

YAREMIS BEATRIZ MERIÑO CABRERA

**RESPOSTA DE PLANTAS DE *Coffea arabica* (RUBIACEAE) ÀS INJÚRIAS
DE *Leucoptera coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE) ATRAVÉS DAS
VIAS DAS LIPOXIGENASES E ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M562r
2015

Meriño Cabrera, Yaremis Beatriz, 1992-
Resposta de plantas de *Coffea arabica* (Rubiaceae) às
injurias de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)
através das vias das lipoxigenases e atividade de
polifenoloxidasas / Yaremis Beatriz Meriño Cabrera. – Viçosa,
MG, 2015.
ix, 49f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.42-49.

1. Café - Resistência a doenças e pragas.
2. Bicho-mineiro-do-cafeeiro. 3. *Leucoptera coffeella*. 4.
Enzimas proteolítica - Inibidores. 5. Inibidores da tripsina.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73

YAREMIS BEATRIZ MERIÑO CABRERA

RESPOSTA DE PLANTAS DE *Coffea arabica* (RUBIACEAE) ÀS INJÚRIAS DE *Leucoptera coffeella* (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE) ATRAVÉS DAS VIAS DAS LIPOXIGENASES E ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de julho de 2015.

Camila Rocha da Silva

Carolina Rocha da Silva

Joel Antônio de Oliveira
(Coorientador)

Gláucia Cordeiro

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

No podríamos vivir sin soñar. Sin pensar que soñamos. Sin saber que ahí, nadie más podrá alcanzarnos. Que en el camino de los sueños, no hay mayor obstáculo que el que se impone el que no cree en ellos...

Anónimo

Ao meu pai Ricardo Meriño, minha mãe Nubia Cabrera e ao meu irmão Arnold Meriño, vocês são a minha inspiração.

Ao meu namorado José Severiche, por me ensinar que juntos tudo é melhor.

Dedico a vocês mais uma vitória.

AGRADECIMENTOS

-A Deus, por me guiar no caminho, e me trazer até aqui, sem Ele nada somos. Obrigada por sempre me abençoar.

-À Universidade Federal de Viçosa, ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de pós-graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade de engrandecer meus estudos.

-Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual não fora sido possível a realização do meu mestrado.

-A minha orientadora, Maria Goreti de Almeida Oliveira, por me permitir ser parte da sua equipe de trabalho e pela confiança depositada em mim.

-Ao meu coorientador, Marcelo Coutinho Picanço, pelas suas dicas, apoio e sua disponibilidade para sempre me ajudar.

-A minha família, meus pais e irmão, obrigada por me ensinar a lutar por meus sonhos, obrigada por me apoiar, e me ajudar a ser melhor. Porque é se orgulhar da escolha que te ofereceu mil tesouros e se odiar pela mesma escolha que te subtraiu outras mil pedras preciosas. Sair de casa não foi fácil, me estou perdendo de muitos maravilhosos momentos e só posso dizer que amo muito vocês e dedico todo este triunfo a vocês.

-Ao meu namorado, José Severiche Castro, pelo amor todos estes três anos, por me incentivar a fazer realidade minhas metas e me alcançar no caminho. Te amo meu amor.

-A minhas amigas da Colômbia, Karen e Jenny, pelo apoio, por sempre estarem presentes, pelos conselhos e bons momentos de risadas. Por fazer me sentir em casa.

-Ao Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, por me permitir o desenvolvimento técnico de que necessitava.

-Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP), e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro durante todo o processo desse trabalho.

- Glaucia Cordeiro, por suas sugestões no processo de redação da minha dissertação, e por seu bom senso de humor, contagiando com suas risadas.

- Ana Marques, por suas dicas e ajuda durante a fase experimental do meu trabalho.

-Ao Elizeu de Sá Farias e ao Ricardo Siqueira, do Laboratório de Manejo integrado de Pragas, por me ajudar na criação do bicho mineiro e na infestação das plantas de café.

-A toda a equipe do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Fabricio, Veris, Manuelito, Juan, Roberta, Jenny, Fran, Paulo, Gustavo, Breno, Neilier,

Cristian, Bernardo e a Glaucia, pela ajuda, sugestões, piadas, amizade e carinho durante estes dois anos.

-Aos secretario de pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo e Marcos, sempre presentes e prestativos.

-A minhas grandes amigas e irmãs, Marlin, Lizeth e Diana, pelos anos de amizade e pelo carinho. Porque não há distancias que possam acabar com nossa amizade, amo vocês.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

YAREMIS BEATRIZ MERIÑO CABRERA, filha de Ricardo Meriño Barandica e Nubia Cabrera Mendez, nasceu na cidade de Barranquilla, Colômbia, no dia 04 de junho de 1992.

Em 2013, gradou-se em Biologia pela Universidad del Atlántico (UA), Barranquilla, Colômbia, na modalidade de Bacharelado.

No mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada em nível de mestrado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gérias.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Café	3
2.2. <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)	4
2.3. Enzimas proteolíticas em insetos	6
2.3.1. Serino-proteases (EC 3.4.21)	8
2.3.2. Cisteíno-proteases (EC 3.4.22)	10
2.4. Lipoxigenase e inibidores de proteases em plantas.....	11
2.5. Polifenoloxidase	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Experimentação.....	15
4.2. Análises da atividade enzimática em <i>Leucoptera coffeella</i>	16
4.2.1. Extrato enzimático	16
4.2.2. Determinação da concentração de proteína.....	17
4.2.3. Determinação de atividade de serino-proteases	17
4.2.4. Determinação de atividade de cisteíno-proteases	19
4.2.5. Determinação de atividade de proteases totais	20
4.3. Atividade enzimática do café	20
4.3.1. Extrato foliar	20
4.3.2. Quantificação de inibidores de proteases	21
4.3.3. Determinação da atividade de lipoxigenase	22
4.3.4. Atividade de polifenoloxidases	23
4.4. Análises estatísticas.....	23
5. RESULTADOS	25
5.1. Análises da atividade enzimática em <i>Leucoptera Coffeella</i>	25
5.1.1. Atividade de serino-proteases	25
5.1.2. Determinação de atividade de cisteíno-proteases e proteases totais	25
5.2. Respostas defensivas de <i>Coffea arabica</i>	27

5.3. Defesa do cafeeiro Vs atividade proteolítica de <i>Leucoptera coffeella</i>	31
6. DISCUSSÃO	34
6.1. Análises da atividade enzimática em <i>Leucoptera Coffeella</i>	34
6.2. Respostas defensiva de <i>Coffea arabica</i>	36
6.3. Defesa do cafeeiro Vs atividade proteolítica de <i>Leucoptera coffeella</i>	39
7. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

MERIÑO-CABRERA, Yaremis Beatriz. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Resposta de plantas de *Coffea arabica* (Rubiaceae) às injúrias de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) através das vias das lipoxigenases e atividade de polifenoloxidasas.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Marcelo Coutinho Picanço e Joel Antônio de Oliveira.

