

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEINASA DIGESTIVA PROVENIENTE DE LA BROCA DEL CAFÉ (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

Diana Patricia Preciado-Rodríguez*; Álex Enrique Bustillo-Pardey**; Arnubio Valencia-Jiménez***

RESUMEN

PRECIADO R., D. P.; BUSTILLO P., A. E.; VALENCIA J., A. Caracterización parcial de una proteínasa digestiva proveniente de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). *Cenicafé* 51(1): 20-27. 2000.

Se determinó el medio de extracción, el pH, la temperatura óptima de actividad, el perfil isoenzimático y el tipo de proteínasa presente en el tracto digestivo del insecto, para lo cual se prepararon diferentes extractos de brocas adultas. Para medir el pH óptimo se utilizaron soluciones amortiguadoras de pH (1,5 – 4,5). La temperatura óptima de actividad se analizó entre 30 y 70°C. El tipo de proteínasa digestiva se determinó utilizando Pepstatin A como un inhibidor específico. El perfil isoenzimático se realizó en geles nativos del 16%. Los resultados mostraron que el mejor medio de extracción es el buffer Citrato pH: 3,0; los valores de pH y de temperatura óptima fueron de 3,0 y 40°C, respectivamente. Esta proteínasa encontrada en el fluido digestivo de *H. hampei* corresponde a una aspártico del tipo Cathepsin D. En el zimograma se encontraron al menos tres bandas de actividad proteolítica bien definidas, dos de las cuales están presentes tanto en intestinos como en adultos completos del insecto. Un conocimiento detallado sobre la actividad de éstas enzimas facilitará la selección y evaluación de diferentes inhibidores que pueden ser utilizados en el diseño y desarrollo de estrategias para el control de *Hypothenemus hampei*.

Palabras claves: *Hypothenemus hampei*, broca del café, enzimas, café.

ABSTRACT

Different extraction solutions were evaluated in order to determine the best extraction medium, pH and optimal temperature for activity, the isoenzymatic profile, and the proteinase type present in the digestive tract of coffee berry borers. Determination of optimal pH was assayed in buffer solutions (pH 1,5 - 4,5). The optimal temperature for activity was evaluated between 30 and 70°C. Proteinase type was determined by using Pestatin A as specific inhibitor. The isoenzymatic profile was run in 16% native gels. Results showed that the best extraction solution was citrate buffer, pH 3,0, and that optimal pH and temperature were 3,0 and 40°C. The proteinase in *H. hampei* was determined to be an aspartic protease Cathepsin D type. The zimogram showed three well-defined proteolytic activity bands, two of which are present, both in guts and in whole adult insects. A clear knowledge of the activity of these enzymes will help in the selection and evaluation of different inhibitors that could be used to produce coffee materials resistant to *H. hampei*.

Keywords: *Hypothenemus hampei*, coffee berry borer, enzymes, coffee.

* Licenciada en Biología y Química. Universidad de Caldas

** Investigador Principal I. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Profesor Asociado. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas. Manizales, Caldas, Colombia.

Las proteasas digestivas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos y se encuentran en abundancia en la región del intestino medio de los insectos. Estas enzimas están subdivididas en proteinasas, definidas como endo-peptidasas que cortan cadenas de proteínas en sitios específicos y las exo-peptidasas, las cuales remueven aminoácidos desde los lados carboxi ó amino terminal (15). Adicionalmente, se encuentran clasificadas en cuatro categorías de acuerdo al tipo de residuo catalítico esencial presente en el sitio activo: serín proteinasa (EC 3.4.21), cisteín proteinasa (EC 3.4.22), aspártico proteinasa (EC 3.4.23) y metaloproteinasa (EC 3.4.24) (6).

