

SENT
CHA

ema luiza chandelier

2 M

ESTUDO DA TREALASE DE

Panstrongylus megistus (Burm.1835)

**CURITIBA
1976**

Fichada para
o Arquivo de
Candidata

EMA LUIZA CHANDELIER

Ema Luiza Chandelier

13-05-77
[Signature]

ESTUDO DA TREALASE DE PANSTRONGYLUS MEGISTUS (Burm. 1835)

Tese apresentada à Comissão de
Pós-Graduação em Zoologia atra-
vês da Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Entomologia da
Universidade Federal do Paraná,
para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.

[Signature]
[Signature]
[Signature]
[Signature]

Curitiba, 1976

Curitiba, 13 de maio de 1977

15.7.5
C 454

TESE ORIENTADA PELO

DR. LUIS ALBERTO VEIGA

I N D I C E

	Página
<u>INTRODUÇÃO</u>	01
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	09
Insetos	09
Condições de criação	09
Reagentes químicos	09
Métodos analíticos	09
Purificação e extração da enzima	10
Extração da hemolinfa	10
Preparação do extrato livre de células	11
Tratamento com DEAE-celulose	11
Filtração em Sephadex G-100	11
Sistemas de reação	12
Atividade enzimática	13
Estudo termodinâmico da reação	13
<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	14
Atividade Tralásica da Hemolinfa	14
Efeito do aquecimento prévio	14
Efeito do pH	15
Efeito do tempo de incubação	17
Efeito da concentração de hemolinfa	18
Efeito da concentração de substrato	19
Efeito de reagentes inorgânicos	20
Trealase do Inseto Inteiro	21
Purificação da enzima	21
Efeito do pH	25
Efeito da temperatura de incubação	26
Proporcionalidade do tempo de incubação e concentra- ção da enzima	27
Estequiometria da reação	29
Efeito de reagentes inorgânicos	30

Efeito da concentração de substrato	31
Especificidade	32
Estabilidade da enzima	32
Estimativa do pêsso molecular	32
Estudo termodinâmico da reação	32

<u>SUMÁRIO</u>	37
----------------------	----

<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	40
---	----

FIGURAS E TABELAS

FIG. 1 - Efeito do pH	16
FIG. 2 - Efeito da concentração de hemolinfa	18
FIG. 3 - Efeito da concentração de substrato: representa- ção de Lineweaver e Burk	19
FIG. 4 - Cromatografia em DEAE - celulose	23
FIG. 5 - Filtração em Sephadex G-100	24
FIG. 6 - Efeito do pH	25
FIG. 7 - Efeito da temperatura de incubação	26
FIG. 8 - Proporcionalidade do tempo de incubação	27
FIG. 9 - Concentração da enzima	28
FIG.10 - Estequiometria da reação	29
FIG.11 - Representação de Lineweaver e Burk	31
FIG.12 - Pêsso molecular	33
FIG.13 - "Plot" de Arrhenius	35

Tab. I- Efeito do aquecimento prêvio da hemolinfa	15
Tab. II- Efeito do tempo de incubação	17
Tab.III- Efeito de reagentes inorgânicos na hemolinfa ...	20
Tab. IV- Purificação da trealase	22
Tab. V- Efeito de reagentes inorgânicos	30

ESTUDO DA TREALASE DE P.MEGISTUS (Burm. 1835)INTRODUÇÃO

A história da descoberta da trealose remonta ao século passado quando, na Exposição Internacional de Paris, em 1855, foi exibida uma coleção de produtos farmacêuticos orientais. Entre os mesmos, foi exposta amostra de um composto originário da Síria, "Trehala", obtido de insetos e que no oriente era usado como produto farmacêutico.

As primeiras notícias com respeito a trealose surgiram no cenário mundial com as publicações de três eminentes pesquisadores da época. Berthelot publicou uma série de trabalhos: "Sur diverses matières sucrées", "Sur le trehalose, nouvelle espèce de sucre" e "Nouvelles recherches sur les corps analogues au sucre de canne" (1,2,3).

Guibourt (4), em 1858, apresentava na Academia de Ciências de Paris um relato sobre a "trehala" usada no oriente: "Notice - sur une matière Pharmaceutique nommée le Trehala, produite par un insecte de la famille de charançons". No ano seguinte, Hanbury (5) publicava na Inglaterra "Note on two insect-products from Persia", um deles sendo a "trehala".

Berthelot chegou a comentar em seus trabalhos a similaridade do açúcar que havia descoberto com o "mycose", isolado de um fungo que atacava o centeio, descrito por Wiggers em 1832(6) e por Mitscherlich em 1858 (7). Mais tarde os dois açúcares foram determinados serem idênticos e a nomenclatura proposta por Berthelot (trealose) foi a que prevaleceu.

Mesmo depois dos trabalhos de Leibowitz em 1934 e 1944 (8,9) - em que foi isolada a trealose de excreções secas de insetos, a íntima relação deste açúcar com este tipo de animais ainda não havia sido referida. Somente mais de dez anos depois começaram a aparecer indicações de que os insetos eram possuidores de um açúcar muito particular, determinado ser a trealose por três grupos diferentes de pesquisadores: Wyatt e Kalf, 1956 e 1957 (10,11); Howden e Kilby em 1956 (12) e Evans e Dethier em 1957 (13).

A trealose o açúcar mais característico da hemolinfa de muitos insetos, (α -D-glucopiranosil - α D-glucopiranosose) Wyatt, 1967 (14), é um dissacarídeo simétrico de glucose que não tem propriedade redutora por serem ambos os átomos de carbono anomérico das unidades de glucose ligados entre si por ligação glicosídica. Normalmente, mais de 0,5% dos açúcares totais estão contidos na hemolinfa dos insetos. Em vários deles a trealose é encontrada em altas concentrações (cerca de 6,5%) e a glucose em quantidades menores.

Alguns pesquisadores como Evans e Dethier, 1957 (13); Mochnecka e Petryszyn, 1959 (15); Barlow e House, 1960 (16) Dutrieu, 1961 (17); Crompton e Birt, (18); Wimer, 1969 (19); Leader e Bedford, 1972 (20) não encontraram trealose na hemolinfa das espécies que estudaram, mesmo em diferentes estágios de desenvolvimento. Randall e Derr (21) em 1965 determinaram a presença do dissacarídeo em todas as espécies estudadas, embora resultados negativos tenham sido encontrados em algumas fases do desenvolvimento.

Na musculatura, principalmente em músculos responsáveis pelo voo, este açúcar é também encontrado. Em Locusta migratoria, a concentração do dissacarídeo após o voo, é significativamente reduzida, (Bücher e Klingenberg, 1958) (22). Estudos semelhantes foram realizados em Periplaneta americana por Polacek e -

e Kubista, 1961 (23), em Phormia regina por Cleeg e Evans, - 1961 (24), Sacktor e Wormser-Shavit, 1966 (25) e em Musca domes- tica por Srivastava e Rockstein, 1969 (26).

Cleeg e Evans (24) trabalhando com Phormia regina, determinaram que havia uma íntima relação entre a concentração de trealose - da hemolinfa e a frequência de batimento das asas do inseto.

Em 1966, Sacktor e Wormser-Shavit (25) encontraram um sensível desnível na concentração da trealose da hemolinfa durante o - vôo da Phormia regina. A concentração deste dissacarídeo caía abruptamente nos primeiros cinco segundos, continuando a baixar de maneira menos violenta até os trinta segundos e este nível - de consumo de trealose continuava a baixar com menos intensida- de com a continuação do vôo. Os referidos pesquisadores postula- ram que estas diferenças de níveis ocorriam porque, primeiramen- te era consumida com alta intensidade a trealose muscular e de- pois dos trinta segundos de vôo era então utilizada a trealose da hemolinfa.

Na mesma época em que a trealose foi determinada em insetos, - Fairbain e Passey em 1957 (27) descobriram a ocorrência deste - açúcar em *Ascaris* e em outros invertebrados pertencentes a ou- tros filos (28).

Segundo Myrbäck, 1949 (29) a trealose pode ser encontrada em - fungos e algas. Kandler e Senser, 1965 (30) descreveram seu apa- recimento em algumas pteridófitas.

A utilização da trealose por insetos depende de uma enzima he- drolítica específica denominada trealase, (α - α - Glucosídeo - 1-glucohidrolase, E.C. 3.2.1.28) que hidrolisa aquele açúcar em duas moléculas de glucose.



Até o presente momento, nenhum outro mecanismo para degradar - trealose é conhecido em insetos.

Em 1941, antes que fosse determinada a presença da trealose em insetos, Frerejacque (31) já ensaiava experimentos que provavam a existência da enzima hidrolítica trealase naqueles animais. Procurando uma fonte razoável da enzima este autor investigou vários insetos que se alimentavam de fungos que eram sabidos conter trealose. Havendo determinado trealase nestes, tentou então outras espécies, verificando surpreendentemente que um grande número deles apresentava preparações com atividade enzimática bem sensível. Também obtinha preparações com atividade trealásica a partir de homogenizados de cabeça, tórax e abdome de um coléoptero que atacava batata. Usando estas preparações, a trealose era hidrolisada mais rapidamente que sacarose e maltose. Observou ainda que o pH ótimo para esta enzima estava em torno de 5,8.

Somente a partir de 1954 começaram a ser publicados trabalhos sobre a trealase de insetos, Alguns pesquisadores trabalharam com preparações de insetos inteiros, Kalf e Rieder 1958 (32); - Saito em 1960 (33); Guilloux et al., em 1968 (34).

A Trealase ocorre tanto em tecidos iguais de espécies diferentes, como em tecidos diferentes do mesmo inseto. A trealase solúvel é encontrada no intestino e hemolinfa (35,36), entretanto outro tipo, que está associado a frações particuladas, é encontrado em músculo (37,38,39,40). No tubo digestivo é onde se encontra trealase com mais alta atividade enzimática. Em 1954, Duspiva (41) isolando trealase de glândulas salivares e intestino de várias espécies de afídeos, observou que a enzima exibia maior atividade frente a trealose do que ante sacarose, que era o açúcar que predominava em sua dieta. Petryszyn e Szarkowska, 1959 (42) encontraram uma alta atividade de enzima no intestino da lagarta de Celerio euphorbiae.

Recentemente em 1975, Talbot e Huber (43) isolaram e purificaram parcialmente trealase intestinal de Apis mellifera.

A presença da trealase no intestino dos insetos se verifica aparentemente com a finalidade de evitar perda de trealose, que sendo hidrolisada em duas moléculas de glucose, é facilmente difundida através da parede intestinal para a hemolinfa e corpo gorduroso, onde a trealose seria resintetizada, evitando assim a sua perda pela excreção intestinal (44).

Ehrardt em 1962 (45), observou que alguma quantidade de trealose era encontrada ocasionalmente no mel excretado por afídeos.

A trealase do sistema digestivo de gafanhotos adultos foi motivo dos estudos de Zebe e McShan, 1959 (46) em Leucophaea maderae; Derr e Randall, 1966 (47) em Melanoplus differentialis; e em Schistocerca gregaria, por Evans e Payne, 1964(48).

Em trabalho recente, Friedman (49) determinou que a trealase de Phormia regina não era eletroforéticamente ou cineticamente homogênea e que parecia existir dois tipos da enzima. Uma isoenzima A que era restrita ao intestino e hemolinfa e uma ~~isoenzima~~ zima B que ocorria na cabeça e músculos do inseto.

Vários trabalhos tem sido publicados mostrando a presença da trealase na hemolinfa de insetos. Os primeiros pesquisadores a descrevê-la foram Howden e Kilby (12). Friedman em 1960 e 1961 (50,51) realizou experiências interessantes com espécies adultas de Phormia regina, verificando que quando se aquecia hemolinfa a 60°C durante 1-3 minutos a atividade da enzima aumentava sensivelmente. O mesmo era verificado com a adição de EDTA, o que mostrava necessitar a enzima de um metal divalente, provavelmente Mg^{++} . A hipótese de Friedman é a de que existiria na hemolinfa uma proteína ou lipoproteína bloqueando ou inibindo a atividade trealásica, que após aquecimento a 60°C era sensivelmente aumentada. Uma explicação para este fenômeno seria

a possível desnaturação do inibidor pelo aumento de temperatura.

