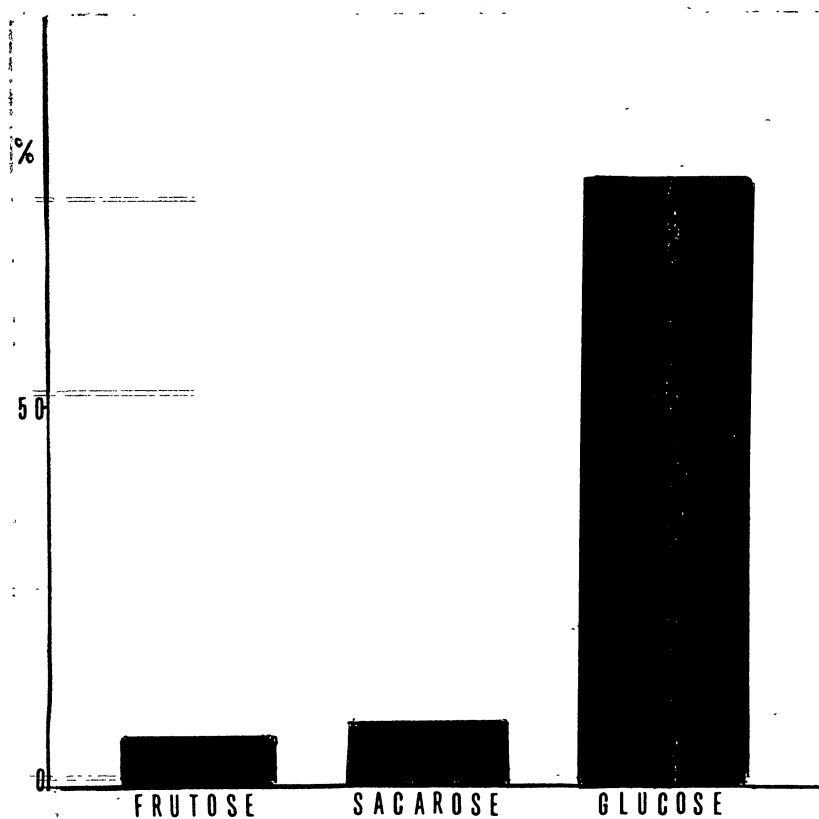


Figura 7 - Percentagem de açúcares livres encontrados na hemolínfa de ninfa de 5º estágio de Panstrongylus megistus (Tabela II), após 10 minutos de extração da hemolínfa radioativa.

Resultados

Foram realizadas as experiências números 4 e 5 (Tabela I) injetando-se 10  $\mu$ l de glucose-U-<sup>14</sup>C em cada uma das duas ninfas utilizadas. Em intervalos de 10 e 20 minutos respectivamente a hemolínfa foi coletada em álcool 66% contendo trealose e sacarose não radioativas. O precipitado formado foi retirado por centrifugação e o sobrenadante desionizado em coluna de Amberlite MB-3, concentrado à vácuo até a secura, dissolvido em 0,1 ml de água destilada e cromatografado. A cromatografia foi realizada em papel Whatmann nº 1 usando n-butanol-piridina-água (6:4:3) como solvente. Foi cortada uma tira delgada para revelar com nitrato de prata alcalino (54) e o radiocromatograma foi analisado no cintilador líquido mostrando a presença de glucose, frutose, trealose e sacarose radioativos e de outro composto, talvez um trissacarídeo, que migrou como o padrão de rafinose.

Tabela III - Açúcares livres isolados da hemolínfa de Panstrongylus megistus, após injeção de glucose-U-<sup>14</sup>C em intervalos de 10 a 20 minutos. (Experiência 4 e 5 da Tabela I).