Los insectos al igual que otros organismos, utilizan proteinasas para la digestión de las proteínas que ingieren con el alimento (34). Por mucho tiempo se pensó que los insectos y los vertebrados contenían exclusivamente serín proteinasas tipo tripsina y quimotripsina, y aspártico proteinasas tipo pepsina (22). El tipo al cual pertenece una proteinasa específica se determina por el rango de pH de actividad, por su similitud con proteinasas plenamente caracterizadas y por su sensibilidad ó susceptibilidad a diferentes inhibidores (24). Diferentes tipos de proteinasas han sido aisladas del sistema digestivo de los insectos y al caracterizarlas han resultado, en general, similares en su comportamiento catalítico a las encontradas en vertebrados (6, 1); sin embargo, algunas proteinasas presentan diferencias notables en sus características más importantes tales como en su localización, el pH óptimo de actividad, las constantes cinéticas y la termoestabilidad, entre otras (6).

Buena parte de la investigación se ha desarrollado con insectos de los órdenes Lepidoptera y Diptera, los cuales usualmente utilizan proteinasas tipo serín durante la digestión de proteínas. Estos insectos poseen intestinos medios, que proporcionan pH alcalino, con óptimos entre 8 y 11,5 (15). Estudios más recientes mostraron que en los intestinos de insectos están

presentes otras clases de proteinasas (33, 11); estas incluyen proteinasas del tipo cisteín (tiol), que contienen un residuo esencial de cisteína involucrado en la formación del complejo enzima-sustrato (7), las aspártico proteinasas con dos residuos aspártico en su centro activo (3, 4), y las metaloproteinasa que contienen iones metálicos (usualmente zinc) en su centro activo (6).

Algunos insectos que usan cisteín proteinasas, incluyendo muchos del orden Coleoptera (23), tienden a tener intestinos medios con un pH en el rango ligeramente ácido, entre 5 y 7, mientras que las aspártico proteinasas a menudo encontradas en combinación con otras proteinasas son activas en el rango de pH ácido, normalmente inferior a 4,5 (15).

El uso de cisteín proteinasas pudo haber sido una adaptación evolutiva en algunos insectos que se alimentan de semillas de leguminosas y de otros tejidos de plantas que contienen altos niveles de inhibidores de serín proteinasas (27). En estudios realizados sobre el tracto digestivo de algunos coleópteros se ha encontrado la presencia de diversas enzimas proteolíticas. Así por ejemplo, en *Tribolium castaneum* a pH entre 3,0 y 6,9 (5, 6, 23) en *Callosobruchus maculatus* a pH entre 3,3 y 6,0 (10, 12, 16, 23, 29), *Acanthoscelides obtectus* a pH entre 4,5 y 7,0 (32), *Zabrotes subfasciatus* a pH 3,5 y 5,5 (19), *Tribolium confusum* a pH entre 6,5 y 6,9 (5), *Trogoderma spp* a pH entre 4,6 y 7,6 (17), *Prostephanus truncatus* pH entre 7,2 y 9,0 (14, 28), *Sitophilus oryzae* pH entre 4,0 y 10 (2, 21), y en *S. zeamais* pH entre 2,5 y 10 (2, 14, 28).

Esta investigación tuvo como propósito buscar un mejor conocimiento de las propiedades y el papel que desempeñan estas enzimas en los procesos digestivos de los insectos y en especial, en *Hypothenemus hampei*, lo cual permitirá la búsqueda y evaluación de inhibidores específicos, los cuales pueden ser de utilidad para el control de la broca del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las brocas adultas, recién emergidas, se obtuvieron de la unidad de cría de parasitoides de Cenicafé (Chinchiná-Caldas), donde fueron criadas en café pergamino seco de agua, con una humedad del 45% y se mantenían bajo condiciones controladas a una temperatura de 27°C, con una humedad relativa del 65% - 75%.

Preparación del extracto enzimático. La proteinasa presente en el tracto digestivo se extrajo mediante la homogeneización de 0,5g de brocas adultas, con 2,0ml de cada uno de los siguientes medios de extracción: agua, NaCl al 1%, Buffer Citrato 0,05M y pH de 3,0, y Buffer Succínico 0,05M y pH de 4,0 y 6,0. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 x g, durante 30 minutos y los sobrenadantes resultantes se liofilizaron y se almacenaron a -20°C como fuente para las pruebas de actividad enzimática.