Algumas mudanças na atividade da trealase da hemolinfa durante o ciclo de ecdises foram observadas por Duchâteau - Bosson et al (52). Estes autores determinaram que durante as mudas, enquanto o nível de trealose baixava o de glucose era elevado - sensivelmente. Este fato, que já havia sido descrito por Florin (53) e por Wyatt e Kalf (10) não foi documentado com dados quantitativos. Estes desníveis foram interpretados como sendo uma desinibição fisiológica da trealase da hemofinfa, assim - sendo a glucose apareceria quando fosse ^{necessária} para processos de síntese como, por exemplo, na formação da quitina pela epiderme e da sêda pelas glândulas da sêda, experiências citadas por Florin e Jeuniaux (54).

Na lagarta do bicho da sêda Samia cyntia ricini, Chang et al., 1964 (55), observaram que quando ensaiavam diretamente a hemolinfa extraída nos estágios de muda, e no período de pupação, a trealase mostrava-se ativa, o mesmo não acontecendo durante o período de alimentação para o crescimento. Quando submetida ao aquecimento, ou em presença de EDTA, conforme demonstrou Friedman em Phormia regina (51), ocorria um aumento na atividade - trealásica da hemolinfa a qual aparecia em outras fases do - crescimento do inseto, onde anteriormente não havia sido detectada. Por outro lado, os mesmos tratamentos não surtem efeito quando aplicados a homogenizados de intestino e corpo gorduroso.

Liu e Feng (56), observaram um aumento na atividade trealásica na hemolinfa de Leucania separata submetida a um jejum contínuo, quando ocorria também uma concomitante queda nos níveis de trealose.

Pelo que foi apresentado até agora conclui-se que a presença - da trealase na hemolinfa parece ter a finalidade de produzir - glucose para os processos de síntese em tecidos que não tem ca

pacidade de utilizar a trealose diretamente.

Outro tipo de trealase, associada a frações particuladas, foi determinada por Sacktor em 1955 (57) em músculo de voo de Musca domestica. Pelos estudos de Hansen (58); Reed e Sacktor (59); - Gussin e Wyatt (38) e de Gilby et al., 1967 (60), sabe-se atualmente que 25% da atividade total da trealase do músculo está na forma solúvel. Segundo Friedman e Alexander (61) a trealase solúvel encontrada no músculo de Phormia regina, é eletroforeticamente diferente da trealase encontrada na hemolinfa.

Em Sarcophaga barbata, Clements et al. (62) encontraram uma trealase mitocondrial. Reed e Sacktor (59), mais recentemente, determinaram a localização ultraestrutural da enzima em mitocôndria de músculo de voo de Phormia regina, executando um sub-fraacionamento das membranas mitocondriais, medindo nestas a distribuição da atividade trealásica. Devido à dificuldade de obtenção de boas preparações onde as membranas interna e externa estivessem separadas, tem sido de fato difícil aos pesquisadores afirmar a real localização da trealase. Entretanto a hipótese de que esta enzima esteja situada na membrana interna da mitocôndria é a que tem prevalecido.

O real mecanismo de controle da atividade trealásica durante as fases de repouso-voo tem sido exaustivamente estudado sem ser alcançado o sucesso esperado.

A trealase de músculos torácicos de várias espécies de baratas, gafanhotos e borboletas noturnas podem ter sua atividade enzimática várias vezes aumentada pela ação de agentes físicos e químicos como por exemplo, congelamento e descongelamento rápidos, uso de detergentes e adição de enzimas lipolíticas, que tendem a romper a estrutura lipoproteica das paredes (38,46,60,63).

Gilby et al., (60) Gussin e Wyatt, 1965 (38) trabalhando com mosca doméstica e duas espécies de mosca varejeira, igualmente constataram que o congelamento e descongelamento não provocavam

nenhum aumento na atividade da trealase. Vaughan et al., (1973) (64) determinaram que a adição de íons Ca não apresentavam nenhuma influência sobre a atividade da enzima de músculo de Sarcophaga barbata e Bombus hortorum.

Reed e Sacktor (59) demonstraram que a trealase do músculo de vôo de Diptera está localizada na mitocôndria, provavelmente na superfície externa da membrana interna daquela partícula celular.

O trabalho aqui apresentado determina a ocorrência da atividade trealásica em hemolinfa e corpo inteiro de Panstrongylus megistus. Estudos foram realizados visando a purificação da enzima e a determinação de algumas de suas propriedades físicas e químicas.

MATERIAL - MÉTODOS

Insetos

Os insetos da Ordem Hemiptera, Família Reduvidae, Gênero Panstrongylus, Espécie megistus foram gentilmente cedidos pelo professor Antonio Mário Borba do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná. Para a realização deste trabalho foram utilizadas ninfas de 5º estágio e a trealase estudada foi obtida de duas fontes: hemolinfa e corpo inteiro.

Condições de criação

Os insetos foram criados em laboratório, mantidos em frascos de plástico com 12 cm. de base por 20 cm. de altura tendo a abertura coberta com tela para permitir boa aeração e facilitar a alimentação. A temperatura da sala de criação foi mantida em torno de 27°C. Sendo insetos hematófagos a alimentação foi feita em galinhas, em intervalos de três (3) dias.

Reagentes químicos

Glucose-oxidase, peroxidase, α - α - trealose anidra, e outros açúcares utilizados, soro albumina bovina e DEAE-celulose foram adquiridos da Sigma Chemicals Company. Os demais reagentes químicos utilizados no presente trabalho foram produtos puros e adquiridos de fontes comerciais de mais alta confiança.

Métodos analíticos

Glucose foi dosada em hemolinfa, pelo método colorimétrico da glucose-oxidase (65), modificado por Sols et al., (66) e nos demais casos pelo método de Somogyi (67) e Nelson (68). A determinação de monossacarídeos redutores em presença de oligossacarídeos redutores -

foi realizada utilizando o método de Caputto, Leloir e Trucco (69). DEAE-celulose foi preparada de acordo com o método de Sober et al., (70). Proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al., (71) e as densidades óticas foram medidas em espectrofotômetro Coleman Jr. Todos os ensaios foram feitos em duplicata e acompanhados de um tubo controle, sem trealose, que era adicionada após a reação ser interrompida pela adição de reativo de Somogyi.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Extração da hemolinfa

Várias tentativas foram feitas para extrair a hemolinfa dos insetos utilizados no presente trabalho. Primeiramente tentou-se coletá-la após anestesiá-los com clorofórmio e em seguida removendo uma das pernas; desta maneira a quantidade de material obtida mostrou-se insuficiente. A tentativa de colher hemolinfa por centrifugação, após decapitação ou remoção de uma das pernas, mostrou-se ineficaz, uma vez que pela força centrífuga parte do conteúdo do tubo digestivo era coletado junto com o líquido desejado. Foi tentado ainda obter hemolinfa - fazendo uma perfuração no abdome do inseto, logo abaixo do escutelo, entretanto o material coletado com auxílio de uma micro-seringa graduada, não era suficientemente puro para o desenvolvimento do trabalho, pois era frequente a perfuração do intestino. O método que surtiu - melhor efeito foi o de seccionar um dos espinhos da porção anterior e lateral do pronoto, por onde a hemolinfa era coletada com auxílio de um tubo capilar de 0,1cm de diâmetro por 14cm de altura. Antes da operação os insetos eram conservados por dez(10) minutos à temperatura - de 4°C para evitar movimentação excessiva. Na execução do trabalho não foi levado em consideração o tempo após

a 4a. ecdise e sim o período pós alimentar do inseto - que foi de três(3) dias. O volume médio de hemolinfa - retirado de cada inseto foi de 60(sessenta) microli- - tros. Apresentava-se com coloração amarelo cítrino, es- - curecendo com o tempo, chegando à cor negra quando em - contacto com o ar, mesmo na temperatura de trabalho, - entre 2 - 4°C. Após retirada a hemolinfa os insetos - eram conservados a -15°C para uso posterior, sem perda - de atividade trealástica por pelo menos doze(12) meses.

Preparação do Extrato Livre de Células

80 insetos (ninfas de 5º estágio) sem hemolinfa e sem intestino (18gr), foram trituradas em gral gelado con- - tendo 65gr de areia do mar previamente tratada. O mace- - rado foi suspenso em 35 ml. de água destilada e centri- - fugado à 10.000 X g por 30 minutos em centrífuga refri- - gerada International, Modelo PR₂. O extrato livre de cé- - lulas (48ml) foi dialisado durante uma noite contra á- - gua à 4°C.

Tratamento com DEAE - Celulose

10 ml do extrato livre de células, dialisado, contendo 375mg de proteínas, foram aplicadas a uma coluna de - DEAE-celulose com capacidade de troca de 0,98 mEq/gX,- - com 1,3cm de diâmetro por 19cm de altura, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH6,0. A enzima foi eluída com a mesma solução tampão num fluxo de 1ml por minuto e frações de 5ml foram coletadas em coletor de frações Beckman, modelo 132, com unidade de refrigeração Beckman, modelo 133.

Filtração em Sephadex G-100

As frações que apresentaram maior atividade foram reunidas (20ml) e concentradas com Carbowax (Union Carbide - Chemicals Company) até 1,62ml. A solução enzimática (1,62ml) foi aplicada em uma coluna (2 X 73cm) de Sephadex G-100 (Pharmacia-Upsala), equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0. A enzima foi eluída com o mesmo tampão e frações de 7,0 ml foram coletadas em coletor de frações Beckman.

As frações de maior atividade foram reunidas e usadas para determinação de suas propriedades físicas e químicas.

Sistemas de reação

Para a pesquisa da trealase na hemolinfa, a não ser quando indicado no texto, a mistura de incubação era constituída de 40 micromoles de tampão acetato pH 5,0; 2 micromoles de trealose e 0,02ml de hemolinfa, num volume total de 0,5ml. A mistura incubada durante 30 minutos à 37°C. A reação foi parada por aquecimento em banho de água fervente por 2 minutos, o precipitado foi separado por centrifugação e a glucose liberada na solução sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico da glucose-oxidase. A cor desenvolvida foi determinada em espectrofotômetro Coleman Jr. à 430nm. Para o estudo da trealase do inseto inteiro a não ser quando indicado no texto, a mistura de reação continha 2 micromoles de tampão acetato, pH 5,0; 2 micromoles de trealose e 0,02 ml de enzima num volume final de 0,05ml. A mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. A reação foi parada por aquecimento em banho de água fervente por 2 minutos e o precipitado foi removido por centrifugação, o sobrenadante foi testado pelo método de Somogyi-Nelson, para açúcares redutores. A cor desenvolvida foi lida em Coleman Jr. à 535nm. Os experimentos de etapas

de purificação, concentração de enzima, estequiometria, efeito de reagentes inorgânicos, especificidade pelo substrato e estimativa do peso molecular, foram realizados com enzima purificada. Foram desenvolvidas experiências para comprovar o comportamento dos tampões McIlvaine e acetato, sendo verificado que ambos se mostraram satisfatórios para os estudos da trealase de hemolinfa e do inseto inteiro.

Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de glucose liberada durante a hidrólise da trealose e a unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de trealase capaz de hidrolisar 1 micromole de trealose por hora, a 37°C.

Estudo Termodinâmico da Reação

Para a avaliação dos parâmetros termodinâmicos foi elaborado um gráfico de Arrhenius (72), através dos dados obtidos na avaliação da temperatura ótima (T_0). A energia de ativação da reação (E^*) foi avaliada a partir do coeficiente angular da reta obtida, quando se plotou o logaritmo das velocidades, contra o inverso das temperaturas absolutas ($^{\circ}K$), segundo a equação:

$$\log V = -E^*/2,3 RT + \text{Log} C$$

onde V é a velocidade máxima, E^* é a energia de ativação da reação, R é a constante dos gases ($\approx 2 \text{ cal/mol}$) e T é a temperatura na escala absoluta.