Açúcares livres isolados da hemolínfa (RG)	10 minutos		20 minutos		Padrões de açúcares utilizados na cromat. em papel	
	c.p.m. totais	% recup.	c.p.m. totais	% recup.	Açúcares	RG
0,3	6.000	0,86	13.600	3,4	Rafinose	0,29
0,5	7.200	1,03	13.200	3,3	Trealose	0,48
0,7	16.800	2,4	54.400	13,6	Sacarose	0,67
1,0	216.000	31,0	58.000	17,0	Glucose	1,0
1,2	320.000	45,8	88.000	22,0	Frutose	1,18

Resultados

A tabela III mostra a quantidade de material radioativo recuperada da hemolínfa de 10 e 20 minutos após a glucose-U-<sup>14</sup>C ser injetada. O diagrama representado na figura 8 mostra a relação percentual dos carboidratos formados depois da administração de glucose radioativa às ninfas de 5º estágio.

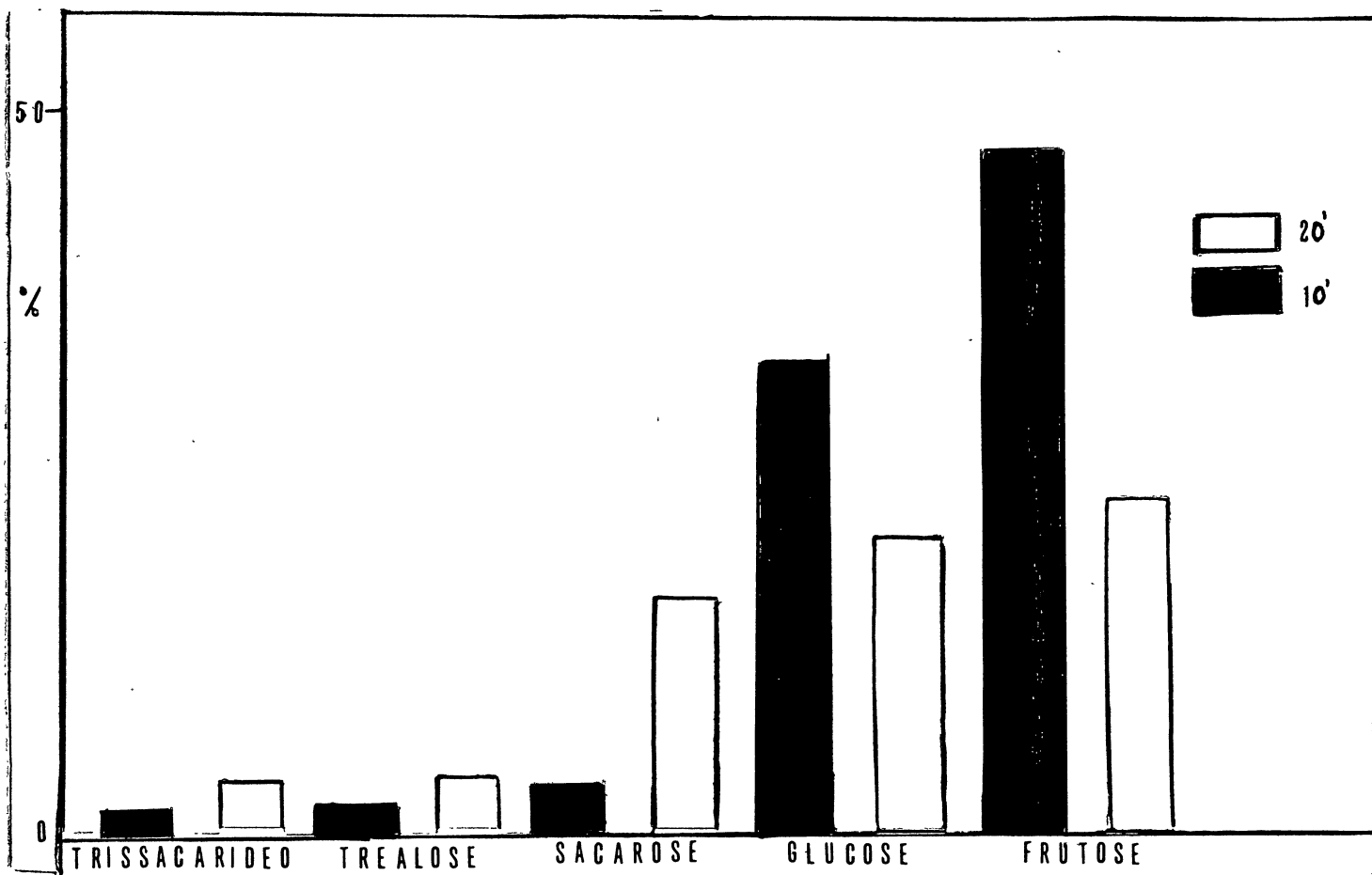


Figura 8 - Percentagem dos açúcares radioativos isolados da hemolínfa de ninfa de 5º estágio de Panstrongylus megistus, 10 e 20 minutos após glucose-U<sup>14</sup>C ser injetada no inseto.

## Resultados

---

Os açúcares radioativos que migraram como trissacarídeo, sacarose e trealose foram submetidos à hidrólise ácida com HCl 1N por 90 minutos à 37°C (34) e os hidrolisados foram recromatografados em n-butanol-piridina-água (6:4:3). O composto que migrou como um trissacarídeo não se hidrolisou, dando um único "spot" com a mesma migração anterior. O que migrou como sacarose foi hidrolisado em dois componentes que migraram como os padrões de glucose e frutose, ambos com a mesma intensidade radioativa.

A substância que apresentou migração semelhante ao padrão de trealose não sofreu hidrólise, o que era esperado, uma vez que a trealose é resistente a uma hidrólise ácida do tipo da que foi realizada. Uma alíquota deste composto radioativo foi incubada com trealase purificada, de Panstrongylus megistus, durante 18 horas à 37°C juntamente com 1  $\mu$ mol de trealose não radioativa. A reação foi parada e desproteïnizada aquecendo por 3 minutos em banho-maria fervente e cromatografada da mesma maneira anterior. O resultado do cromatograma indicou que a totalidade da trealose não radioativa usada como controle havia hidrolisada e que apenas 40% do composto radioativo identificado como trealose havia produzido glucose. Os outros 60% não foram identificados.