De cada muestra liofilizada se tomaron 0,05g y se disolvieron en 500µl de cada medio de extracción. Igualmente se disecaron adultos de *H. hampei*, extrayendo los intestinos completos con la ayuda de un estereoscopio y pinzas. Para la preparación del extracto se homogeneizó un total de 50 intestinos en 40µl de agua destilada y posteriormente se centrifugó el homogeneizado a 10.000 x g durante 10 minutos, a una temperatura de 4°C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante resultante se almacenó a -20°C para utilizarlo como fuente de la enzima.

Determinación de la proteína. Para todas las determinaciones se utilizó el método de Bradford (9), usando albúmina de suero bovino como proteína estándar.

Evaluación de la actividad proteolítica. Se determinó según el método de Lenney, con modificaciones sugeridas por Blanco Labra *et al.* (6, 20). Se preparó la hemoglobina bovina en

agua y desnaturalizada a pH: 1,0, con una solución 6N de HCl. Esta solución se disolvió con buffer citrato pH: 3,0 obteniendo una solución final de hemoglobina al 0,083%. Para efectuar la prueba de actividad se incubaron 100µl de la solución de la enzima a 30°C, con 300ml de buffer citrato pH: 3,0 y 1,3ml de hemoglobina bovina al 0,083%. La reacción se detuvo por la adición de 2,5ml de una solución de ácido tricloroacético 0,34N. Posteriormente se colocaron las muestras en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos. La lectura de las muestras se hizo a 280nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS marca UNICAM.

pH óptimo de actividad. El efecto del pH sobre la actividad proteolítica proveniente de *H. hampei*, se determinó midiendo la actividad de la enzima en las siguientes soluciones amortiguadoras: buffer oxalato 0,2M y valores de pH de 1,5 y 2,0; buffer citrato 0,2M y valores de pH de 2,5; 3,0 y 3,5 y buffer succinato 0,2M y valores de pH 4,0 y 4,5. Se incubaron 100µl de la solución de la enzima más 300µl de cada uno de los buffer evaluados con hemoglobina bovina al 0,083% a 30°C durante 2 horas.

Temperatura óptima de actividad. El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica se determinó preincubando 100µl de la solución de la enzima en buffer de actividad pH: 3,0 durante 5 minutos a 30, 40, 50, 60 y 70°C. Después del tratamiento, se determinó la actividad enzimática remanente, a 30°C.

Efecto de la concentración y tiempo de reacción enzimática. Para determinar el tiempo y la concentración óptima de la enzima en reacción, se disolvió 0,1g de extracto liofilizado de broca adulta en 2ml de agua destilada. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 10.000 x g, durante 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para las pruebas de actividad proteolítica. El tiempo de reacción se evaluó con 100µl del sobrenadante durante 5, 15, 60, 120 y 240 minutos y la concen-

tracción se evaluó con 5, 15, 25, 50, 100 y 200 μ l de una solución que contenía 2,9 μ g de proteína/ μ l.

Inhibición por pepstatin. Para determinar el tipo de actividad proteolítica presente en el fluido digestivo del insecto se realizaron pruebas de inhibición de la enzima frente al inhibidor sintético Pepstatin A, en concentraciones de 0,1; 0,4 y 1 μ M. En estas pruebas de inhibición se preincubó la enzima con el inhibidor durante 15 minutos, antes de adicionar el sustrato. Igualmente se evaluó la tasa de hidrólisis de hemoglobina y de albúmina de suero bovino por la enzima presente en el extracto, con miras a definir la especificidad por el sustrato. Las lecturas tanto de inhibición como de actividad se realizaron por espectrofotometría.