A entalpia de formação do complexo enzima-substrato (H^*), foi estimado segundo a relação abaixo:

$$\Delta H^* = E^* - RT$$

Outro parâmetro, Q_{10} , definido como a relação entre as máximas velocidades da reação, às temperaturas absolutas t e $t + 10$, (73) foi calculado por simples interpolação da reta obtida segundo Arrhenius (72).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Trealásica da Hemolinfa

Efeito do aquecimento prévio

Confirmando o verificado por Friedman (51), quando comprovou a presença de um agente inibitório da atividade trealásica da hemolinfa de Phormia regina, que era destruído pelo aquecimento, foi verificado que a hemolinfa de P. megistus também sofria a influencia da temperatura, com relação a sua capacidade de hidrolisar trealose. - Foi determinado que a atividade trealásica da hemolinfa de P. megistus era duplicada depois de submetida a aquecimento entre 50 e 60°C por 1 minuto. Este fato parece mostrar a presença de um agente inibitório que pode ter sido desnaturado sob a ação do calor. A atividade trealásica da hemolinfa se apresentou sensivelmente aumentada depois de aquecida a 52°, 55° e 60°C durante 1 minuto, conforme os resultados apresentados na Tabela I.

T A B E L A I

Efeito do aquecimento pr̄vio sobre a atividade treal̄sica da hemolinfa de P.megistus.

TEMPERATURA	MICROMOLES DE GLUCOSE LIBERADA/HORA
37º	0,321
52º	0,878
55º	0,764
60º	0,764

Sistema de reaçaõ

40 micromoles de tampãõ acetato, pH5,0; 2 micromoles de trealose e 0,02 ml de hemolinfa, num volume total de - 0,5ml. Foi incubado por 30 minutos a 37ºC e a glucose - liberada foi determinada pelo m̄todo da glucose-oxidase (Material e M̄todos).

Efeito do pH

O efeito do pH sobre a hidrõlise da trealose foi determinado usando tampãõ McIlvaine (ãcido c̄trico 0,1M e - Na₂HPO₄ 0,2M) em pHs 3,2; 3,6; 4,0; 4,6; 5,2; 5,8; 6,1; 6,9. Os resultados obtidos nãõ estãõ de acõrdo com os - encontrados por Friedman (50) que determinou ser em pH 5,6 que a trealase de hemolinfa de Phormia regina apresentava maior atividade. Com hemolinfa de P.megistus a

faixa de pH entre 3,2 e 5,8 mostrou-se ser onde havia maior atividade enzimática (Figura 1).

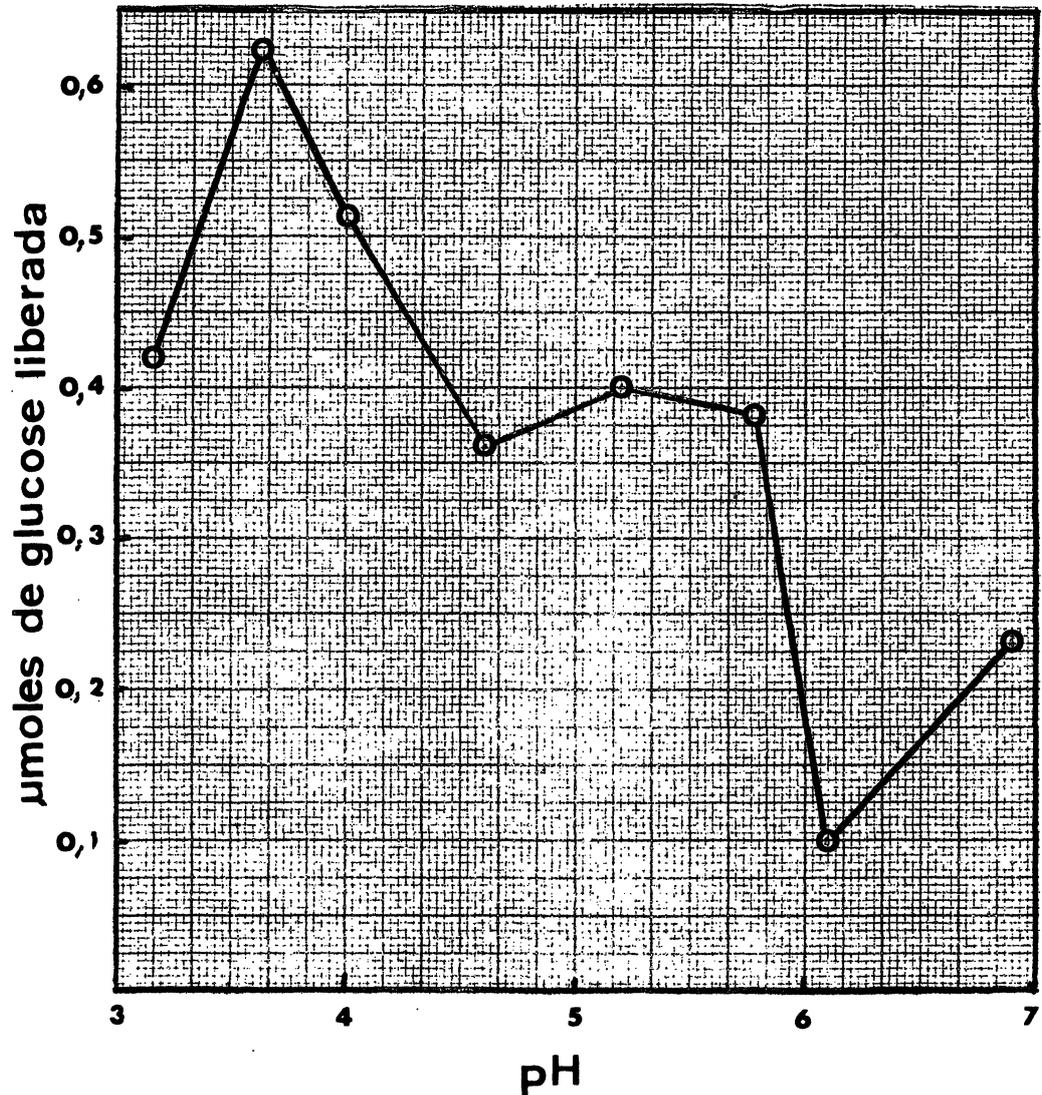


FIGURA 1: Efeito do pH sobre a atividade trealásica da hemolinfa de *P. megistus*. Mistura de reação: 40 micromoles de tampão, nos pHs acima indicados, 2 micromoles de trealose e 0,02ml de hemolinfa, num volume final de 0,5ml. Foi incubado por 60 minutos a 37°C e a glucose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (Material e Métodos).

Efeito do tempo de incubação

A influência do tempo de incubação nos ensaios para a verificação da atividade trealásica da hemolinfa de P.megistus foi determinada. O sistema de reação já descrito foi incubado a 37°C durante diferentes tempos (Tabela II) e foi eleito o tempo de 30 minutos, levando em consideração que nesse período a quantidade de trealose hidrolisada era suficiente para ser determinada, sem discrepâncias, pelos métodos usados.

T A B E L A I I

Efeito do tempo de incubação na atividade trealásica de hemolinfa de P.megistus.

TEMPO EM MINUTOS	MICROMOLES DE GLUCOSE LIBERADA	
	Hemolinfa sem aquecimento	Hemolinfa aquecida 1 minuto a 52°C
15	0,22	0,33
30	0,30	0,58
60	0,68	1,18

A mistura de reação foi a mesma descrita em Material e Métodos.

Efeito da concentração de hemolinfa

A quantidade de trealose hidrolisada pela trealase que contém na hemolinfa é proporcional à concentração desta última. Isto foi verificado na experiência representada na FIGURA 2, onde foram usados volumes de hemolinfa que variavam de 0,01 até 0,1 ml.

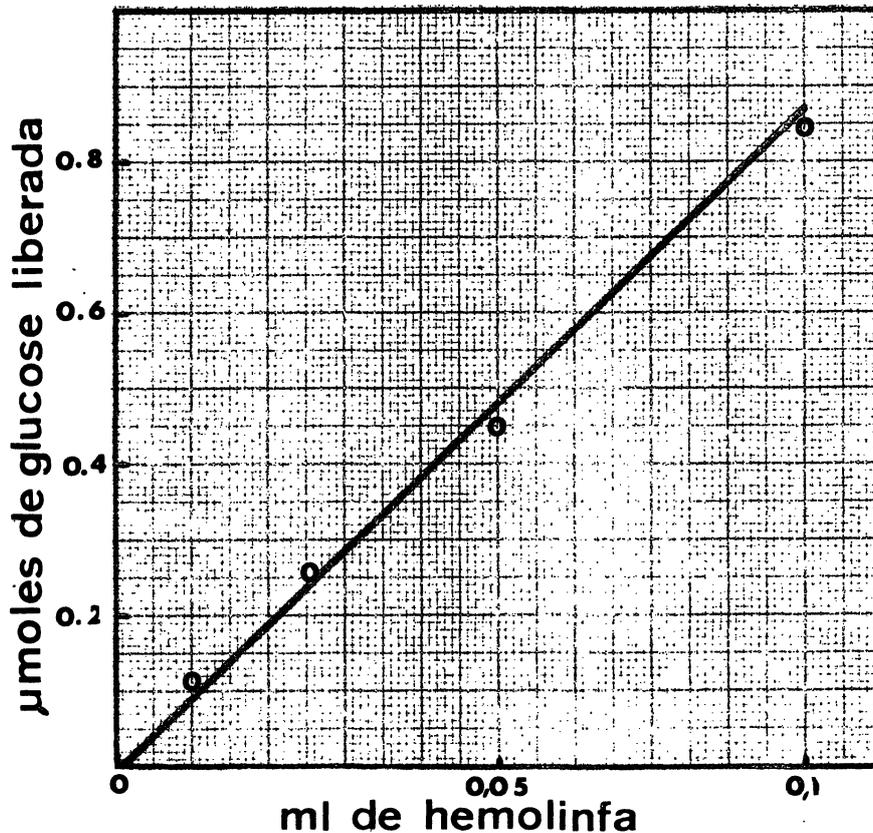


FIGURA 2: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOLINFA

Mistura de reação: 40 micromoles de tampão acetato - pH 5,0; 2 micromoles de trealose e quantidades acima indicadas de hemolinfa, num volume final de 0,05ml. Foi incubado por 30 minutos a 37°C e a glicose liberada foi determinada pelo método da glicose-oxidase (Material e Métodos).

Efeito da Concentração do Substrato

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade trealásica da hemolinfa de P. megistus foi determinado com hemolinfa pré-aquecida a 52°C. O efeito do pré-aquecimento da hemolinfa sobre sua atividade trealásica está mostrado e discutido na página 14.

A atividade trealásica da hemolinfa apresenta um comportamento cinético segundo Michaelis-Menten, com relação à variação da concentração de trealose. O valor de k_m obtido usando hemolinfa não purificada foi igual a $2,9 \times 10^{-4} M$ (FIGURA 3).