## DISCUSSÃO

A descoberta da Trealose na hemolínfa de sete espécies representando cinco ordens, por Wyatt & Kalf (59) foi seguida de outras publicações mostrando sua ocorrência numa grande variedade de insetos. Fairbairn (21) estudando setenta e uma espécies de invertebrados determinou que somente em insetos e alguns mamíferos a trealose ocorria em concentrações iguais ou maiores que as de glucose. Em Panstrongylus megistus foi determinada Trealose depois que se injetou glucose-U-<sup>14</sup>C no abdome e se analisou a hemolínfa. A Trealose assim determinada foi identificada como tal, por cromatografia em papel. Depois de submetida a hidrólise ácida e de incubada com Trealase do mesmo inseto a glucose resultante foi identificada por cromatografia em papel e por glucose oxidase-peroxidase (Sigma Chemical Co.) Treherne (49-52) estudando o mesmo problema em S.gregaria, verificou que grande parte da radioatividade encontrada na hemolínfa, após ministração de glucose <sup>14</sup>C, correspondia a trealose. Da mesma maneira Clegg & Evans (10) estudando a incorporação de glucose <sup>14</sup>C em hemolínfa de P.regina, observaram que 50% da radioatividade encontrada após 2 minutos e 90% após 10 minutos correspondia a trealose. Resultados que estão parcialmente de acordo com os obtidos neste trabalho.

A presença de frutose em hemolínfa de Panstrongylus-megistus 15 minutos após ministração de glucose-U-<sup>14</sup>C foi verificada. Este fato comprova pela primeira vez que frutose pode ser sintetizada em alguns insetos e aparecer como um componente normal da hemolínfa, independentemente do tipo de alimentação a que o animal tenha sido submetido.