Zimograma de actividad proteolítica. La actividad proteolítica se determinó en zimogramas *in situ* empleando el método de Campos *et al.* (10). Para ello se tomaron muestras de la enzima proveniente tanto de adultos completos como de intestinos y se analizaron sobre geles de poliacrilamida (PAGE) al 16%, en condiciones nativas, utilizando cámara de electroforesis vertical (Bio Rad laboratories, Modelo Miniprotein II). La electroforesis se corrió durante 1 hora y 45 minutos a 150 voltios y a 4°C. Posteriormente se lavó el gel ligeramente con agua destilada y se incubó a 35°C durante 3 horas, con solución de hemoglobina al 1%. Las bandas de actividad se observaron por coloración del gel con azul de coomassie durante 30 minutos y destinción durante 1 hora. Las zonas de actividad proteolítica se presentan como bandas claras bien definidas sobre el gel, el cual presenta un fondo de coloración azul intenso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medios de extracción. Con el objeto de determinar el medio de extracción más adecuado para

la enzima, se realizaron diferentes pruebas de actividad frente a varias soluciones de extracción. La máxima actividad se presentó cuando se utilizó buffer citrato 0,05M y pH 3,0 como medio de extracción, seguido por la utilización de agua desionizada. Es importante destacar que en todos los medios de extracción evaluados la enzima alcanza una actividad proteolítica relativa superior al 60%, lo cual indica que en la extracción inicial de esta enzima pueden utilizarse diversas soluciones como medios adecuados de extracción (6, 13, 31). Sin embargo, el uso de agua desionizada se constituye en una alternativa, en especial, cuando la presencia de algunas sales pudiera interferir con el proceso de evaluación o purificación de la enzima.

pH óptimo. Los estudios llevados a cabo muestran que la actividad proteolítica presente en el tracto digestivo de *H. hampei* presenta un pico máximo de actividad a pH 3,0 (Figura 1). Un rango amplio de gran actividad se encuentra a un pH entre 1,5 y 4,5 que corresponde a valores superiores al 60% de actividad relativa. Estos resultados son similares a los registrados previamente para otros coleópteros. Así, por ejemplo, *Tribolium castaneum* presenta actividad proteolítica en el rango de pH comprendido

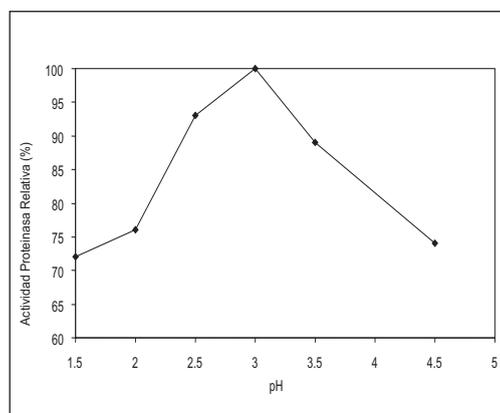


Figura 1. Efecto del pH sobre la hidrólisis de hemoglobina de un extracto de proteinasas digestivas provenientes de adultos de *H. hampei*, a 30°C.

entre 3,0 y 6,9 (5, 6, 23); *Callosobruchus maculatus* a pH entre 3,3 y 6,0 (10, 12, 16, 23, 29); un pH entre 5,5 y 6,5 favorece la actividad de *Acanthoscelides obtectus* (32); y valores de pH entre 3,5 y 5,5 para *Zabrotes subfasciatus* (19). La actividad proteolítica máxima encontrada a pH=3,0 en *H. hampei*, indica que se trata de una proteinasa ácida y más específicamente, del tipo aspártico proteinasa, similar a lo encontrado en otros estudios con realizados con coleópteros (4, 13, 26, 30, 31).

Temperatura óptima de actividad. Los resultados de temperatura óptima para la actividad de la enzima muestran que su máxima actividad se detecta a 40°C y que a 60°C, más del 50% de la actividad se pierde (Figura 2). Este valor es muy cercano al registrado para la actividad de la serin proteinasa extraída de *Trichoplusia ni*, el cual se presenta a 45°C (26). La pérdida progresiva de la actividad proteolítica observada en *H. hampei* por encima de 50°C, también ha sido registrada para proteinasas provenientes de *M. auratus* (8), *Tribolium castaneum* (6) y *Trichoplusia ni* (26), lo cual indica, además, la inestabilidad térmica de la enzima. En general, la actividad proteolítica proveniente de *H. hampei* presenta buena estabilidad térmica en el rango comprendido entre 30 y 50°C, alcanzando dentro de este rango