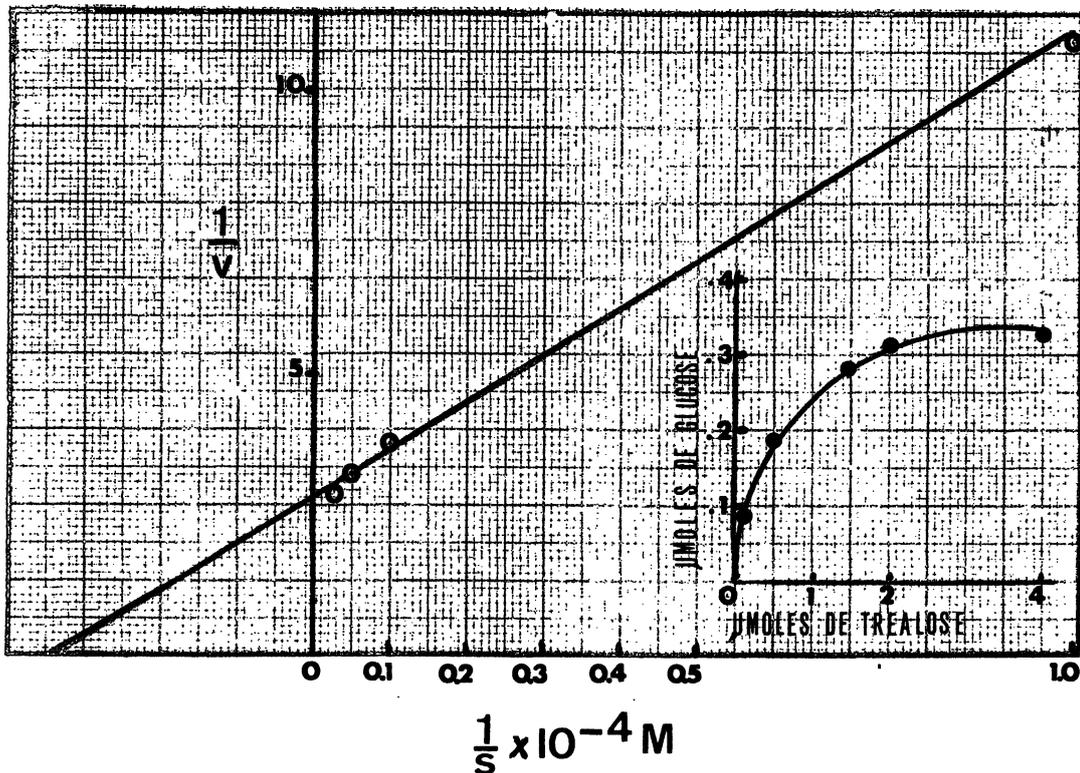


FIGURA 3: Representação de Lineweaver-Burk da relação entre a concentração de substrato e a atividade trealásica da hemolinfa de ninfas de 5º estágio de P. megistus. A mistura de reação foi a mesma descrita em Material e Métodos, variando as concentrações de trealose.

Efeito de reagentes inorgânicos sobre a atividade trealásica da hemolinfa

O efeito de alguns reagentes inorgânicos sobre a atividade trealásica da hemolinfa de P.megistus está resumido na TABELA III. A experiência mostra que somente o cloreto de cálcio e cloreto de magnésio provocaram inibição pouco significativa, enquanto que o cloreto de manganês e cloreto fêrrico apresentaram uma porcentagem muito baixa de inibição, menor que 2%. Cloreto de cobre e cloreto de cobalto não tem efeito algum sobre a atividade enzimática.

T A B E L A I I I

Efeito de alguns reagentes inorgânicos sobre a atividade trealásica de hemolinfa de P.megistus.

REAGENTES	ATIVIDADE %
Controle	100
MnCl ₂	98,3
CuCl ₂	100
CaCl ₂	93,2
MgCl ₂	94,9
CoCl ₂	100
FeCl ₃	98,3

Sistema de reação:

Dois (2) micromoles de tampão acetato, pH5,0; 2 micromoles de trealose; 0,005ml de hemolinfa, e os reagentes inorgânicos acima mencionado, num volume final de 0,05ml. Foi incubado por 30 minutos à 37°C e a glucose liberada foi determinada pelo método da glucose-oxidase (Material e Métodos).

TREALASE DO INSETO INTEIRO

Purificação da Enzima

Vários sistemas tem sido usados para a obtenção da trealase de insetos. Cada autor seleciona as técnicas que, praticamente, ajustam-se melhor às condições próprias - de trabalho, ao aparelhamento de que dispõe o laboratório e, principalmente, à fonte de enzima. Em Phormia regina (50) foi utilizado um sistema simples de purificação, acoplando fracionamento do extrato bruto com álcool e passagem da solução do precipitado por coluna de DEAE-celulose, Lefebvre e Huber(35) já usaram método mais sofisticados para purificar trealase de Apis mellifera, - como eletroforese de disco em gel de poliacrilamida, além de técnicas mais convencionais. Saito (33) passou a enzima simplesmente em uma coluna de DEAE-celulose, enquanto Guilloux, Courtois e Percheron (34) utilizaram - sulfato de amônio e gel de alumina.

Durante a execução do presente trabalho foram testados vários sistemas de purificação e o que se mostrou mais eficiente foi o que está apresentado na Tabela IV.

T A B E L A I V

Purificação da trealase de *P. megistus*

Frações	Unidades por ml	Unidades Totais	Proteínas mg/ml	Atividade específica	Purificação	Recuperação.
Extrato bruto	4,00	136,0	37,50	0,106	-	-
Coluna de DEAE Celulose	2,20	48,0	1,70	1,290	13	35%
Coluna de Sephadex G-100	1,22	39,8	0,13	9,380	88	30%

O diagrama representado na FIGURA 4 mostra o resultado da cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Os resultados obtidos são semelhantes aos de Saito (33), embora apresentasse um índice de purificação melhor que os obtidos por Lefebvre e Huber (35) e Duve (39).

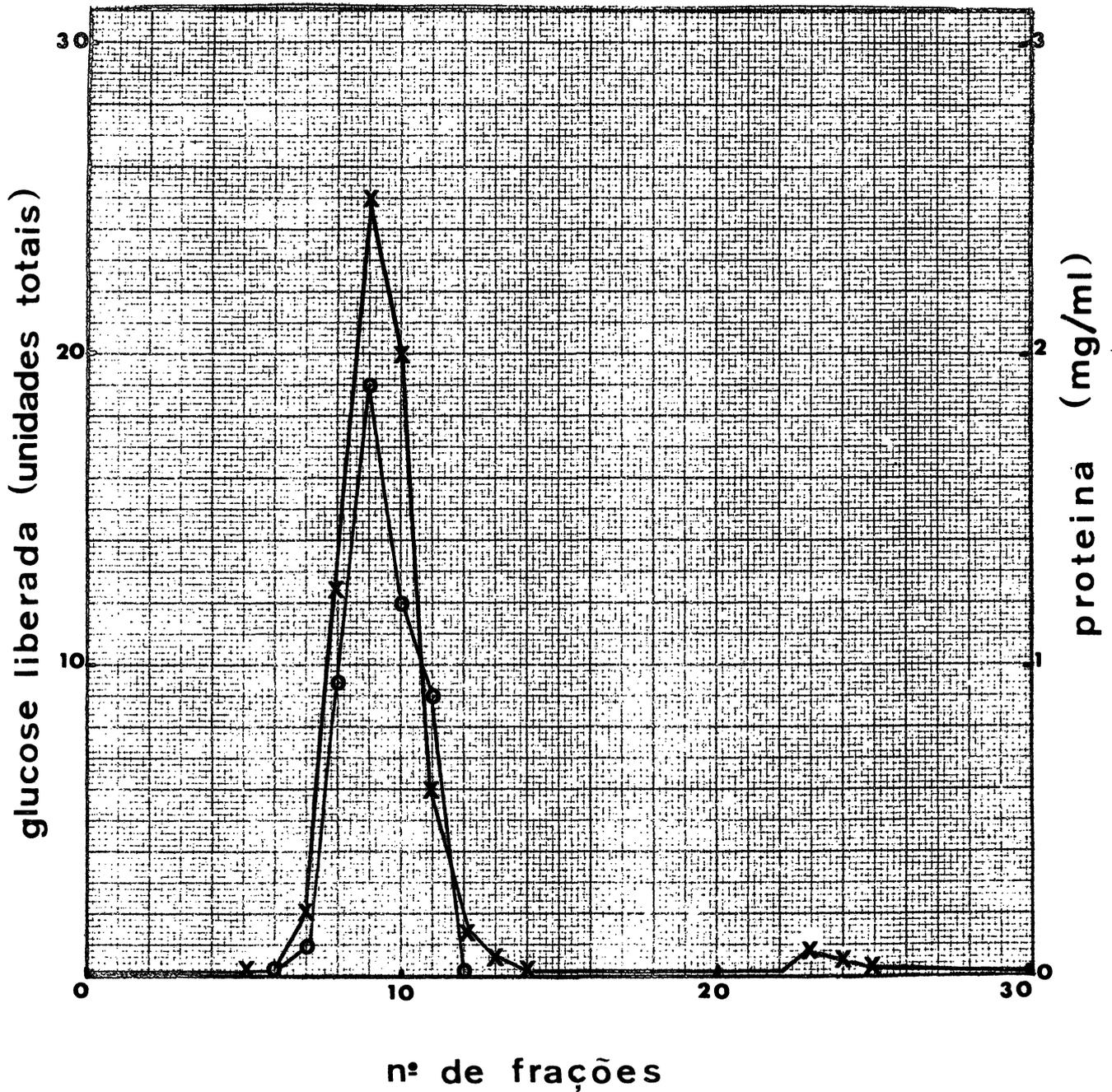


FIGURA 4: Coluna de DEAE - celulose

A mistura de reação foi a mesma descrita em Material Métodos, variando apenas a quantidade de enzima que foi de 0,05 ml.

As frações de maior atividade específica reunidas após a cromatografia em DEAE-celulose (12ml) foram concentradas até 1,62ml (Material e Métodos) e aplicadas em coluna de gel de Sephadex G-100, conforme foi descrito. Na FIGURA 5 estão mostrados os resultados obtidos, os quais estão de acordo com os de Lefebvre e Huber(35) para *Apis mellifera*.