## Discussão

---

Há 40 anos atrás já Beutler (7) determinava a presença de frutose em hemolínfa de abelhas, que continha também glucose. Estes resultados foram confirmados por Von Czarnowski em 1954 (57). Frutose também foi encontrada em larvas de Gastrophilus intestinalis (37). Quando Locusta migratoria era alimentada com peras, frutos muito ricos em frutose, apresentava a ocorrência deste açúcar em sua hemolínfa. Hansen (26), autor deste trabalho, propunha na ocasião que a presença de açúcares na hemolínfa dependia muito da alimentação proporcionada ao inseto, uma vez que o mesmo Locusta migratoria alimentado com trigo ou repolho de bruxelas não continha frutose no sangue. Aproximadamente 90% dos carboidratos totais encontrados por Hansen nesta última experiência eram glucose ou oligossacarídeos constituídos de unidades de glucose ( maltose e celobiose).

O fato de ter sido encontrada pequena quantidade de sacarose em Pastronylus meqistus, ocorrência aparentemente descrita pela primeira vez em insetos, parece ter importância. Todavia como as quantidades obtidas deste açúcar foram muito pequenas não houve ainda possibilidade de ser identificado por testes químicos.

A fração do cromatograma (figura 1) revelada com ninidrina, foi no sentido de se investigar a possível presença de amino-açúcares, provavelmente glucosamina e seus derivados. Inesperadamente porém, surgiram "spots" no cromatograma que depois de revelados com ninidrina, correspondiam a amino-ácidos. Claro que é conhecida a presença de amino-ácidos na hemolínfa, mas supunha-se que a passagem do material pela coluna de Amberlite MB-3 (mis

## Discussão

---

tura de resinas ácida e básica) houvesse eliminado estes compostos. É provável que a ocorrência seja devida ao fato destes compostos serem anfionios e que o pH, quando da passagem pela coluna estivesse muito perto do ponto iso-iônico, o que poderia ter permitido se comportarem como compostos neutros.

## SUMÁRIO

- - - -

Foram injetadas diferentes quantidades de glucose-U-<sup>14</sup>C na região dorsal das ninfas de 5º estágio e adultos de Panstrongylus megistus, (inseto vetor da doença de chagas). Após 10, 15, 20 e 30 minutos da administração de glucose radioativa a hemolínfa foi extraída e coletada em etanol. A análise revelou que grande parte da radioatividade permanecia solúvel após precipitação com álcool. A hemolínfa assim desproteïnizada foi desionizada com Amberlite MB-3 e o eluato foi concentrado e analisado por cromatografia em papel.

A análise radiocromatográfica da hemolínfa da ninfa de 5º estágio revelou a presença de um trissacarídeo com  $RG=0,3$ ; de Trealose, sacarose, frutose e glucose.

A análise radiocromatográfica da hemolínfa do inseto adulto mostrou somente a presença de glucose e sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABALOS, J.W & WYGODZINSKY, P. Las triatominae argentinas (Reduvidae, Hemiptera). apud BARRETO, M.P. Transmissores do Trypanosoma cruzi: os triatomíneos, 189-224, In: CANÇADO, J. R. Doenças de chagas. Belo Horizonte, s.ed., 1968. 666p.
- 2 - BACON, J.S.D. & EDELMAN, J. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae. Biochem.J., 48:114-126, 1951.
- 3 - BAYLEY, R.W. & BOURNE, E.J. Colour reactions given by sugars and Diphenylamine-Aniline spray reagentes on paper chromatograms. J.Chromat., 4:206, 1960.
- 4 - BAILEY, R.W. Colour reactions between sugars and Diphenylamine-Urea and Diphenylamine-p-anisidine on paper chromatograms. J.Chromat., 8:57, 1962.
- 5 - BARRETO, M.P. & FERRIOLLI, F<sup>o</sup>,F. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do Trypanosoma cruzi. apud BARRETO, M. P. Transmissores do Trypanosoma cruzi: os triatomíneos , 189-224, In: CANÇADO, J.R. Doenças de chagas. Belo Horizonte, s.ed., 1968. 666p.
- 6 - BARRETO, M.P. Transmissores do Trypanosoma cruzi: os triato