A defesa das plantas contra os insetos são processos complexos que envolvem a ativação ou repressão de diferentes vias de sinalização, permitindo assim a sobre-expressão de genes alvo com propriedades de defesa. O objetivo deste estudo foi determinar a relação entre a resposta defensiva de *Coffea arabica* mediante as vias das lipoxigenases e polifenoloxidasas e o processo de herbivoria de *Leucoptera coffeella*. Foi realizado um experimento com dois tratamentos: 1) plantas de café infestadas e 2) plantas não infestadas com bicho-mineiro. Cada tratamento foi composto por 10 repetições e avaliou-se a atividade das lipoxigenases e polifenoloxidasas; e a produção de inibidores de proteases no cafeeiro. Em *L. coffeella* a atividade de tripsina-like foi verificada usando os substratos L-BAPNA e L-TAME e a quimotripsina-like foi determinada com BTPNA e ATEE. As cisteíno-proteases deste inseto foi obtida utilizando L-BAPNA e proteases totais usando azocaseína como substrato. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas por espectrofotometria. Houve um aumento nas atividades enzimáticas das plantas infestadas em relação as não infestadas nas vias estudadas (lipoxigenase: $F= 29,4$; $p= 0,00022$ e polifenoloxidasas: $F= 8,41$; $p= 0,00022$) e na produção de inibidores de proteases ($F= 9,64$; $p= 0,0022$). A partir das análises de correlação de Pearson, observou-se que a quimotripsina-like e os inibidores de proteases apresentaram uma relação inversa ($r= -0,82$; $p= 0,03$). Já a tripsina-like teve correlação direta com as atividades das lipoxigenases ($r= 0,6$; $p= 0,03$) e polifenoloxidasas ($r= 0,82$; $p= 0,03$). Diante do exposto, nas larvas de *L. coffeella* existe atividade tanto serino como cisteíno-proteases, mas a atividade serino-proteases é a mais expressada no intestino destes insetos. A produção de inibidores de proteases e as atividades de lipoxigenases e polifenoloxidasas nas plantas de *C. arabica* são aumentadas na presença de *L. coffeella*, o que indica a possível participação destas vias no processo de defesa da planta.

Palavras chaves: inibidores, tripsina, bicho-mineiro.

ABSTRACT

MERIÑO-CABRERA, Yaremis Beatriz. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. July, 2015. **Response of *Coffea arabica* plants (Rubiaceae) defense to of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) injuries through the lipoxygenase pathway and polyphenoloxidases activities.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisors: Marcelo Coutinho Picanço and Joel Antônio de Oliveira.

The plant defense against insects is complex processes that involve the activation or repression of different signaling pathways, thus allowing over-expression of target genes with defense properties. The aim of this study was to determine the relationship between the defensive response of *Coffea arabica* through the lipoxygenases and polyphenol pathways and herbivory process *Leucoptera coffeella*. It conducted an experiment with two treatments: 1) infested coffee plants and 2) plants not infested with leaf miner-of-coffee. Each treatment consisted of 10 repetitions and evaluated the lipoxygenase and polyphenol activity; and the protease inhibitors production in coffee. In *L. coffeella* the trypsin-like activity was checked using the L-BApNA and L-TAME substrates and chymotrypsin-like was determined using BTpNA and ATEE. The cysteine proteases activity was obtained using L-BApNA and total protease using azocasein as substrate. All enzyme activities were determined by spectrophotometry. There was an increase in the activities of infested plants over non-infested in the studied routes (lipoxygenase: $F = 29.4$, $p = 0.00022$ and polyphenol: $F = 8.41$, $p = 0.00022$) and production of inhibitors proteases ($F = 9.64$; $p = 0.0022$). From the Pearson correlation analysis, it was observed that the chymotrypsin-like and proteases inhibitors showed an inverse relationship ($r = -0.82$; $p = 0.03$). Already trypsin-like had direct correlation with the activities of lipoxygenase ($r = 0.6$; $p = 0.03$) and polyphenol ($r = 0.82$; $p = 0.03$). Given the above, in the larvae *L. coffeella* there is activity both serine and cysteine proteases, but the serine-protease activity is who characterized the intestine of these insects. The protease inhibitors production and lipoxygenase and polyphenol activities in *C. arabica* plants come up increased in the presence of *L. coffeella*, indicating a possible role of these pathways in plant defense process.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial do grãos de café, chegando a atingir 36,49 milhões de saca (60 Kg) para exportação entre anos de 2014 e 2015, o que é equivalente ao volume gerado pelos outros cinco maiores países produtores. Além disso, é também o segundo mercado consumidor, perdendo apenas para os Estados Unidos (ABIC, 2015).

Para que o Brasil continue a liderar a produção e exportação do café é necessária a modernização da produção, tanto pelo uso de melhores cultivares, como pelo controle de pragas e cuidados na pós-colheita (PEREIRA et al., 2008). As plantas de café são atacadas por diversas pragas, e dentre as espécies de insetos destacam-se como pragas-chave o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae)), a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* (Le Pelley) (Coleoptera: Scolytidae)), e as cigarras dos gêneros *Quesada*, *Fidicina*, *Carineta* e *Dorisiana* (Hemiptera: Cicadidae) (REIS et al., 1975). *L. coffeella* é uma praga que causa perda de área foliar, podendo reduzir até 80% da capacidade produtiva do cafeeiro, dependendo da intensidade, duração do surto e da época de ocorrência, comprometendo, assim, a próxima safra. O controle químico é o método mais utilizado pelos produtores brasileiros para o controle destes insetos, entretanto devemos evitar o uso destes produtos (REIS & SOUZA, 1998).

A crescente preocupação ambiental e o aumento da resistência de *L. coffeella* aos inseticidas, têm estimulado a busca de estratégias de controle ambientalmente correta (JARAMILLO et al., 2006). Entre essas alternativas, propõem-se diversas vias de defesa das plantas que podem conferir resistência aos insetos-praga (BERTHOLDO-VARGAS et al., 2009).

A defesa de plantas contra insetos é um processo complexo que envolve a ativação ou repressão de diferentes vias de sinalização permitindo a super-expressão de genes alvos com propriedades defensivas. Um dos principais grupos de proteínas induzido depois da exposição da planta ao inseto são os inibidores de proteases (CARRILLO et al., 2011). Nas plantas estes inibidores são armazenados em órgãos reprodutivos e/ou em tecidos vegetativos (GIRI et al., 2003; ZHAO et al., 2011). Duas funções têm sido relacionadas a estes inibidores, uma é a regulação de proteases endógenas das plantas e a outra é a inibição de proteases exógenas a partir de artrópodes pragas e microrganismos patogênicos (RYAN, 1990).

A princípio os inibidores foram agrupados de acordo com o tipo de protease inibida, sendo classificados como inibidores de cisteíno, serino, aspártico e metalo proteases (LASKOWSKI & KATO, 1980). Entretanto, verificou-se que os inibidores homólogos podem inibir diferentes classes de proteases, por isso passaram a serem classificados em função das suas semelhanças nas sequências e estruturas tridimensionais (RAWLINGS et al., 2010). Estes inibidores de proteases podem ser produzidos pela indução do ácido jasmônico (JA), o qual é um ácido graxo derivativo que é gerado a partir do ácido linoleico pela via octadecanoide das plantas. Esta rota metabólica é iniciada pelas lipoxigenases (LOX), que são enzimas oxidorreduzases contendo ferro e catalisam a dioxigenação de ácidos graxos insaturados com motivos 1,4-pentadieno (MACK et al., 1987).