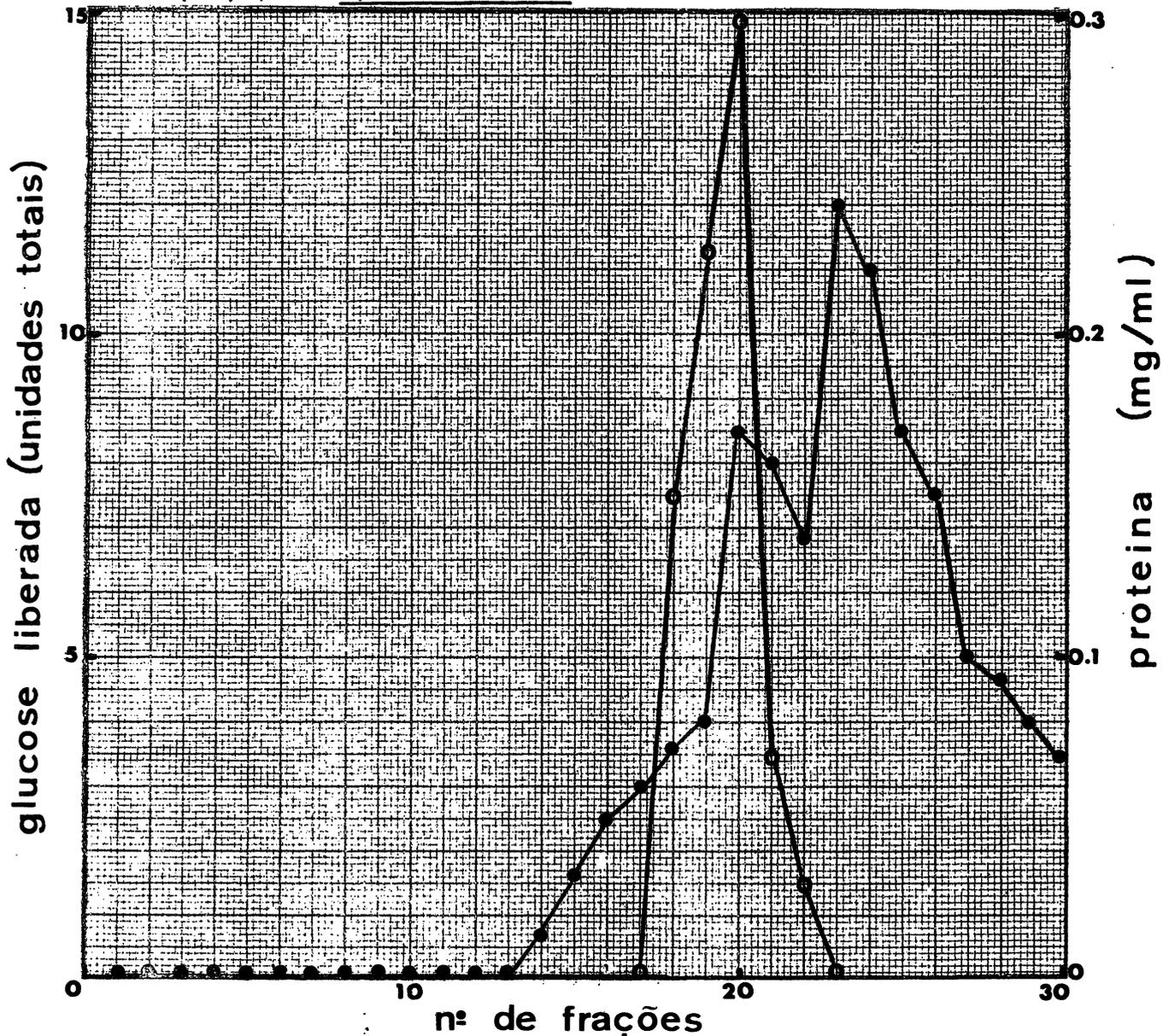


FIGURA 5: Coluna de SEPHADEX G-100

A mistura de incubação foi a mesma descrita em Material e métodos, variando apenas a quantidade de enzima que foi de 0,1 ml.

Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade da trealase de P.megistus foi verificado dentro da faixa de pHs compreendida entre 3,35 e 7,20, usando tampões citrato-fosfato de McIlvaine (0,1M ácido cítrico e 0,2M Na_2HPO_4) e acetato de sódio 0,2M.

A figura 6 mostra a forte dependência da atividade enzimática com a variação do pH de incubação. Máximas atividades foram obtidas quando o sistema de reação foi incubado em pHs em torno de 5,0.

O pH escolhido para o desenvolvimento das experiências apresentadas neste trabalho foi 5,0, o mesmo que foi utilizado nos trabalhos de Saito(33), Friedman(50) e Duve (39) para as enzimas extraídas de B.mori, P.regina e C.erythrocephala respectivamente, embora Lefebvre e Huber determinassem que o pH ótimo para a trealase de A.mellifera era de 6,5.

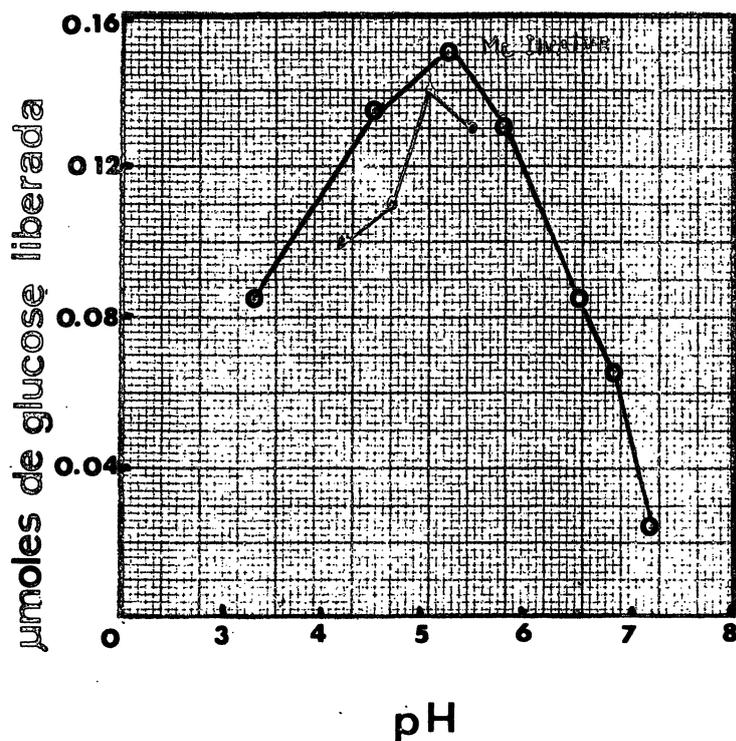


FIGURA 6: Efeito do pH. Mistura de reação: 10 microlitros de tampão McIlvaine ou 2 micromoles de tampão acetato nos pHs indicados; 2 micromoles de trealose e 0,02ml de enzima num volume final de 0,05ml. A mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C e a glucose liberada foi determinada pelo método de Somogyi -Nelson (Material e Métodos).

Efeito da temperatura de incubação

A reação catalisada pela trealase de P.megistus foi ensaiada em diferentes temperaturas e os resultados das experiências estão representados na FIGURA 7.

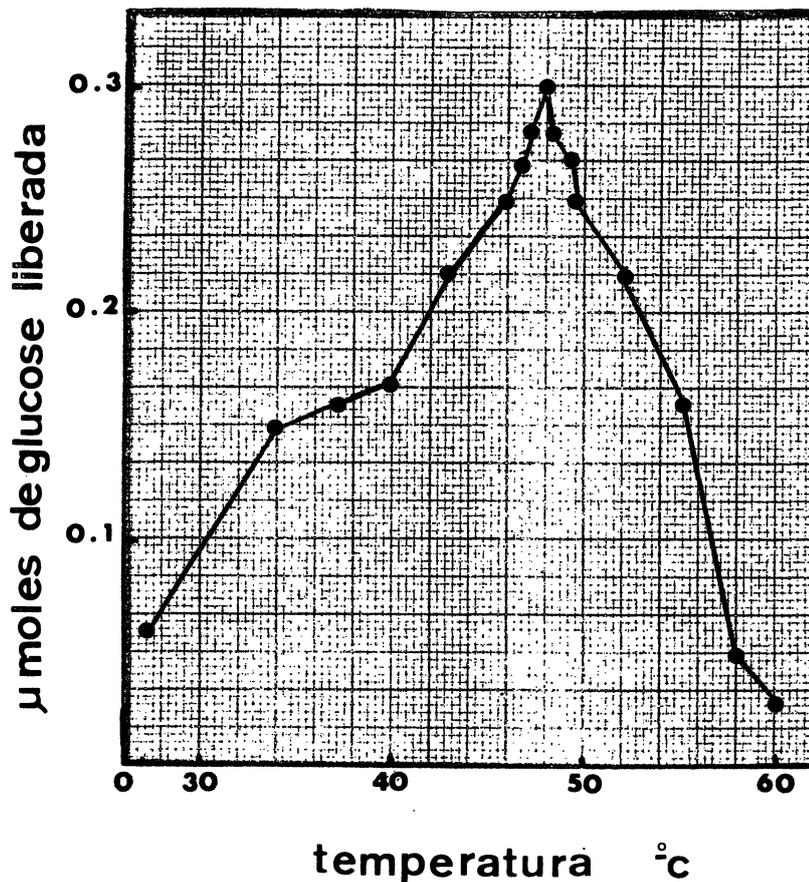


FIGURA 7: Efeito da temperatura de incubação

Mistura de reação: 2 micromoles de tampão acetato, pH 5,0; 2 micromoles de trealose e 0,02ml de enzima num volume final de 0,05 ml. A mistura foi incubada por 60 minutos nas diferentes temperaturas e a glucose liberada, foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (Material e métodos).

Proporcionalidade do tempo de incubação e concentração de enzima:

Nas condições de trabalho a quantidade de glucose liberada na reação é proporcional ao tempo de incubação e à concentração de enzima.

A linearidade da glucose liberada relativamente ao tempo de incubação e sua proporcionalidade relativa à concentração de enzima estão mostradas nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

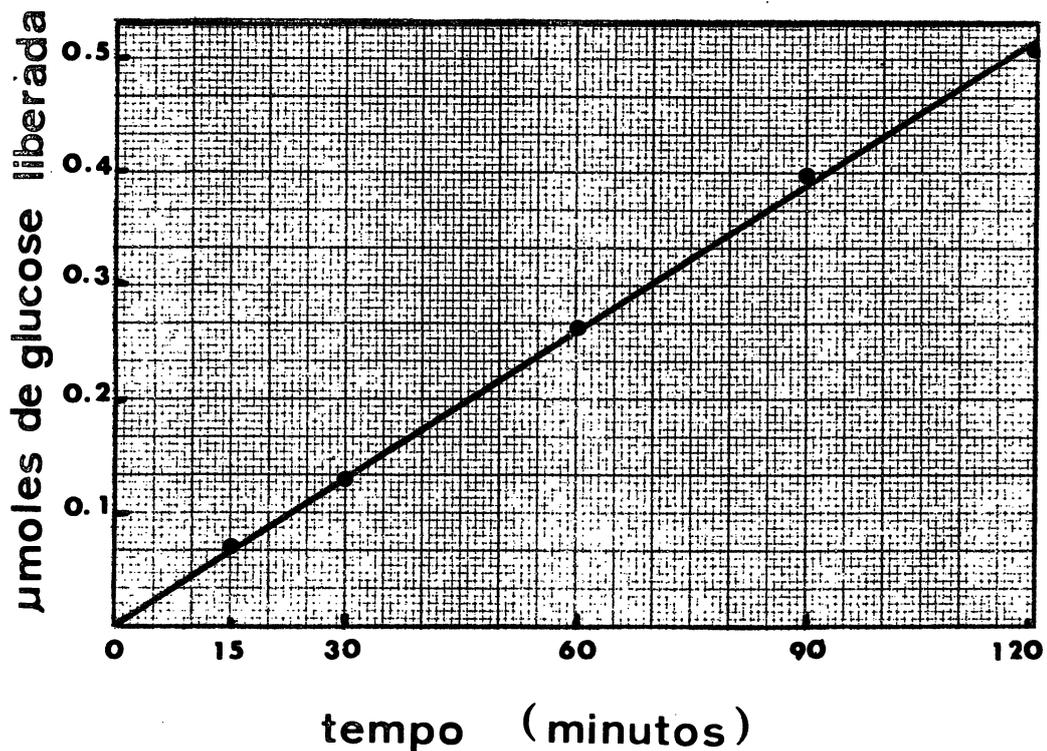


FIGURA 8: Linearidade da glucose liberada em função do tempo de incubação. Mistura de reação: 2 micromoles de tampão acetato pH 5,0; 2 micromoles de trealose e 0,02ml de enzima num volume final de 0,05ml. A mistura foi incubada nos diferentes tempos e a glucose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (Material e métodos).