Referências Bibliográficas

---

- mineos. Doenças de chaças. Belo Horizonte, s.ed., 1968 .  
189-224.
- 7 - BEUTLER, R. In: WYATT, G.R. & KALF, G.F. The chemistry of insect hemolymph the trehalose and other carbohydrates. J. Gen. Physiology., 40(6):883-847, 1957.
- 8 - CARDINI, C.E. & LELOIR, L.F. Enzymatic formation of acetylglactosamine. J. Biol. Chem., 225:317, 1957.
- 9 - CHEFURKA, W. Some comparative aspects of the metabolism of carbohydrates in insects. Ann. Rev. Entomol., 10:345-382, 1965.
- 10- CLEGG, J.S. & EVANS, D.R. The physiology of blood trehalose and its functions during flight in blowfly. J. Exptl. Biol., 38:771-792, 1961 .
- 11- CONSDEN, R. & STAINIER, W.M. Ionophoresis of sugars on paper and some applications to the analysis of protein polysaccharide complexes. Nature, 169:783, 1952.
- 12- COSTA, A.L. Triatomídeos e Tripanosomas por eles vinculados na zona central da cidade de Salvador. Tese Fac. Med. Univer. Bahia Salvador, 80p., 1955
- 13- DENT, C.E. A study of the behaviour of some sixty amino-acids

Referências Bibliográficas

---

- and other ninhydrin-reacting substances on phenol "collidin" filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in Biological fluid. Biochem.J., 43:169-180, 1948.
- 14 - DERR, R.F. & RANDALL, D.D. Trehalase of the differential grasshopper, Melanoplus-differentialis. J.Insect.Physiol., 12: 1105-1114, 1966.
- 15 - DEUEL, H.J. & MOREHOUSE, M.G. The interrelation of carbohydrate and fat metabolism. Adv.Carbohyd.Chem., 2:119-160, 1946
- 16 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-356, 1956.
- 17 - EHRHARDT, P. Untersuchungen Zur Stoffwechselphysiologie von Megoura viviae. In: VEIGA, L.A., CHANDELIER EMA, L., GAIDUS, A.B. & MELLO, NEUZA, M.F. Aspectos especiais da bioquímica de carboidratos em insetos. Arq.Biol.Tecnol., 16(2):101-110, 1973.
- 18 - EVANS, D.R. & DETHIER, V.G. The Regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. J.Insect.Physiol., 1:3-17, 1957.

Referências Bibliográficas

---

- 19 - FAULKNER, P. A Hexose 1-phosphatase in silkworm blood. Biochem.J., 60:590-596, 1955.
- 20 - FAULKNER, P. Enzymic reduction of sugar phosphates in insect blood. Biochem.J., 64:436-441, 1956
- 21 - FAIRBAIRN, D. Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. In: HOWDEN, G.F. & KILBY, B.A. Biochemical studies on insect hemolymph. J.Insect.Physiol., 6:85-95, 1961.
- 22 - FRIEDMAN, S. Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of Phormia regina, Arch.Biochem.Biophys., 93:550-554, 1961.
- 23 - FREITAS, J.L.P. Observações sobre xenodiagnósticos em reservatórios domésticos e silvestres do Trypanosoma cruzi em uma localidade endêmica da moléstia de chagas no estado de São Paulo. Hospital, 38:521-529, 1950.
- 24 - GLASER, L. & BROWN, D.H. The synthesis of chitin in cell-free extracts of N.crassa. J.Biol.Chem., 228:729-742, 1957.
- 25 - GRAY, H.E. & FRAENKEL, G. The Carbohydrate components of honeydew. Physiol.Zool., 27:56-65, 1954.