Outra via metabólica ativada no processo de defesa contra insetos herbívoros é a rota da polifenoloxidasas (PPO), que é uma enzima amplamente distribuída nas plantas induzindo um tipo de defesa antinutritiva, após as injúrias causadas pelo inseto. A PPO catalisa a oxidação de fenóis produzindo quinonas, que podem modificar as proteínas da planta e reduzir seu valor nutritivo para os herbívoros (MAZZAFERA & ROBINSON, 2000). Mazzafera et al. (1989) sugeriram o envolvimento da PPO na resistência do café ao fungo *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem-alaranjada-do-cafeeiro, e ao nematóide de raiz *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Heteroderidae). Além disso, existe uma caracterização da polifenoloxidase do café e os genes induzidos na planta contra a infestação do bicho-minero (COSTA-MONDEGO et al., 2011). Porém, não se conhece a relação das lipoxigenases, polifenoloxidasas e produção de inibidores de proteases na defesa do cafeeiro contra a larva de *L. coffeella*.

Dadas as considerações acima, objetivou-se determinar a relação entre a resposta defensiva de *C. arabica* mediante as vias das lipoxigenases e atividade das polifenoloxidasas e o processo de herbivoria de *L. coffeella*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Café

O café foi descoberto nas montanhas da província de Keffa, atual Etiópia, no século VI, e em seguida foi cultivado na Arábia e, por volta de 1500, na Europa. A palavra café tem origem na palavra árabe qahwa, que significa vinho. Por tal razão, quando o café foi levado da Etiópia para Europa, no século XIV, foi chamado de vinho da Arábia (BONOMO et al., 2004). A introdução de mudas de café do continente Europeu para o Americano (Central e Sul) ocorreu por volta de 1700, chegando ao Brasil em 1727 (YANAGIMOTO, 2004).

O café pertence à família Rubiaceae, ao gênero *Coffea* e existem descritas aproximadamente 100 espécies deste gênero. O cafeeiro é um arbusto de crescimento contínuo e perene, com dimorfismo de ramos, que atinge dois a quatro metros de altura, conforme a espécie e as condições climáticas da região, e suas folhas são pareadas e opostas, ovais e de coloração verde escura. As flores são brancas, aromáticas, reunidas em número de dois a seis, formando glomérulos situados na axila da folha (RENA & GUIMARÃES, 2000).

Nos últimos dez anos o Brasil colheu cerca de 30 milhões de sacas de café por ano, com exportação entre 70 e 80 milhões de sacas de 60 Kg, o equivalente a cerca de 30% do mercado mundial. Minas Gerais é o maior produtor deste grão, com cerca de 50% da produção nacional, seguido dos estados do Espírito Santo, São Paulo e Paraná. As duas espécies de café crescentes comercialmente no Brasil são *Coffea arabica* L. variedade de café mais exportada no 2015 (77,3 %), seguida por *Coffea robusta* L., (12,5 % de exportação), as quais também representam 70% e 30%, respectivamente, da produção mundial (ABIC, 2015; MATIELLO et al., 2002).

A espécie *Coffea arabica* L., oriunda de regiões montanhosas, é uma planta delicada, de produção entre pequena e média e tem um porte de 5 a 6 m de altura e requer clima temperado. Espécie autofértil, portanto autocompatível, reproduzindo-se predominantemente por autofecundação, com uma taxa de alogamia de aproximadamente 10% (ILLY, 2002).

Visando preservar a situação do mercado atual, o setor cafeeiro tenta manter o ritmo de marketing e modernização da indústria através da implementação de estratégias mercadológicas que estimulem o consumo do café e de seus derivados.

Assim, a inovação em tecnologias, produtos e a melhoria da sua qualidade constituem elementos decisivos para alcançar e sustentar vantagens competitivas, o que favorece o crescimento econômico (ROCHA & FERREIRA, 2001).

2.2. *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

Leucoptera coffeella também conhecido como bicho-mineiro-do-cafeeiro ou bicho-mineiro é uma praga exótica originária do continente africano, que se disseminou posteriormente para os demais continentes. O inseto é atualmente praga de importância primária no Brasil, América Central, Índia e Quênia (GALLO et al., 1978). Trata-se de um inseto monofago que ataca apenas o cafeeiro. Seu nome está relacionado com as galerias que a larva constrói entre a epiderme da folha, em consequência à destruição do tecido paliçádico, utilizado para sua alimentação (SOUZA et al., 1998).

As primeiras referências ao inseto como praga do cafeeiro, no Brasil, datam de 1860/1861, época em que surtos importantes foram observados nesta cultura no Rio de Janeiro-RJ e em Juiz de Fora-MG. Mas foi apenas a partir de 1970, com a introdução do fungo *H. vastatrix* (ferrugem-alaranjada-do-cafeeiro) no Brasil, que o problema se agravou. Em seguida, o aumento populacional do bicho-mineiro foi cada vez mais frequente, com ataques contínuos (PARRA, 1985).

O bicho-mineiro possui metamorfose completa, passando pela fase de ovo, larva (lagarta), pupa e adulto. As lagartas apresentam três pares de pernas torácicas e cinco falsas pernas abdominais, tendo aparelho bucal do tipo mastigador (SOUZA et al., 1998). Nessa fase do desenvolvimento biológico, o inseto não tem contato com o meio externo. Os ovos de *L. coffeella*, depositados pelas fêmeas na parte superior das folhas de café, tem um aspecto gelatinoso e são difíceis de ver a olho nu. Temperatura e umidade relativa do ar têm uma forte influência sobre o número de ovos postos por fêmea (KATIYAR & FERRER, 1968). Em estudos feitos por Parra (1985), as fêmeas criadas em uma criação mantida a 27°C e umidade relativa do ar praticamente saturada pode colocar mais de 60 ovos. A duração da fase de ovo pode ser mais de 20 dias (KATIYAR & FERRER, 1968). Após a eclosão, as lagartas de *L. coffeella* penetram no tecido da folha através da parte inferior do ovo, que está em contacto com a epiderme foliar, sem contactar com o exterior.