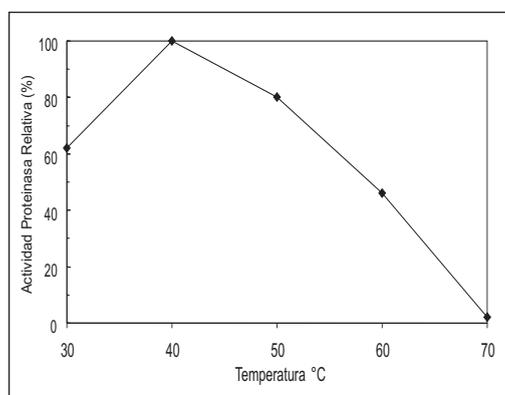


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de la hemoglobina un extracto de proteinasas digestivas provenientes de adultos *H. hampei*, a 30°C.

valores de actividad relativa superiores al 60%. Actualmente se sabe que las enzimas en general, tienen diferente energía de activación y de conversión y que por tanto, una modificación en la temperatura puede ocasionar un cambio en una de ellas (18).

Efecto de la concentración y tiempo de reacción enzimática. La hidrólisis de la hemoglobina fue lineal hasta una concentración aproximada de 72µg de proteína, como fuente de enzima en el medio de reacción (Figura 3) y lineal con respecto al tiempo hasta los 15 minutos (Figura 4). La máxima actividad relativa se alcanza a una

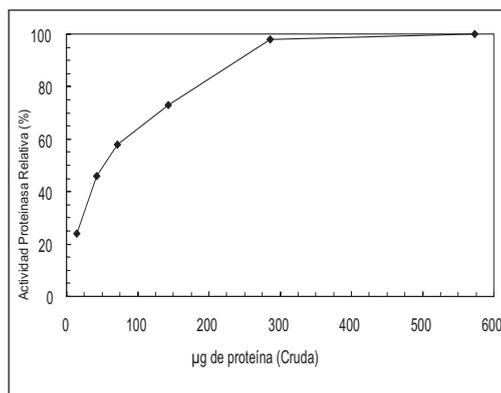


Figura 3. Efecto de la concentración del fluido digestivo de *H. hampei* sobre la hidrólisis de hemoglobina a pH=3,0 (Buffer Citrato 0,1M) y a 30°C de temperatura, durante dos horas de reacción.

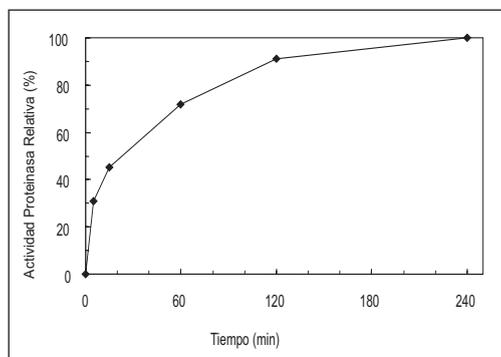


Figura 4. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad proteolítica a pH=3,0 (Buffer Citrato 0,1M) del fluido digestivo de *H. hampei*.

concentración de 287µg de proteína y a las 2 horas de iniciada la reacción. Pritchett *et al.* (26), registraron linealidad en el tiempo hasta de 1 hora para la actividad proteolítica proveniente del fluido digestivo de larvas de *Trichoplusia ni*.

Inhibición por Pepstatin. La enzima presente en el tracto digestivo de la broca es inhibida en más de un 70% por el pepstatin. A una concentración de 0,1µM, y en más de un 90% por el mismo inhibidor a una concentración de 1µM. Con el fin de determinar si la proteinasa del insecto era del tipo Pepsin o Catepsin D se evaluó la actividad de la enzima usando hemoglobina y albúmina de suero bovino (BSA) como sustratos. Los resultados encontrados muestran que la enzima hidroliza hemoglobina más eficientemente que BSA. Tan sólo un 20% de la actividad total sobre hemoglobina se alcanzó cuando el sustrato utilizado fue BSA.