Referências Bibliográficas

---

- 26 - HANSEN, O. Effect of diet on the amount and composition of locust blood carbohydrates. Biochem.J., 92:333-337, 1964.
- 27 - HOWDEN, G.F. & KILBY, B.A. Trehalose and trehalase in the locust. Chem.Ind., 1453-1454, 1956.
- 28 - HUGGET, A.St.G. & NIXON, D.A. Enzimic determination of blood glucose. Biochem.J., 66(1):12p, 1957
- 29 - HOUGH, L., JONES, J.K.N. & WADMANN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part.V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography. J.Chem.Soc., 1702-1706, 1950.
- 30 - JAWORSKI, E., WANG, L. & MARCO, G. Synthesis of chitin in cell-free extracts of Prodenia eridania. Nature, 198:790, 1963 .
- 31 - JEPSON, J.B. & STEVENS, B.J. A Fluorescence test for serotonin and other tryptamines. Nature, Lond., 172:772,1953.
- 32 - JERMYN, M.A. & ISHERWOOD, F.A. Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. Biochem.J. , 44:402-407, 1949

Referências Bibliográficas

---

- 33 - LEAL, H., FERREIRA NETO, J.A. & MARTINS, C.M. Dados ecológicos sobre os triatomíneos silvestres na ilha de Santa-Catarina, Brasil, Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo, 3:213-220,1961.
- 34 - LELOIR, L.F. & CARDINI, C.E. The Biosynthesis of sucrose phosphate. J.Biol.Chem., 214:157-165, 1955.
- 35 - LEIBOWITZ, J. Isolation of trehalose from Desert Manna. Biochem.J., 38:205-213, 1944 .
- 36 - LEMIEUX, R.V., & BAUER, H.F. Spray reagent for the detection of carbohydrates. Anal.Chem., 26:920-921, 1954.
- 37 - LEVENBOOK, L. The Composition of horse bot fly (Gastrophilus intestinalis) larva blood. Biochem.J., 47:336-346 , 1950.
- 38 - LUCENA, D.T. Ecologia dos Triatomíneos do Brasil. apude BARRETO, M.P. Transmissores do Tripanosoma cruzi: os triatomíneos, 189-224, In: CANÇADO, J.R. Doenças de chagas. Belo - Horizonte, s.ed.,1968. 66p.
- 39 - LWOFF, M. & NICOLLE, P. Nécessité de l'hematine pour la nutrition de Triatoma infestans Klug (Rèduvidé hématophage) apud BARRETO, M.P. Transmissores do Trypanosoma cruzi : os triatomíneos, 189-224, In: CANÇADO, J.R. Doenças de chagas.

Referências Bibliográficas

---

- 40 - MAURIZIO, A. Untersuchungen über das zuckerbild der Hämolin  
phe der Honigbiene (Apis-mellifica). J.Insect.Physiol., 11:  
745-763, 1965 .
- 41 - MURPHY, T.A. & WYATT, G.R. The Enzymes of glycogen and Treha  
lose synthesis in silk fat body. J.Biol.Chem., 240:1500 -  
1508, 1965 .
- 42 - NELSON, N. A Photometric adaptation of the somogyi method  
for the determination of glucose, J.Biol.Chem., 153:375 -  
380, 1944.
- 43 - POWNING, R.F. & IRZYKIEWICZ, H. A Chitinase from the gut of  
the cockroach Periplaneta americana. Nature, 200:1128, 1963.
- 44 - SAITO, S. Trehalose in the body fluid of the silkworm  
Bombyx-mori. J.Insect.Physiol., 9:509-519, 1963.
- 45 - SHYAMALA, M.R. & BHAT, J.V. Intestinal transport of glucose  
in the silkworm Bombyx-mori. Indian.J.Biochem., 2:101-104,  
1965.
- 46 - SMITH, I. Paper electrophoresis at low voltage. Chromatogra  
phic and Eletrophoretic Techniques., London, W.Heinemann ,  
1960p. 1-35.

Referências Bibliográficas

---

- 47 - SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars .  
J.Biol.Chem., 160:61-68, 1945 .
- 48 - SUTCLIFFE, D.W. The chemical composition of the hemolymph in insects and some other artropods, in relation to their phylogeny. Comp.Biochem.Physiol., 9:121-135, 1963.
- 49 - TREHERNE, J.E. Glucose absorption in the cockroach. J.Expl. Biol., 34:478-485, 1957.
- 50 - TREHERNE, J.E. The Absorption of glucose from the alimentary canal of the locust S.gregaria, J.Expl.Biol., 35:297-306 , 1958.
- 51 - TREHERNE, J.E. Facilitated diffusion and exchange in the absorption of glucose by the locust S.gregaria. Nature, 181:1280-1281, 1958.
- 52 - TREHERNE, J.E. The Absorption and metabolism of some sugars in the locust S.gregaria. J.Expl.Biol., 35:611-625, 1958.
- 53 - TREHERNE, J.E. The Nutrition of the central nervous system in the cockroach, Periplaneta americana L. The exchange and metabolism of sugars. J.Expl.Biol., 37:513-533, 1960 .