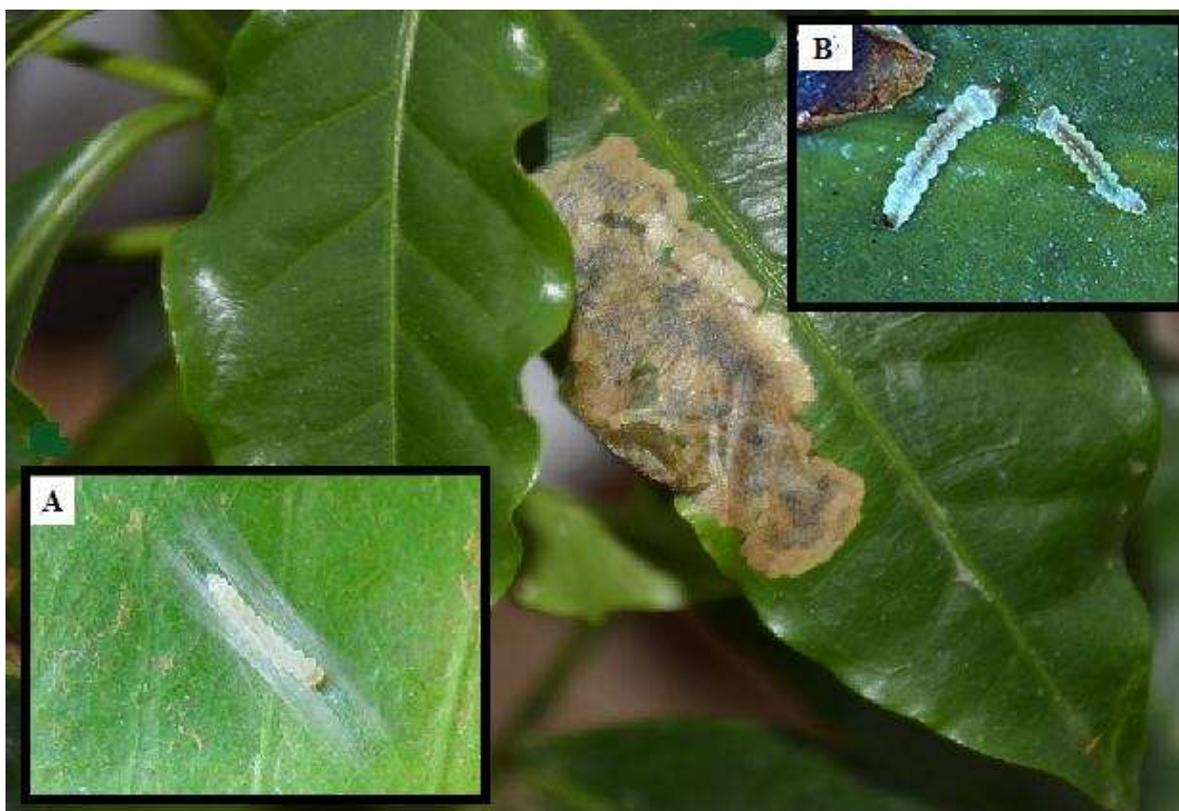


Figura 1. Folha de café com minas feitas por lagarta de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). A) Lagartas tecendo fio de seda na superfície abaxial das folhas. B) Lagartas de quarto instar.

Alta temperatura e umidade relativa pode encurtar a fase larval. Entre 27°C e 30°C, a fase larval nas folhas da cultivar Mundo Novo *C. arabica* varia de 7 a 11 dias. As temperaturas moderadas, em torno de 20°C, a fase larval varia de 16 a 26 dias (PARRA, 1985). O bicho-mineiro tem quatro estágios larvais (NOTLEY, 1948), e é possível encontrar várias lagartas de diferentes estádios; mas não existe canibalismo entre eles. Depois de completar o período larval, as lagartas se transformam em pupas; eles abandonam os túneis e tecem um casulo, normalmente na parte axial das folhas. De um modo geral, mais pupas são encontrados no terço inferior das plantas, a região da saia do cafeeiro. Em estudos conduzidos em laboratório, com temperaturas que variam de 20°C a 35°C (PARRA, 1985), foram encontrados grandes variações na duração da fase de pupas. Adultos mantidos em laboratório em um 25°C de temperatura, 70% de umidade relativa e 14h de fotoperíodo, vivem uma média de 13 a 14 dias quando alimentados com uma solução de 10% de sacarose, enquanto os adultos em jejum viver apenas 4-5 dias.

A incidência de bicho-mineiro nas lavouras de café é particularmente influenciada pela temperatura, fase de exposição e especialmente pelo espaçamento adotado. Espaçamentos maiores, que proporcionam maior arejamento às plantas, favorecem as infestações (SOUZA et al., 1998). Cafeeiros localizados em regiões com alta intensidade de ventos pode apresentar maior ocorrência deste inseto (AMARAL, 1953). Um fato limitante no desenvolvimento do bicho-mineiro seria o orifício formado na epiderme devido à saída de uma das larvas, o que pode causar a morte das demais lagartas devido ao excesso de água no ambiente, ou seja, a entrada de água na mina (CROWE, 1964).

A incidência de inimigos naturais contribui para a manutenção de populações do inseto abaixo do nível de dano econômico. A eficiência dos insetos que parasitam as lagartas é menor que aquela proporcionada pela ação de insetos predadores que pode ser de até 69% (REIS & SOUZA, 1994). Estudos conduzidos por Reis et al. (1975) evidenciaram que o controle proporcionado por parasitos varia entre 16 e 20%. No entanto as utilizações de produtos químicos de controle, especialmente aqueles usados em pulverização, contribuem muito para a redução populacional dos inimigos naturais. Outro fator importante na incidência do inseto é o genótipo do hospedeiro. Lavouras de *C. arabica* são mais infestadas quando comparadas à lavouras de *C. canephora*, sendo que nestas últimas o controle químico é praticamente indispensável, devido a sua maior probabilidade de ser infestada (FERREIRA et al., 1979). Quando próximas umas às outras, as infestações diminuem em *C. arabica*, e aumentam em *C. canephora* (AVILES et al., 1983).

2.3. Enzimas proteolíticas em insetos

Insetos são excelentes modelos para o estudo da função intestinal, principalmente porque existem espécies adaptadas a diferentes ambientes e hábitos alimentares. Além disso, o intestino é a maior interface entre o inseto e o ambiente. Portanto, é essencial o entendimento do processo digestivo para o desenvolvimento de métodos de controle biológico, como é o caso do uso de plantas transgênicas. A ocorrência de diferentes enzimas no canal digestivo dos insetos é, principalmente, em razão da composição química da dieta ingerida. Provavelmente todos os insetos tenham enzimas digestivas complementares àquelas utilizadas primariamente, em

quantidades relativas que mudam em resposta à composição da dieta (TERRA & FERREIRA, 1994).

As enzimas proteolíticas catalisam a clivagem das ligações peptídicas em outras proteínas. São classificadas de acordo com Enzyme Commission of the Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB dentro do grupo 3 (hidrolases) e subgrupo 4 (peptido hidrolase). Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (RAWLINGS et al., 2010).

As proteases digestivas catalisam liberação de peptídeos e aminoácidos a partir das proteínas da dieta e são encontradas em maior proporção na região do intestino médio do trato digestivo do inseto. Proteases são subdivididas em proteinases, as quais são endopeptidases que clivam cadeias protéicas em sítios específicos, e exopeptidases, que removem aminoácidos a partir de qualquer N ou C-terminal. Acreditava-se que, assim como os vertebrados, os insetos só tinham serino-proteases, como tripsina e quimotripsina, e aspartato proteases, como pepsina (McFARLANE, 1985). Entretanto, após várias pesquisas realizadas com Lepidoptera e Diptera, verificou-se que estes insetos usam serino-proteases na sua digestão. Algumas espécies possuem intestino meio alcalino, o que proporciona um ótimo pH, entre 8 e 11, para a atividade destas classes de proteinases. Outras classes de proteases também podem ser encontradas no intestino dos insetos, como a de cisteína e de aspartato proteases, com resíduos de cisteína e aspartato no seus sítios ativos, respectivamente (CHRISTELLER et al., 1992). Tem sido hipotetizado que o uso de cisteína-proteases podem ter sido uma adaptação evolutiva que permitiu aos insetos se alimentar de sementes de Fabaceae e outros tecidos de planta que, naturalmente, contêm grande quantidade de inibidores serino-proteases (RYAN, 1990).