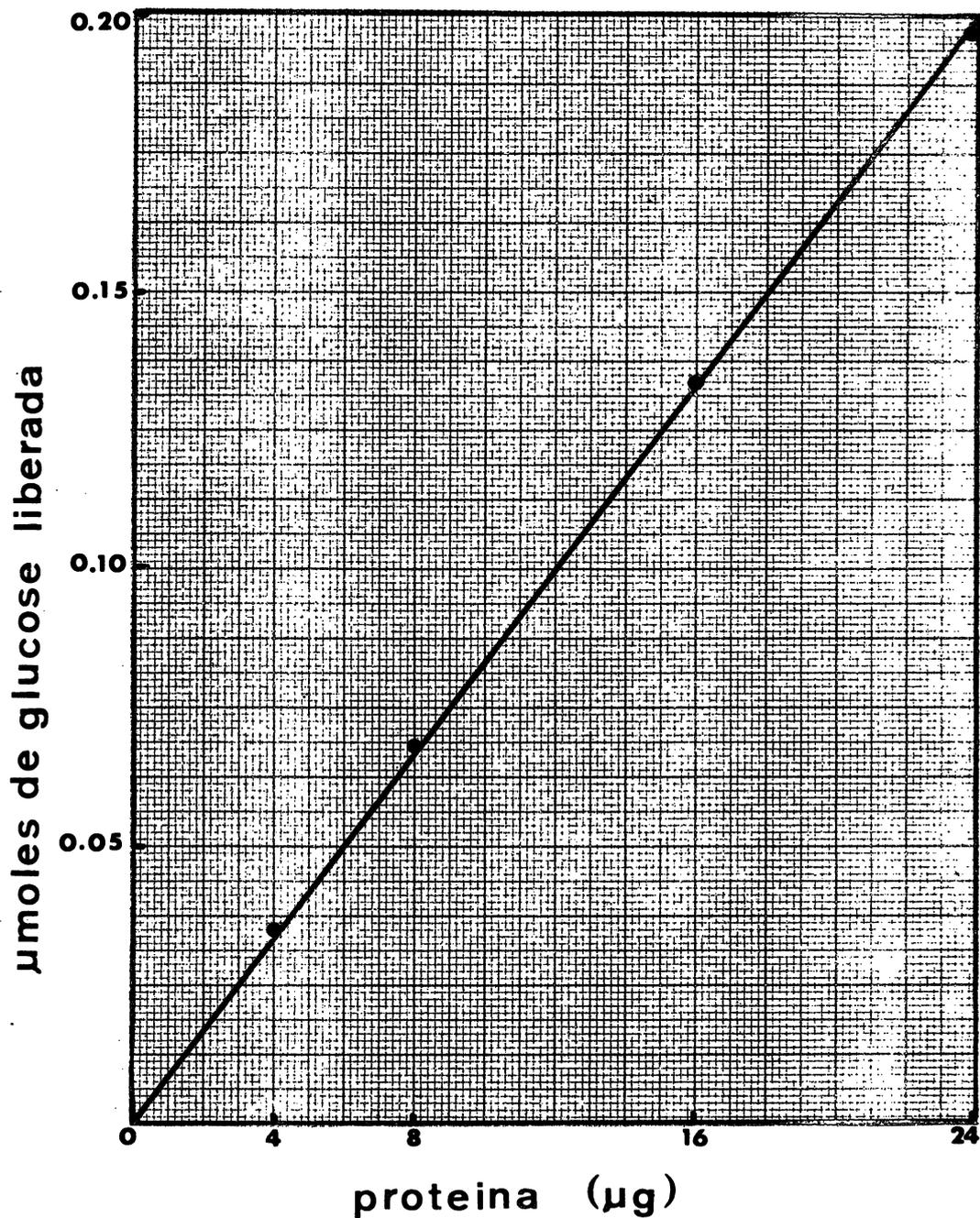


FIGURA 9: Proporcionalidade da glicose liberada em relação à concentração de enzima. Mistura de reação: 2 micromoles de tampão acetato pH 5,0; 2 micromoles de trealose e diferentes concentrações de enzima. A mistura foi incubada por 60 minutos e a glicose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (Material e Métodos).

Estequiometria da reação

Como está representada na figura 10, cada micromole de trealose produz dois micromoles de glucose. Os resultados obtidos indicam a presença de somente uma atividade hidrolítica para a trealose, eliminando-se a possibilidade de uma atividade fosforolítica.

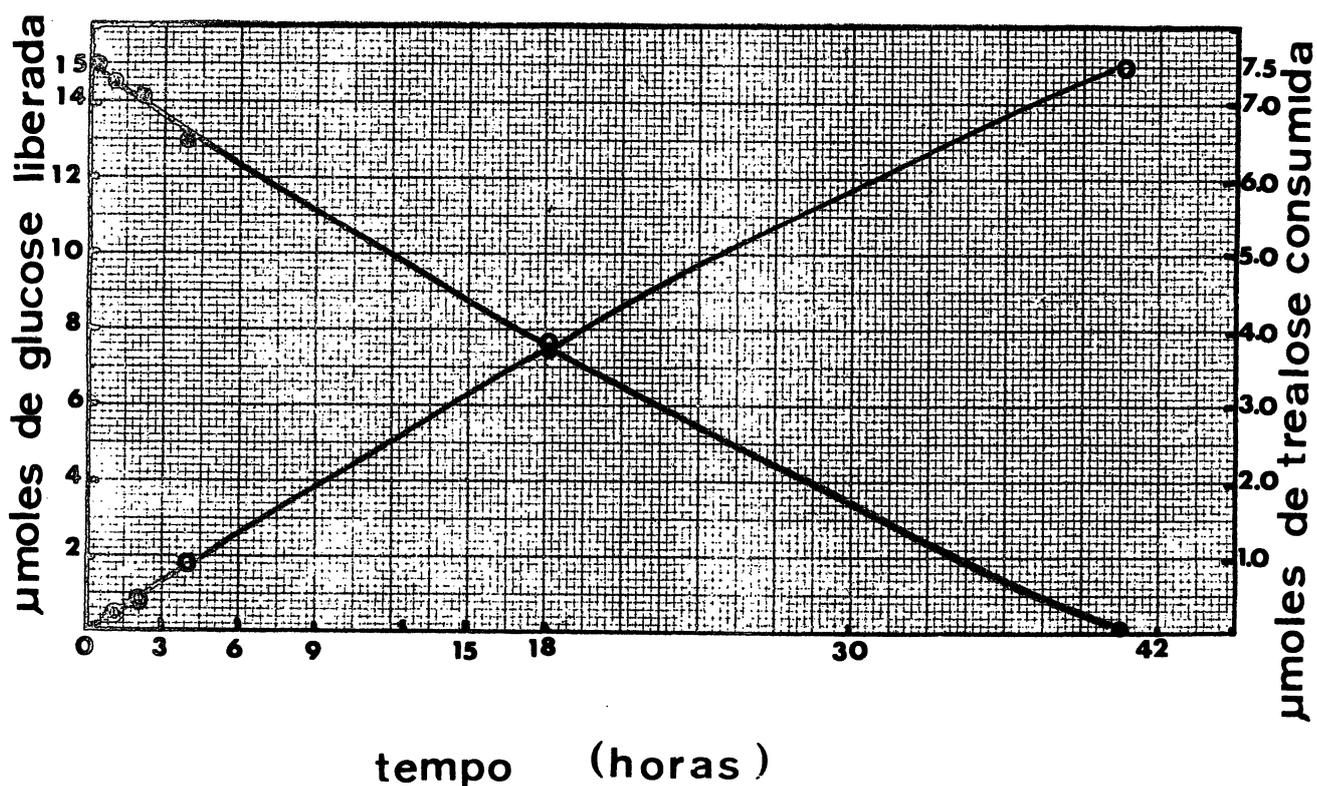


FIGURA 10: Estequiometria da reação catalisada pela trealase de *P. megistus*. A mistura de reação continha: 6 micromoles de tampão acetato pH5,0; 7,5 micromoles de trealose e 0,06ml de enzima, num volume final de 0,15ml. A mistura foi incubada a 37°C nos tempos indicados, e a glucose liberada, foi determinada em alíquotas - pelo método de Somogyi-Nelson (Material e Métodos). Os resultados foram referidos ao volume total de incubação.

Efeito de reagentes inorgânicos sobre a trealase de P.megistus

Dentre os sais ensaiados foi verificado que o Ca^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} e Fe^{+++} tem uma influencia negativa sobre a atividade enzimática da trealase de P.megistus, inclusive - bem maior do que a verificada quando a hemolinfa era en-
saiada, o que está mostrado na tabela V.

T A B E L A V

Efeito de cátions sobre a trealase de P.megistus

REAGENTES	% DE ATIVIDADE
Controle	100
MgCl_2	100
CoCl_2	100
MnCl_2	92
CaCl_2	79
CuCl_2	79
FeCl_3	63

Sistema de reação: 2 micromoles de tampão acetato pH - 5,0; 2 micromoles de trealose; 0,02ml de enzima, quantidades acima mencionadas de sais num volume total de 0,05ml. Foi incubado a 37°C por 1 hora e a glucose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson - (Material e Métodos).

Efeito da concentração do substrato

O efeito da concentração de substrato sobre a reação catalisada pela trealase de P.megistus foi ensaiada em pH 5,0. Foi obtida uma típica relação Michaelis-Menten e o valor de K_m encontrado foi $1,35 \times 10^{-3}$ M. O valor de K_m encontrado é diferente dos determinados por Saito (33) para B.mori ($4,7 \times 10^{-4}$ M), por Friedman (50) para P.regina ($6,7 \times 10^{-4}$ M) e por Lefebvre e Huber (35) para A.mellifera ($1,6 \times 10^{-4}$ M). Duve (39) achou um K_m da ordem de 10^{-3} M para trealase de Calliphora erythrocephala, que coincide com o K_m determinado neste trabalho. Na FIGURA 11 está mostrado o diagrama da representação gráfica da experiência em questão.

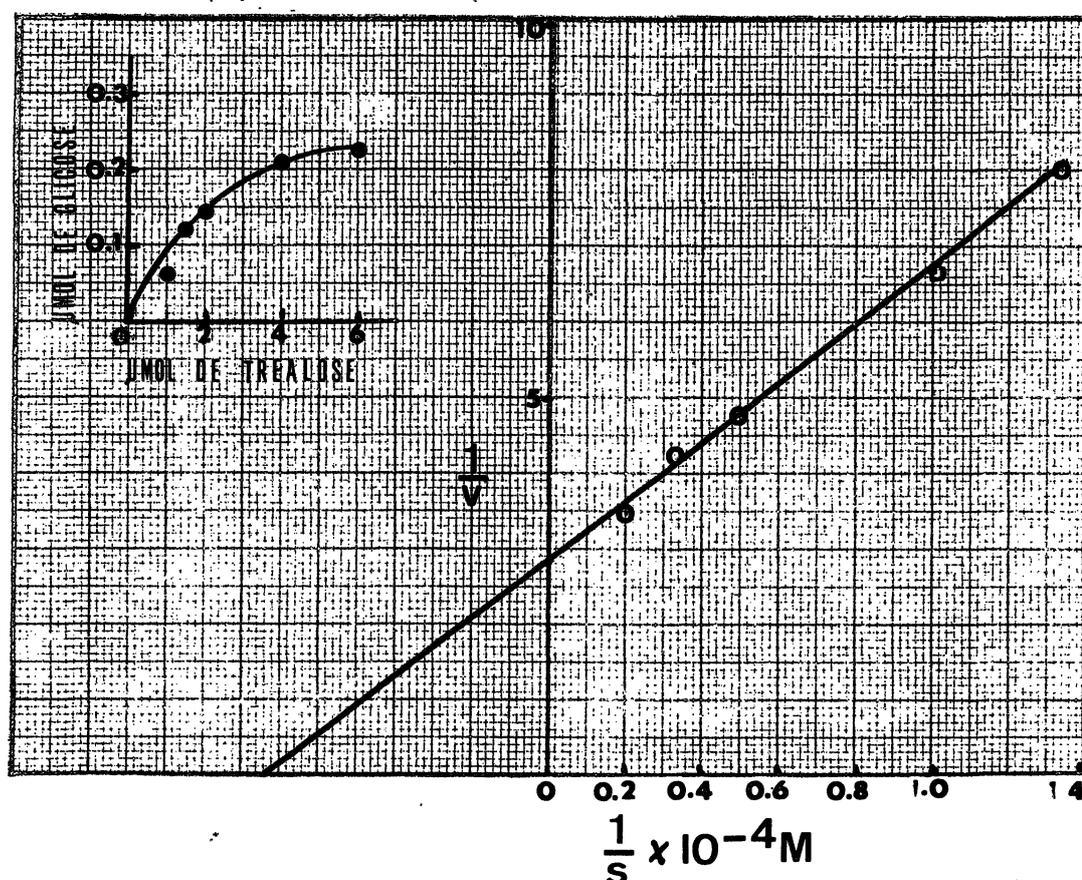


FIGURA 11: Representação de Lineweaver e Burk da relação entre a concentração de substrato e a atividade trealásica de P.megistus. A mistura de reação foi a mesma descrita em Material e Métodos.