La fuerte inhibición que experimenta la actividad proteinasa en *H. hampei* en presencia de Pepstatin A, permite asegurar que se trata de una aspártico proteinasa dado que el pepstatin se conoce como un potente inhibidor de esta clase de proteinasas. Así mismo, es posible clasificarla como una aspártico proteinasa del tipo Catepsin D, dado que la enzima hidroliza selectivamente hemoglobina con respecto a albúmina de suero bovino. En algunos coleópteros como la especie *Tribolium castaneum* se han identificado en su fluido digestivo proteinasas de este tipo (6).

Zimograma de actividad. El análisis isoenzimático se realizó en geles nativos de poliacrilamida, tanto para el extracto de intestinos como para el de adultos completos de *H. hampei*. El zimograma muestra tres bandas de actividad aspártico proteinasa bien definidas, dos de las cuales están presentes tanto en brocas adultas como en intestinos (Figura 5). La presencia de esta enzima en el lumen intestinal del insecto demuestra la naturaleza digestiva de la enzima.

En conclusión, este estudio permitió demostrar que las proteasas digestivas de *H. hampei* son aspártico proteasas y que se encuentran asociadas a su tracto intestinal. Igualmente, se han dado a conocer algunas propiedades importantes de estas enzimas, las cuales no eran conocidas hasta hoy. Así mismo, se ha podido obtener información básica importante no sólo de como *H. hampei* degrada las proteínas, sino que además, permitirá evaluar la real vulnerabilidad bioquímica de este insecto a diversos inhibidores. Investigaciones futuras en el campo podrían enfocarse en la búsqueda y evaluación de inhibidores naturales específicos, los cuales puedan ser utilizados a través de la biotecnología en la generación de materiales de café resistentes al ataque de la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

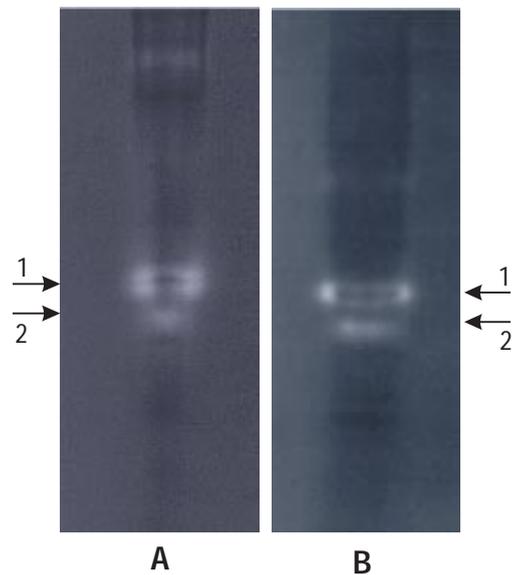


Figura 5. Zimograma de actividad proteolítica de *H. hampei*. **A**, extracto crudo de adultos. **B**, extracto de intestinos de adultos. La electroforesis nativa se desarrolló sobre geles homogéneos del 16%. Después de la electroforesis se incubó el gel con una solución de hemoglobina al 1% en buffer citrato pH=3,0, durante 3 horas a 35°C. Finalmente, el gel se lavó con agua y se tiñó con azul de coomassie.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero de Colciencias, Proyecto ENT - 1000 "Evaluación de inhibidores de amilasas y proteasas y estudio de las enzimas digestivas de la broca del café."