Santos et al. (1983) avaliaram o consumo alimentar e a organização espacial da digestão na lagarta-da-mandioca, *Erinnys ello* (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae), e observaram que as enzimas amilase e tripsina ocorreram tanto nas células do intestino do inseto, como no seu lúmen intestinal, sendo este um dos trabalhos pioneiros desta linha de pesquisa. As atividades das enzimas foram homogêneas na membrana peritrófica, assim como no material regurgitado. A amilase e a tripsina foram encontradas em maior quantidade no material regurgitado do intestino, em comparação com as outras enzimas analisadas.

Broadway (1989) realizou a caracterização e as implicações ecológicas da atividade proteolítica em larvas de *Pieris rapae* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pieridae) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), demonstrando que 86% até o 89% da atividade enzimática pode ser eliminada mediante a adição de inibidores trópticos e quimotrópticos. Ele indicou que a tripsina e a quimotripsina são as maiores, mas não são as únicas enzimas responsáveis pela digestão das proteínas. Além disso, demonstrou que a eficiência da digestão das proteínas varia de acordo com a espécie de lepidópteras. Johnston et al. (1995) determinaram a atividade proteolítica no intestino de lavas de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), onde a tripsina-like apresentou melhor atividade com os substratos BApNA e inibição em TLCK; e a quimotripsina-like hidrolisou melhor os substratos S(Ala)₂ProPhe-pNA e S(Ala)₂ProLeu-pNA e foi inibida por quimostatina.

Ortego et al. (1996) identificaram e caracterizaram as proteases no intestino de *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae), concluindo que a máxima atividade azocaseinolítica foi em valores de pH no intervalo de 10,0-11,5, confirmando que a hidrólise máxima de proteínas é realizada em valores de pH maiores a 9,0, que é comum em larvas lepidópteras filófagas. Stygar et al. (2010) avaliaram a atividade de enzimas digestivas em larvas de *Cameraria ohridella* (Deschka & Dimić) (Lepdoptera: Gracillariidae) minadoras de folhas, concluindo que a atividade proteolítica encontrada neste inseto é similar a outros insetos herbívoros e que as proteínas das folhas não são eficientemente utilizadas.

Apenas Rossi et al. (2009) realizaram estudos bioquímicos com o bicho-mineiro, determinando que as despolimerases alfa-amilase e tripsina apresentaram pH's ótimos alcalinos e sugeriram que estas enzimas atuam no lúmen do intestino médio deste inseto. Além disso, os valores das atividades das enzimas amilase e tripsina, na parte anterior e posterior do bicho-mineiro, indicaram uma reciclagem dessas enzimas através da circulação em contra corrente no espaço ectoperitrófico, o que corrobora com o estudo de Santos et al. (1983) para a espécie *E. ello*.

2.3.1. Serino-proteases (EC 3.4.21)

As enzimas mais estudadas são as serino-proteases, que estão presentes nos vírus, bactérias e nos eucariotos, possuindo participação vital no metabolismo destes organismos. A tripsina e a quimotripsina são as mais conhecidas dentro deste grupo,

participando de uma grande diversidade de processos fisiológicos, tais como na digestão, na ativação de proteínas específicas, na cascata de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas e no desenvolvimento (GORMAN et al., 2000; GILL et al., 1996).

As serino-proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e ômega peptidase. Com base em suas similaridades estruturais são reagrupadas em 20 famílias.

A função catalítica das serino-proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina, histidina e ácido aspártico), enquanto o grau e tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de turn over da enzima, alterando a constante catalítica (K_{cat}), que, conseqüentemente, modifica o mecanismo enzimático afetando o K_m . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo e contribuem para uma atividade catalítica otimizada (PERONA & CRAIK, 1995).

Estas enzimas atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acil-enzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela desacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. Este ataque do grupo hidroxila da serina do sítio ativo sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base, leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acil-enzima, uma base imidazólica e uma amina. Este mecanismo implica um estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto da degradação (CRAIK et al., 1987).

A relação entre a velocidade de acilação e de desacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a de desacilação e, para um substrato éster, esta velocidade pode ser de uma a três vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa de acilação é lenta e a de desacilação rápida, enquanto na atividade esterásica ocorre o inverso, sendo, portanto a etapa lenta o passo limitante da hidrólise (FASTREZ & FERSHT, 1973).

As serino-proteases geralmente são ativas em pH neutro e alcalino, com pH ótimo entre 7,0 e 11,0 (RAO et al., 1998). Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásicas e esterásica. A massa molecular das serino-proteases em geral está na faixa de 18 a 35 kDa, entretanto, vários organismos possuem estas enzimas com valores de 53 kDa. O ponto isoelétrico está geralmente na faixa entre pH 4,0 e 6,0 (ROMERO et al., 2001).

2.3.2. Cisteíno proteases (EC 3.4.22)

Cisteíno-proteases ocorrem tanto em procariotos como em eucariotos (RAO et al., 1998). Essas proteases são enzimas proteolíticas que agem na via de ataque nucleofílico do ânion sulfeto no sítio ativo (KUNAKBAEVA et al., 2003). O sítio ativo de uma cisteíno-protease é composto por um resíduo cisteína, um de asparagina e um de histidina na tríade-catalítica. O mecanismo de ação das cisteíno-proteases é muito semelhante ao das serino-proteases. A presença de um resíduo de asparagina conservado (Asn175) na proximidade com a histidina catalítica (His159) cria a tríade cisteíno-protease (Cys-His-Asn), que é considerada analoga à tríade Ser-His-Asp, arranjo encontrado em serino-proteases (RAO et al., 1998).

A Figura 2 ilustra o ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína ao carbono da carbonila do substrato, resultando num intermediário tetraédrico. Uma ligação covalente acil-enzima é formada após a clivagem da ligação peptídica. A hidrólise do acil-enzima leva a geração da enzima livre (BAIRD et al., 2006). Geralmente, cisteíno-proteases são ativas somente na presença de agentes redutores tais como HCN (Cianeto de hidrogenio) ou cisteína (RAO et al., 1998).