Referências Bibliográficas

---

- 54 - TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by the of dipping reagents , Nature, 166:444-445, 1950.
- 55 - VANEY, C. & MAIGNON, F. Contribution à l'étude physiologique des metamorphoses du ver à soie. In: VEIGA, L.A., CHANDE LIER, EMA, L., GAIDUS, A.É. & MELLO, NEUZA M.F. Aspectos es peciais de bioquímica de carboidratos em insetos. Arq.Biol. Tecnol., 16(2):101-110,1973.
- 56 - VEIGA, L.A., CHANDE LIER, EMA L., GAIDUS, A.B., MELLO, NEUZA M. F. Aspectos especiais de bioquímica de carboidratos em in setos. Arq.Biol.Tecnol., 16(2):101-110, 1973.
- 57 - VON CZARNOWSKI, C. In: WYATT, G.R. & KALF, G.F. The chemis try of insect hemolymph. II Trehalose and other carbohydra tes. J.Gen.Physiology., 40(6):833-847, 1957.
- 58 - WANG, C.M. & PATTON, R.L. Carbohydrates in the hemolymph of the cricket, Acheta Domesticus. J.Insect.Physiol., 15:861 - 866, 1969.
- 59 - WEIS-FOGHM, T. Diffusion in insect wing muscle, the most active tissue known. J.Expl.Biol., 41:229-256, 1964.

Referências Bibliográficas.

---

- 60 - WYATT, G.R. & KALF, G.F. Trehalose in insects. Fed.Proc.Fed. Am.Socs.Expl.Biol., 15:388, 1956.
- 61 - WYATT, G.R. & KALF, G.F. The chemistre of insect haemolymph .  
II Trehalose and other carbohydrates. J.Gen.Physiol., 40(6)  
:833-847, 1957.
- 62 - WYATT, G.R. The Biochemistry of sugars and polysaccharides in  
insects. In: BEAMENT, J.W.L., TREHERNE, J.E. & WIGGLESWORTH ,  
V.B. Adv.Insect.Physiol., London, Academic Press, 1957, V.4p;  
287-360.
- 63 - WYATT, G.R. The Biochemistry of insect hemolymph. Ann.Rev. Entomol., 6:75-102, 1961a.
- 64 - WYATT, G.R. The Biochemistry of sugars and polysaccharides in  
insects. Adv.Insect.Physiol., 4:287-360, 1967.

## AGRADECIMENTOS

- 41 -

= = = = =

- 1 - Aos componentes da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, bem como, ao seu D.D. Chefe de Departamento Dr. Luiz Alberto Veiga, pela orientação, e apoio necessários à execução desta tese como orientador
- 2 - Ao Dr. Luis Marechal, da Universidade de Buenos Aires, um agradecimento todo especial pela orientação e dedicação, principalmente nos ensaios radioativos.
- 3 - Ao Prof. Antonio Borba, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, pela gentileza em nos oferecer os primeiros insetos e seu laboratório para a criação e alimentação desses, aonde, após um ano e meio foi possível extrair hemolínfa suficiente para a realização do presente trabalho.
- 4 - Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (Processos ..... 10.755/73, 9.373/68, 12.775/74 e 7.100/75).
- 5 - À coordenação, professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Entomologia pelo seu alto espírito de companheirismo e amizade.
- 6 - À todas aquelas pessoas e entidades que de um modo direto ou indireto colaboraram na realização desta tese.
- 7 - Agradecimento de um modo todo especial a minha família, pela sua compreensão, carinho e estímulo no período de realização deste trabalho.