LITERATURA CITADA

1. APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* 4: 279-311. 1985.
2. BAKER, J.E. Digestive proteinases of *Sitophilus weevils* (Coleoptera: Curculionidae) and their response to inhibitors from wheat and corn flour. *Canadian Journal of Zoology* 60: 3206-3214. 1982.
3. BARRET, A.J. Properties of lysosomal enzymes. *In*: DINGLE, J.T.; FELL, H.B. eds. *Lysosomes in biology and pathology*. Amsterdam, North-Holland, 1969. p. 245-312.
4. BARRET, A.J. Cathepsin D and other carboxyl proteinases from mammalian cells and tissues. Amsterdam, North-Holland, 1977. p. 209-248.
5. BIRK, Y.; HARPAZ, I.; ISHAAYA, I.; BONDI, A. Studies on the proteolytic activity of the beetles *Tenebrio* and *Tribolium*. *Journal of Insect Physiology* 8: 417-429. 1962.
6. BLANCO, L.A.; MARTINEZ, N.A.; SANDOVAL, L.; DELANO, J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(1): 95-100. 1996.
7. BOND, J.; BUTLER, P.E. Intracellular proteases. *Annual Review of Biochemistry* 56: 333-364. 1987.
8. BONETE, M.J.; MANJON, A.; LLORCA, F.; IBORRA, J. Z. Acid proteinase activity in fishes II. Purification and characterization of Cathepsin B and D from *Mujil auratus* muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78B: 207-213. 1984.
9. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
10. CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C.P.; ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). *Comparative Biochemistry and Physiology* 92B: 51-57. 1989.
11. CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 735-746. 1992.
12. GATEHOUSE, A.M.R.; BUTLER, K.J.; FENTON, K.A.; GATEHOUSE, J.A. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 39: 279-286. 1985.
13. HOUSEMAN, J.G.; DOWNE, A.E.R. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry* 12 (6): 651-655. 1982.
14. HOUSEMAN, J.G.; THIE, N.M.R. Differences in digestive proteolysis in the stored maize beetles: *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 1049-1054. 1993.
15. JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43 (10): 885-895. 1997.
16. KITCH, L.W.; MURDOCK, L.L. Partial characterization of a major midgut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* (F). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 3: 561-576. 1986.
17. KRISHNA, S.S. Physiology of digestion in *Trogoderma* larva. *Journal of the Zoological Society of India* 7: 170-176. 1955.
18. LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25 (1): 49-61. 1995.

19. LEMOS, F.J.; CAMPOS, F.A.P.; SILVA, C.P.; XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56: 219-227. 1990.
20. LENNEY, J.F. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. *Journal of Bacteriology* 122: 1265-1273. 1975.
21. LIANG, C.; BROOKHART, G.; FENG, G.H.; REECK, G.R.; KRAMER, K.J. Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)* 278: 139-142. 1991
22. Mc FARLANE, J.E. Nutrition and digestive organs. *In: BLUM, S. ed. Fundamentals of Insect Physiology*. New York, Wiley and Sons, 1985. s p.
23. MURDOCK, L.L.; BROOKHART, G.; DUNN, P.E.; FOARD, D.E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, R.E.; SHUKLE, R.H.; WOLFSON, J.L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87(4): 783-787. 1987.
24. NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiology* 46: 308-340. 1982.
25. OKASHA, A. Y. K. Effect of sub-lethal temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stal) III. Metabolic changes and their bearing on the cessation and delay of moulting. *Journal of Experimental Biology* 48: 475-486. 1968.
26. PRITCHETT, D. W.; YOUNG, S. Y.; GEREN, C. R. Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry* 11 (5): 523-526. 1981.
27. RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449. 1990.
28. SANDOVAL, C.M.L. Purificación y caracterización de enzimas larvales de cuatro insectos que atacan al maíz durante su almacenamiento. Irapuato, CIEIAA. Universidad de Guanajuato, 1991. 135p (Tesis: Licenciatura)
29. SILVA, C.P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of *Callosobruchus maculatus* (F) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 99B: 529-533. 1991.
30. SMITH, E.; BIRT, L. M. Proteolytic activity during the metamorphosis of the blowfly, *Lucila*. *Insect Biochemistry* 2: 218-225. 1971.
31. VUNDLA, W. R. M.; BROSSARD, M.; PEARSON, D. J.; LABONGO, V. L. Characterization of aspartic proteinases from the gut of the Tick, *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 22(4): 405-410. 1992.
32. WIEMAN, K.F.; NIELSEN, S.S. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera : Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 89B: 419-426. 1988.
33. WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1089-1102. 1990.
34. XU, G.; QIN, J. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their inhibition by tannic acid. *Journal of Economic Entomology* 87(2): 334-338. 1994.