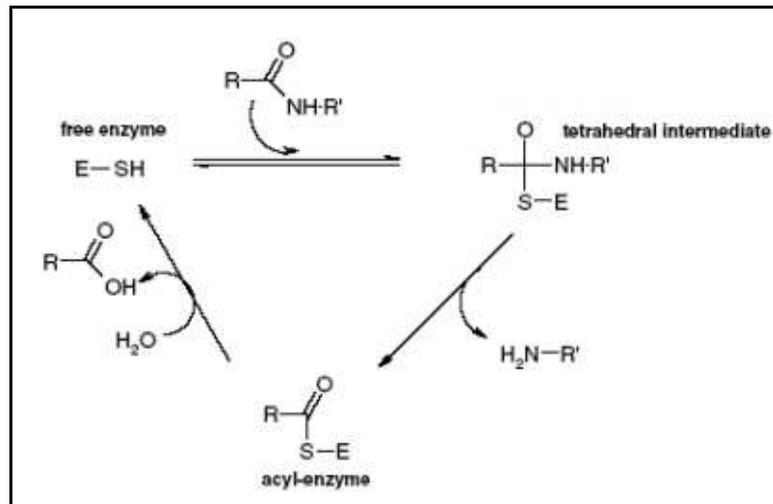


Figura 2. Mecanismo catalítico cisteína-protease (BAIRD et al., 2006).

As cisteína-proteases apresentam maior atividade em pH neutro, embora algumas delas, por exemplo, as proteases lisossomais, têm sua atividade maximizada em pH ácido (RAO et al., 1998). As cisteína-proteases são sensíveis a agentes sulfídicos, como o PCMB (p-chloromercuribenzoic acid), mas não são afetadas pela DFP (diisopropilfluorofosfato) e por agentes quelantes de metais. A massa molecular e o ponto isoelétrico das cisteína-proteases podem variar de acordo com organismo que as produzem.

2.4. Lipoxigenase (EC 1.13.11) e inibidores de proteases em plantas

As lipoxigenases catalisam a hidroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, formando ácidos graxos hidroxidados. Os principais substratos de LOX em plantas são o ácido linoleico e o linolênico. A característica mais importante da LOX na defesa de plantas é a oxidação do ácido linolênico em ácido jasmônico (JA) o qual permite a ativação da defesa direta de plantas tanto na produção de enzimas oxidativas (como PPO) e inibidores de proteases. Assim como a defesa indireta, através da produção de compostos orgânicos voláteis que atraem os inimigos naturais dos insetos pragas (WAR et al., 2011).

Os inibidores oferecem proteção à planta contra larvas de insetos herbívoros e patógenos e correspondem cerca de 6% do total de proteínas presentes em algumas sementes como da planta de soja (HILDEBRAND, 1989). A coevolução de inibidores de proteases de plantas e proteases de insetos é um interessante paradigma para pesquisas ecológicas, fisiológicas e bioquímicas. As plantas parecem ter desenvolvido

inibidores com extraordinárias propriedades contra proteases de insetos. São resistentes à proteólise e permanecem ativos sob diversas condições de pH, podendo inibir a maioria das classes de proteases conhecida (CHRISTELLER et al., 1992).

O entendimento da atividade proteolítica nos processos biológicos tem como pré-requisito o conhecimento da contribuição dos inibidores naturais de proteases para a regulação de sua atividade e o uso de inibidores sintéticos na caracterização dessa atividade. De acordo com o modo de ação, os inibidores podem ser enquadrados em dois grupos: inibidores sítio-específicos, que modifica irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo, e aquele que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como pseudo substratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais imitam o substrato, competindo com o mesmo na ligação com o sítio ativo das proteases (TRAVIS & SALVENSEN, 1983). Membros do primeiro grupo são inibidores de serino-proteases, como o diisopropilfosforidato e o fenilmetasulfonyl fluoreto, que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo, e clorometil cetona, derivada de aminoácidos e peptídeos que reagem com a histidina da tríade catalítica.

Os inibidores de proteases são, ainda, denominados de acordo com a protease inibida e/ou sua fonte, como, por exemplo, o inibidor de tripsina de soja. Agrupam-se, também, em famílias, as quais podem receber o nome do pesquisador que primeiro o identificou. As famílias mais citadas são de Kunitz (inibidor de tripsina pancreático e inibidor de tripsina de soja), a Kazal (inibidor de tripsina a de secreção pancreática), a de inibidores Bowman-Birk, a família de inibidor de batata I e a do inibidor de batata II (LASKOSWSKI & KATO, 1980).

Em plantas, o relato pioneiro de inibidor de protease ocorreu em 1938, por Read & Haas, e os primeiros trabalhos estavam relacionados à nutrição animal. Os efeitos deletérios dessa categoria de proteínas encontradas em muitas plantas utilizadas na dieta de animais para abate as tornaram inicialmente conhecidas como fatores antinutricionais (WESTFALL & HAUGE, 1948). Os inibidores de tripsina concentram o maior número de pesquisas no assunto, por ela ser uma importante serino-protease do trato digestivo de animais. Até hoje, as famílias Solanaceae, Fabaceae, Graminae são as mais estudadas quanto à atividade de inibidores por serem importantes fontes de alimento (MOSOLOV & VALUEBA, 2008).

O primeiro inibidor de plantas bem caracterizado foi o de tripsina em soja (KUNITZ, 1947), que foi isolado, cristalizado e complexado com tripsina suína, servindo como o primeiro modelo clássico metodológico para a bioquímica de

inibidores de proteases. Atualmente, é conhecida a sequência completa de aminoácidos da maioria dos inibidores já identificados.

É generalizada a presença de inibidores em órgãos de reserva de plantas, como sementes e tubérculos, onde podem atuar como agentes regulatórios de proteases endógenas, como proteínas de reserva e como mecanismo de proteção direto contra proteases e/ou de microrganismos patogênicos. São encontrados em paredes celulares, espaços intercelulares, no citossol e no vacúolo (KAPUR et al., 1989)

2.5. Polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1)

As polifenoloxiades (1,2-benzenediol: oxygenoxidoreductase, EC 1.10.3.1) (ENZYME NOMENCLATURE, 2007) ocorrem em plantas, animais e fungo (WHITAKER, 1994). Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas. As polifenoloxidasas atuam sobre uma grande variedade de substratos, entre eles, o p-cresol, tirosina e ácido p-cumarico, como substratos fenólicos, e o catecol, hidroxifenilalanina e ácido clorogênico, como substratos difenólicos. As PPOs são enzimas que frequentemente aumentam sua atividade em resposta ao estresse, e um de seus principais papéis parece ser o de promover a proteção da célula (SOARES et al., 2004). Participa de um variado número de reações, e por esta razão exibe um dos graus de maior versatilidade que qualquer outra enzima (TROIANI et al., 2003). Podem catalisar inúmeras reações de oxidação nas plantas (McLELLAN & ROBINSON, 1984), embora a peroxidase também esteja envolvida na oxidação enzimática (VALERO et al., 1988). A importância das atividades das PPOs na resistência a herbívoros deve-se, provavelmente, à propriedade de oxidar compostos fenólicos em quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento. As PPOs estão envolvidas no escurecimento de frutas, vegetais, cereais e leguminosas (GOMES et al., 2001). A mudança indesejável na cor, no sabor e na textura das frutas e dos vegetais, é associada com a PPO, que pertence às enzimas oxidoreductases (CLEMENTE & PASTORE, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a relação entre a resposta defensiva de *C. arabica* mediante as vias das lipoxigenases e polifenoloxidasas e o processo de herbivoria de *L. coffeella*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade das enzimas proteolíticas do sistema digestivo de *L. coffeella* no processo de herbivoria em *C. arabica*;

Avaliar a atividade das lipoxigenases, polifenoloxidasas e a produção de inibidores de proteases em *C. arabica*, na presença e ausência de injúrias de *L. coffeella*;

Correlacionar às atividades enzimáticas e a produção de inibidores de *C. arabica* com a atividade das enzimas proteolíticas do sistema digestivo de *L. coffeella*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na casa de vegetação do Departamento de Entomologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde as plantas do cafeeiro foram mantidas sem o contato com outros herbívoros. Os adultos de *L. coffeella* utilizados foram obtidos da criação pertencente ao grupo de pesquisa em Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia da UFV.