Especificidade da enzima pelo substrato

Dos substratos ensaiados para a verificação da especificidade da trealase de P. megistus somente a trealose mostrou atividade. Sob as condições normais de trabalho não foi possível constatar a hidrólise de Celobiose, Maltose, Sacarose, Lactose, Turanose e Rafinose. - Todos em concentrações iguais à da trealose (20mM). Estes resultados são similares aos obtidos por Friedman para P. regina (50). Lefebvre e Huber (35) determinaram em suas preparações presença de atividade de sacarase, a qual era difícil de separar da atividade trealásica.

Estabilidade da Enzima

A trealase de P. megistus mesmo depois de purificada, - mantém-se por pelo menos 3 meses sem perda sensível de sua atividade, quando estocada a - 15°C. A enzima suporta o congelamento e descongelamento sem modificar sua atividade.

Estimativa do peso molecular

O peso molecular da trealase de P. megistus foi estimado ser em torno de 60.000, usando coluna de Sephadex G-100, tomando por base os padrões de proteínas utilizados. (Material e Métodos).

O peso molecular estimado para a enzima de P. megistus - (Figura 12), corresponde aos encontrados para P. regina (49) e Blaberus discoidalis (60). As trealases isoladas de Drosophila melanogaster (36), Apis mellifera (35,43) e Melolontha vulgaris (34) apresentaram um peso molecular em torno de 100.000.

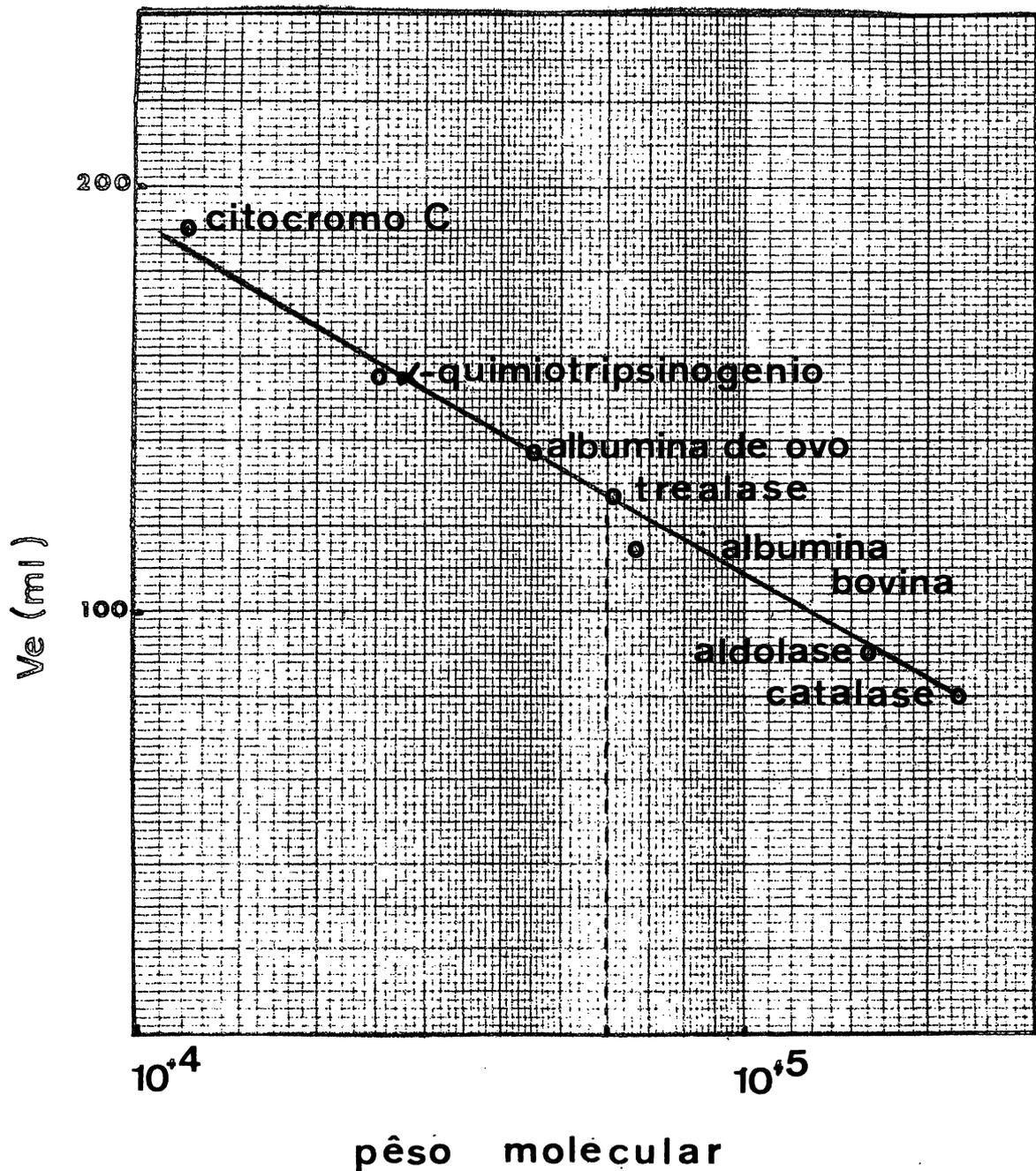


FIGURA 12: Pêso molecular da trealase de P.megistus determinado em coluna de Sephadex G-100, com 2,5 cm de diâmetro por 65cm de altura. O volume da amostra foi de 5ml. A enzima foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH6,0. O fluxo do eluente foi de 5 gotas por minuto.

Estudo termodinâmico da reação

Dois fatores concorrem para a caracterização da temperatura ótima (T_0) da enzima: à temperaturas maiores do que a T_0 , o coeficiente de inativação térmica é maior' que a taxa de incremento de velocidade. Abaixo da T_0 - prevalece a taxa de incremento de velocidade (74). Deve ser ressaltado que se entende por "taxa de incremento de velocidade" uma combinação de dois fatores: a energia de ativação propriamente dita, e o aumento da velocidade.

A FIGURA 13 mostra que, aplicando-se a equação de Arrhenius para as duas fases de reação, isto é, ativação e inativação térmica, fica evidente que o ponto de intersecção das duas retas deve indicar a temperatura ótima da reação. Esta temperatura obtida assim como sugerida, mostrou um valor de aproximadamente 46°C, ou seja, com um desvio de 10% da obtida experimentalmente - pelo outro método. Esta diferença pode sugerir uma idéia quantitativa da consistência das retas obtidas, e - por conseguinte, dos parâmetros determinados.

A energia de ativação E^* , calculada a partir do coeficiente angular da reta, ou seja $-E^*/2,3R$, é aproximadamente 30 kcal/mol. Em geral, segundo Sizer (72), a energia de ativação oscila entre 40 e 100 kcal/mol, existindo porém valores mais baixos, como por exemplo, 5 kcal/mol (75).

A entalpia ΔH^* pode ser calculada em várias temperaturas, enquanto E^* permanece constante. Para alguns trabalhos relacionados com a trealase de insetos, foram calculados alguns parâmetros termodinâmicos, para os quais seria interessante uma confrontação: para a trealase de Bombyx mori (33), E^* foi estimada em aproximadamente - 9,4 kcal/mol, para uma preparação enzimática e de 9,7 - kcal/mol para outra preparação. Para trealase de Blabe-

rus discoidalis, a energia de ativação foi calculada - como 15 kcal/mol e apresentou aparentemente a mesma temperatura de transição, ou seja 42°C (60).

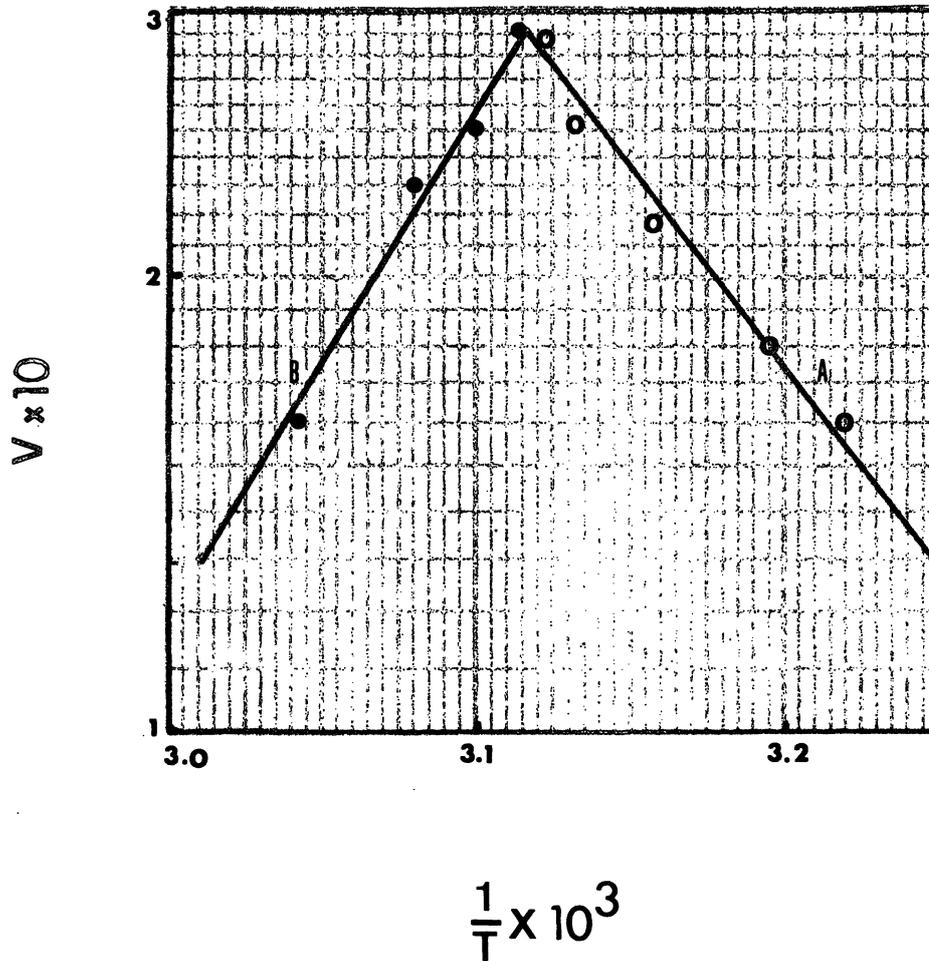


FIGURA 13: A figura acima mostra um "plot" de Arrhenius, para a hidrólise enzimática da trealose, onde T é a temperatura absoluta (°K), V a velocidade de reação em micromoles de glucose/hora. A curva A (-o-o-) representa a ativação da enzima, e a curva B (-●-●-●) se refere à fase de desnaturação.

O Q_{10} da reação, extraído de valores de velocidades tomadas em duas temperaturas diferentes segundo a relação:

$$Q_{10} = \frac{v_{(t+10)}}{v_t}$$

é estimado como sendo 1,6. É bastante coerente para reações enzimáticas, para as quais este valor oscila em torno de 2 (72).

Com respeito aos resultados apresentados, devem ser ressaltados os seguintes pontos: a preparação enzimática não homogênea, não apresenta concomitantes que possam interferir com a reação principal. Segundo Smith (76), a reta obtida segundo Arrhenius, sem pontos de descontinuidade, ou seja, alterações na sua inclinação, indica a não existência de reações paralelas que possam alterar a velocidade da reação.

S U M Á R I OHemolinfa

A atividade trealásica da hemolinfa de ninfa de 5º estágio de P. megistus foi determinada e se apresentou sensivelmente aumentada depois de aquecida a 52°C durante 1 minuto. Apresenta um máximo de atividade numa faixa de pH entre 3,2 e 5,8. O valor de Km encontrado para a reação foi da ordem de $2,9 \times 10^{-4}$ M. CaCl_2 e MgCl_2 provocam uma inibição pouco significativa, em sua atividade trealásica.