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV.

4.1. Experimentação

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições (plantas) e dois tratamentos (T1= Plantas do cafeeiro infestadas (presença de *L. coffeella*) e T2= Plantas não infestadas (ausência de *L. coffeella*)). Cada tratamento foi mantido em uma gaiola de criação (130x70 cm) dentro da casa de vegetação (26,5 °C e 60% UR) (Fig. 3 A, B).

Na gaiola do tratamento um (1) foram liberados cerca de 200 adultos de *L. coffeella*, para a infestação das plantas (tempo 0), os adultos foram alimentados com uma solução de sacarose, para garantir a sobrevivência deles e a oviposição nas folhas do cafeeiro. Depois de verificar que os adultos ovipositaram nas folhas, com o auxílio de uma lanterna (W) e uma lupa de mão, acompanhou-se o desenvolvimento do ovo até a eclosão das larvas, que foi de 15 dias. No décimo sexto dia foram observadas as galerias feitas pelo inseto e após mais cinco dias (tempo 1) as larvas já atingiram o estágio necessário para a realização das análises (quarto instar), sendo então retiradas das folhas 12 lagartas por planta. Em total, as plantas de *C. arabica* foram expostas ao bicho-mineiro durante 20 dias. Para a avaliação das plantas foi realizada em dois momentos, o primeiro considerado tempo 0, antes da infestação, e o tempo 1, após os 20 dias da infestação, como foi especificado anteriormente. Em cada avaliação foram coletadas três folhas atacadas, com base em testes pilotos, para serem utilizadas nas análises da atividade de lipoxigenases e de polifenoloxidade e para determinação da quantidade de inibidores de proteases presentes nestas plantas. As amostras foram

armazenadas em nitrogênio líquido e levadas para o laboratório, onde o material vegetal e os insetos foram mantidos a -80°C , para análises posteriores.



Figura 3. Metodologia de experimentação: gaiolas de criação onde foram cultivadas as plantas e conduzido o experimento (A e B). Coleta das lagartas de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (C).

4.2. Análises da atividade enzimática em *Leucoptera coffeella*

4.2.1. Extrato enzimático

De acordo com Duarte et al. (2009), a quantidade de lagartas idônea para a obtenção das melhores leituras de concentração de proteínas são entre 12 e 13 indivíduos. Então, coletaram-se 12 lagartas de *L. Coffeella*, no quarto instar, que foram armazenadas em eppendorf (1,5 mL). No laboratório, os insetos foram maceradas com bastão de vidro estéril, adicionado 1mL de solução $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$ a 4°C e centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel, chamado de extrato bruto, foi utilizado para análises posteriores.

4.2.2. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA), na faixa de concentração de 0 a 25 mg/mL para obtenção da curva padrão.

4.2.3. Determinação de atividade de serino-proteases

4.2.3.1. Tripsina-like

A atividade amidásica foi determinada segundo o método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se o substrato cromogênico para tripsina-like L-BApNA (N- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25°C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500 μ L de substrato e 100 μ L de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹cm⁻¹. A partir dos valores de absorbância obtidos a 410 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos, usando a fórmula abaixo:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde:

A₄₁₀= Absorbância a 410 nm;

ϵ = 8800 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar);

t= 150 segundos (tempo de incubação); e

l= 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (μ M/s) pela concentração de proteína (mg/mL).

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato L-TAME (N- α -Tosyl-L-argininemethylesterhydrochloride) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl₂. A mistura reacional

consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500 µL de substrato e 100 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 247 nm por 2,5 minutos, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹.cm⁻¹. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em µM/s, a partir da seguinte fórmula:

$$A = \frac{A_{247}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₂₄₇= Absorvância a 247 nm;

ε= 540 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar);

t= 150 segundos (tempo de incubação); e

l= 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades pela concentração de proteína (mg/mL).

4.2.3.2. Quimotripsina-like

A determinação da atividade amidásica de quimotripsina foi realizada utilizando-se o substrato cromogênico para quimotripsina-like L-BTpNA (N-Benzoil-L-tyrosine p-nitroanilide) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500 µL de substrato e 100 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. Seguiu-se o método proposto por Erlanger et al. (1961). A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹.cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em µM/s, empregando a fórmula abaixo:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₄₁₀= Absorvância a 410 nm;

ε= 8800 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar);

t= 150 segundos (tempo de incubação); e

l= 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades pela concentração de proteína (mg/mL).

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato ATEE (N-Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl₂. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500 µL de substrato e 100 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 247 nm por 2,5 minutos. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em µM/s, e atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades pela concentração de proteína (mg/mL).

4.2.4. Determinação de atividade de cisteíno proteases

A atividade amidásica de cisteíno-proteases foi realizada com base no método de Erlanger et al. (1961) e modificações sugeridas por Mendonça et al. (2011). Usou-se 500 µL do substrato L-BapNA na concentração final de 0,5 mM, a 25°C e 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2; contendo 20 mM de CaCl₂ e 5 mM de Ditioneitol (DTT) para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Em 50 µL do extrato foi adicionado 100 µL do inibidor de serino-protease benzamidina na concentração final de 1 mM, a qual corresponde a constante de dissociação (k_i) de tripsinas-like por benzamidina. A reação foi realizada durante 2,5 minutos, com leitura de absorbância a 410 nm a cada 30 segundos. Para a determinação da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, p-nitroanilina, 8800 M⁻¹.cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em µM/s, utilizando a fórmula abaixo:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₄₁₀= Absorvância a 410 nm;

ε= 8800 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar);

$t = 150$ segundos (tempo de incubação); e

$l = 1,0$ cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades entre a concentração de proteína (mg/mL).

4.2.5. Determinação de atividade de proteases totais

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli et al. (1949), utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0; 37°C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos plásticos de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25°C, para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. As absorbâncias foram determinada a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas totais expressadas em mg/mL para a obtenção da atividade específica. O experimento foi realizado em triplicatas.

4.3. Atividade enzimática do café

4.3.1. Extrato foliar

As folhas foram limpas com o auxílio de um pincel para retirada das lagartas, em seguida elas foram cortadas, com o auxílio de uma tesoura, acondicionadas imediatamente em envelopes de alumínio e colocadas em caixas de isopor, onde foram cobertas de nitrogênio líquido e transportadas ao Laboratório de Enzimologia-BIOAGRO.