Inseto Inteiro.

Trealase foi purificada cerca de 88 vezes a partir de homogenados de P. megistus cromatografando o Extrato Bruto dialisado em coluna de DEAE-celulose. As frações ativas foram juntadas, concentradas com Carbowax e passadas em coluna de Sephadex G-100. As frações de maior atividade foram utilizadas para determinação das propriedades da enzima. Máximas atividades foram obtidas quando o sistema de reação foi incubado em pHs em torno de 5,0.

Nas condições de trabalho a quantidade de glucose liberada na reação foi sempre proporcional ao tempo de incubação e à concentração de enzima. Foi determinada a estequiometria da reação: cada micromole de trealose produziu dois micromoles de glucose.

Foi verificado que Ca^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} e Fe^{+++} tem influência negativa sobre a atividade enzimática.

Dentre os substratos ensaiados, o único hidrolisado pela enzima foi trealose. O valor de Km encontrado foi $1,35 \times 10^{-3}$ M. A trealase de P. megistus se mostrou está

vel quando aquecida até 54°C por 1 hora; em temperaturas mais elevadas começa a sofrer desnaturação pelo calor, o que ocorre a 60°C. A enzima manteve-se ativa por mais de 10 meses, quando estocada a -15°C. A energia de ativação para a reação da trealase foi determinada ser de 30 kcal/mol. Seu peso molecular foi estimado ser em torno de 60.000, em coluna de Sephadex G-100.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e à Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas pela ajuda financeira, processos nº12.558/71, 9.373/68, 12.436/73, 12.775/74 e 7.100/75 SIP/08/056.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Economico, projeto FUNTEC - 179.

Aos companheiros de laboratório que de uma forma ou de outra colaboraram durante a realização desta tese.

Ao Dr. Luis Ramón Marechal pela eficiente orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Sr. Nereu J.M. de Souza pelo relevante auxílio prestado quando da realização dos estudos cinéticos da reação.

De modo especial, ao Dr. Luis Alberto Veiga pela orientação da presente tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. - BERTHELOT, M.(1858a), C.r.Sēanc.Soc.Biol. 2 Sēr., 4:112-115 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol.,4: 287-346, 1967.
2. - BERTHELOT, M.(1858b), C.r.Sēanc.Acad.Sci., Paris, 46: 1276 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
3. - BERTHELOT, M.(1859), Annls.Chim.Phys. Sēr. 3, 55: 269-296 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
4. - GUIBOURT, N.J.B.G.(1858), C.r.hebd.Sēanc.Acad.Sci., Paris, 46: 1213-1217 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
5. - HANBURY, D.(1859), J.Proc.Linn.Soc.Zool., 3:178-183 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol. 4: 287-346, 1967.
6. - WIGGERS, H.A.L.(1832), Justus Liebigs Annls.Chem., 1: 129-182 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
7. - MITSCHERLICH, (1858), J.Prakt.Chem.(I), 73: 65-70 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.

8. - LEIBOWITZ, J., Nature, Lond. 152: 414, 1943.
9. - LEIBOWITZ, J., Biochem.J., 38: 205-206, 1944.
10. - WYATT, G.R. e KALF, G.F., Fedn.Proc.Fedn.Am.Soc.Exp.Biol., 15: 388 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect. Physiol., 4: 287-346, 1967.
11. - WYATT, G.R. e KALF, G.F., J.Gen.Physiol., 40: 833-847, 1957.
12. - HOWDEN, G.F. e KILBY, B.A., Chem.Ind., 1453-1454, 1956.
13. - EVANS, D.R. e DETHIER, V.G., J.Insect Physiol., 1: 3-17, 1957.
14. - WYATT, G.R., Adv.Insect Physiol., 4: 237-360, 1967.
15. - MOCHNACKA, I. e PETRYSZYN, C.(1959), Acta Biochim.Pol., 6: 307-311 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
16. - BARLOW, J.S. e HOUSE, H.L., J.Insect Physiol., 5: 181-189, 1960.
17. - DUTRIEU, J., C.r.hebd.Sëanc.Acad., Paris, 252: 347-349 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.

18. - CROMPTON, M. e BIRT, L.M., J.Insect Physiol., 13: 1575-1592, 1967.
19. - WIMER, L.T., Comp.Biochem Physiol., 29: 1055-1062, 1969.
20. - LEADER, J.P. e BEDFORD, J.J., Comp.Biochem.Physiol., 43: 233-235, 1972.
21. - RANDALL, D.D. e DERR, R.F., J.Insect Physiol., 1:329-335, 1965.
22. - BUCHER, T. e KLINGENBERG, M.(1958), Angew.Chem., 70: 552-570 apud Sacktor, B. Biochemistry of Insect Flight. In Candy, D.J. e Kilby, B.A. Insect Biochemistry and Function. London, Chapman and Hall, 3-76, 1975,
23. - POLACEK, I. e KUBISTA, V.(1960), Physiol.Bohemoslov., 9: 228-234 apud Sacktor, B. Biochemistry of Insect Flight. In Candy, D.J. e Kilby, B.A. Insect Biochemistry and Function. London, Chapman and Hall, 3-76, 1975,
24. - CLLEG, J.S. e EVANS, D.R., J.Exp.Biol., 38: 771-792, 1961.
25. - SACKTOR, B. e WORMSER -SHAVIT, E., J.Biol.Chem., 241: 624-631, 1966.
26. - SRIVASTAVA, P.N. e ROCKSTEIN, M., J.Insect Physiol., 15: 1181-1186, 1969.
27. - FAIRBAIN, D. e PASSEY, R.(1957), Expl.Parasit., 6: 566-574 apud Wyatt, G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.

28. - FAIRBAIN, D., Can.J.Zool., 36: 787-795, 1958.
29. - MYRBACK, K.(1949), Ergebn.Enzymforsch., 10:168-190 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
30. - KANDLER, O. e SENSER; M.(1965), Z.Pflanzenphysiol., 53: 157-161 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
31. - FREREJACQUE, M.(1941), C.r.Sêanc.Soc.Biol., 213: 88-90 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
32. - KALF, G.F. e RIEDER, S.V., J.Biol.Chem., 230: 691-698, 1958.
33. - SAITO, S., J.Biochem., 48: 101-109, 1960.
34. - GUILLOUX, E., COURTOIS, J. e PERCHERON, F., Bull.Soc. Chem.Biol., 50: 1915-1931, 1968.
35. - LEFEBVRE, Y.A. e HUBER, R.E., Archs.Biochem.Biophys., 140: 514-518, 1970.
36. - HUBER, R.E. e LEFEBVRE, Y.A., Can.J.Biochem., 49: 1155-1164, 1971.
37. - GUSSIN, A.E.S. e WYATT, G.R., Am.Zool., 4: 19, 1964.

38. - GUSSIN, A.E.S. e WYATT, G.G., Arch.Biochem.Biophys., 112: 626-634, 1965.
39. - DUVE, H., Insect Biochem., 2: 445-450, 1972.
40. - DUVE, H., Insect Biochem., 5: 299-311, 1975.
41. - DUSPIVA, F.(1954), Verh.dt.Zool.Ges.,Tübingen.,440-447 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
42. - PETRYSZYN, C. e SZARKOWSKA, L.(1959), Bull.Acad.Pol.Sci. cl II, Ser.Sci.Biol., 7: 491-493 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
43. - TALBOT, B.G. e HUBER, R.E., Insect Biochem., 5: 337-347, 1975.
44. - VEIGA, L.A., CHANDELIER, E.L., GAIDUS, A.B. e MELLO, N.M. F., Arq.Biol., 16: 101-110, 1973.
45. - EHRARDT, P.(1962), Z.Vergl.Physiol., 46: 169-211 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
46. - ZEBE, E.C. e McSHAN, W.H., J.Cell.Comp.Physiol., 53: 21-30, 1959.
47. - DERR, R.F. e RANDALL, D.D., J.Insect Physiol., 12: 1105-1114, 1966.

48. - EVANS, W.A.L. e PAYNE, D.W., Insect Physiol., 10: 657-674, 1964.
49. - FRIEDMAN, S., Insect Biochem., 5: 151-164, 1975.
50. - FRIEDMAN, S., Archs.Biochem.Biophys., 87: 252-258, 1960.
51. - FRIEDMAN, S., Archs.Biochem.Biophys., 93: 550-554, 1961.
52. - DUCHÂTEAU-BOSSON, JÉNIAUX, G. e FLORKIN, M., Archs.Int. Physiol.Biochim., 71: 566-576, 1963.
53. - FLORKIN, M., Archs.Int.Physiol., 45: 17-31, 1937.
54. - FLORKIN, M. e JEUNIAUX, C.H.(1965), Bull.Acad.r.Belg.cl. Sci., 51: 541-552 apud Wyatt,G.R. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. Adv.Insect Physiol., 4: 287-346, 1967.
55. - CHANG, C.K., LIU, F. e FENG, H., Acta Ent.Sin., 13: 494-502, 1964.
56. - LIU, F. e FENG, H., Acta Ent.Sin., 14: 432-440, 1965.
57. - SACKTOR, B., J.Biophys.Biochem.Cytol., 1: 29-46, 1955.
58. - HANSEN, K.(1966), Biochem.Z., 344: 15-25 apud Sacktor, B. Biochemistry of Insect Flight. In Candy,D.J. e Kilby, B.A. Insect Biochemistry and Function. London, Chapman and Hall, 3-76, 1975.

59. - REED, W.D. e SACKTOR, B., Arch.Biochem.Biophys., 145: 392-401, 1971.
60. - GILBY, A.R., WYATT, S.S. e WYATT, G.R., Acta Biochim.Poln., 14: 83-100, 1967.
61. - FRIEDMAN, S. e ALEXANDER, S., Biochem.Biophys.Res.Comm., 42: 818-823, 1971.
62. - CLEMENTS, A.N., PAGE, J., BORCK, K. e VAN OUYEN, A.J.J., J.Insect Physiol., 16: 1389-1404, 1970.
63. - STEVENSON, E., J.Insect Physiol., 14: 179-198, 1968.
64. - VAUGHAN, H., THORTON, S.D. e NEWHOLME, E.A., Biochem.J., 132: 527-535, 1973.
65. - HUGGET, A.st.G. e NIXON, D.A., Biochem.J., 66: 12, 1957.
66. - SOLS, A., De LA FUENTE, G., VILLAR PALASI, C. e ASENSIO, C., Biochem.Biophys.Acta., 30: 92, 1958.
67. - SOMOGYI, M., J.Biol.Chem., 160: 69, 1945.
68. - NELSON, N., J.Biol.Chem., 153: 375, 1964.
69. - CAPUTTO, R., LELOIR, L.F., TRUCCO, R.E., Enzymologia., 12: 350, 1948.
70. - SOBER, H.A., GUTTER, J.F., WYCKFF, M. e PETERSON, E.A., J.Am.Chem.Soc., 78: 756, 1965.

71. - LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J.,
J.Biol.Chem., 193: 265, 1951.
72. - SIZER, I.W., Adv.Enzymol., 3: 35-62, 1943.
73. - DAWES, E.A., Quantitative Problems in Biochemistry 2ª ed.
Edinburgh, E. e Livingstone, S., 105-107, 1962.
74. - DIXON, M. e WEBB, E.C. Enzymes. 2ª ed. New York, Academic,
145-166, 1964.
75. - SETLOW, R.B. e POLLARD, E. Molecular Biophysics London,
Pergamon, 239-265, 1962.
76. - SMITH, J.M. Kinetics; theoretical studies of Reaction Rate:
In Chemical Engineering Kinetics. Tokio Kogayusha, 81-
86, 1956.
77. - GUTFREUND, H., An Introduction to the Studie of Enzymes.
Oxford, Blackwell, 12-71, 1965.