Uma amostra de folha foi pesada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (empregando três folhas por planta, uma folha para cada análise). Em seguida, foi triturada a folha no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinil polipirrolidona (PVPP) 2% (p/v), ou seja, 2 g de PVPP para cada 100 mL de

meio de extração. Posteriormente, macerou-se a amostra e empregou-se o tampão de extração específico para cada enzima.

Para o análises de Inibidores de proteases, foi empregado Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 e 20mM CaCl₂. Para a atividade lipoxigenase nas folhas foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5 e para as polifenoloxidasas, tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 6,5 foi empregado. Em todos os extratos, para as atividades enzimáticas e os inibidores, emregou-se o tampão na proporção 1:5 (p/v) em todos os casos, isto é, a cada 1g de material vegetal foram adicionados 5 mL de tampão. O extrato foi homogeneizado e colocado em eppendorf de 2 mL e em seguida centrifugado a 20000 g por 60 minutos a 4°C (BATISTA et al., 2002). O sobrenadante foi utilizado para os análises espectrofotometricos.

4.3.2. Quantificação de inibidores de proteases

A presença de inibidores de proteases no extrato foliar foi determinada utilizando tripsina purificada. A determinação da atividade tríptica foi baseada no seguinte procedimento analítico: 50 µL do extrato foliar; 550 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M, adicionados em um eppendorf de 1,5 mL. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro eppendorf, 500 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M.

A mistura contida em cada tubo (teste e controle da enzima) foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, esse volume foi misturado com outro tubo contendo 500 µL Tris-HCl 0,1M pH 8,2; 20 mM de CaCl₂ e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm a cada 30 segundos e durante 2,5 minutos de reação.

A determinação da concentração de proteína do extrato foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando como padrão uma solução de 10 mg/mL de soro albumina bovina (BSA). Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína de acordo com a seguinte equação:

$$mg \text{ de tripsina inibida/ grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1000 \times P}$$

em que:

A= A diferença entre a absorvância do controle menos a do teste, ambas a 410nm;

B= Diluição da amostra;

P= Concentração de proteína dos extratos (mg/mL); e

C= Fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 μ L de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA dará a leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (KAKADE et al., 1974).

4.3.3. Determinação da atividade de lipoxigenase

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod et al. (1981). Nesse método é determinado o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Foi preparada uma solução estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer, envolvido por papel alumínio, contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, adicionou-se 78 μ L de ácido linoléico e 90 μ L de tween 20 (SIGMA). Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática, tomando o cuidado para não formar bolhas. Para clareamento da solução foram adicionadas gotas de NaOH 0,5 M. Logo após, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL envolvido por papel alumínio e o volume aferido. A solução estoque de linoleato de sódio foi armazenada em eppendorf de 1,5 mL com tampa, envolvidos em papel alumínio e armazenados a -20°C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases misturou-se 20 μ L do extrato bruto foliar e 4,0 μ L da solução estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada a cada 30 segundos a 234 nm por período de 2,5 minutos. Sob as mesmas condições, quantidades iguais de substrato e tampão que foram utilizadas no teste serviram, também, para a análise de controle (branco da reação). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A determinação da concentração de proteína do extrato foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando como padrão uma solução de 1 mg/mL de soro

albumina bovina (BSA). A partir dos valores de absorvância obtidos a 234 nm foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, usando a seguinte fórmula:

$$A = \frac{A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde:

A₂₃₄= Absorvância a 234 nm;

ϵ = 25000 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm);

t= 120 segundos (tempo de incubação); e

l= 1,0 cm (caminho ótico).

4.3.4. Atividade de polifenoloxidasas

A atividade de PPO nas amostras foi determinada conforme método descrito por KAR & MISHRA (1976). A mistura de reação contendo 960 µL da solução de substrato catecol 0,2 M foi levada ao banho-maria, à 25°C para estabilização por aproximadamente quatro minutos. Após este tempo acrescentou-se 40 µL do extrato vegetal. O aumento da absorvância foi registrado no comprimento de onda 410 nm, em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante o período de 2,5 minutos, com intervalos de 30 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar 1,47 Mm⁻¹.cm⁻¹. Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteína no extrato e foram expressos em M.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

4.4. Análises estatísticas

Foram realizadas análises descritivas (média e desvio padrão) nos parâmetros avaliados nas plantas e nos insetos. Teste de Shapiro-Wilks foi aplicado para verificar se os dados obtidos satisfazem os pressupostos de normalidade. Quando atendido o pressuposto de normalidade e homocedasticidade, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) ($\alpha=5\%$) a fim de verificar se existiam diferenças significativas entre as

atividades enzimáticas com os diferentes substratos testados para tripsina-like (L-BApNA e L-TAME) e quimotripsina-like (BTpNA e ATEE) do intestino dos insetos.

Para verificar a diferença entre plantas infestadas (PI) e não infestadas (PNI) em relação à produção de inibidores e a atividades enzimáticas de LOXs e PPOs aplicou-se a ANOVA. Estas variáveis foram analisadas a partir da diferença média entre o tempo zero e o tempo 1 para cada tratamento.

Determinou-se a associação ou independência entre as variáveis analisadas nas plantas, assim como sua relação com as variáveis analisadas no bicho-mineiro. Para isso aplicou-se a correlação de Pearson, a qual gera um valor “r” que pode oscilar entre +1 e -1, onde um valor de r +1 indica uma perfeita associação, 0 (zero) ausência de associação e -1 uma perfeita associação negativa das variáveis. Para analisar se existe um efeito do sistema de defesa nas plantas do cafeeiro na atividade proteolítica do inseto, foi feita uma análise de componentes principais (ACP) para determinar algumas relações entre as variáveis. Todas as análises foram realizadas utilizando os software de estatística R-3.2. e PAST 1,63.

5. RESULTADOS

5.1. Análises da atividade enzimática em *Leucoptera coffeella*

5.1.1. Atividade de serino-proteases (Tripsina-like e Quimotripsina-like)

A atividade de tripsina-like em *L. coffeella* determinada mediante a reação com os substratos L-BApNA e L-TAME foi de $0,01 \pm 0,005$ e $0,33 \pm 0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, respectivamente (Fig. 4A). A capacidade catalítica da tripsina (obtida com base no número de moléculas detectáveis produzidas por uma unidade de enzima), entre os dois substratos empregados, foram estatisticamente diferentes ($F= 9,58$; $p= 7,35 \times 10^{-5}$) (Fig. 4A).

A atividade de quimotripsina-like em *L. coffeella* utilizando os substratos BTpNA e ATEE foi de $0,03 \pm 0,03$ e $0,01 \pm 0,002 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, nesta ordem (Fig. 4B). Não houve diferença significativa na capacidade catalítica da quimotripsina entre os substratos empregados ($F= 1,57$; $p= 0,166$) (Fig. 4B).

5.1.2. Determinação de atividade de cisteíno proteases e proteases totais

A atividade das enzimas cisteíno-proteases no intestino do bicho-mineiro variou de 0,007 a 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, com média de $0,009 \pm 0,002 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína.

A concentração de proteases totais no intestino do bicho-mineiro foi de 0,7340 $\pm 0,16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$, com variação entre 0,54 e 0,89 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$.

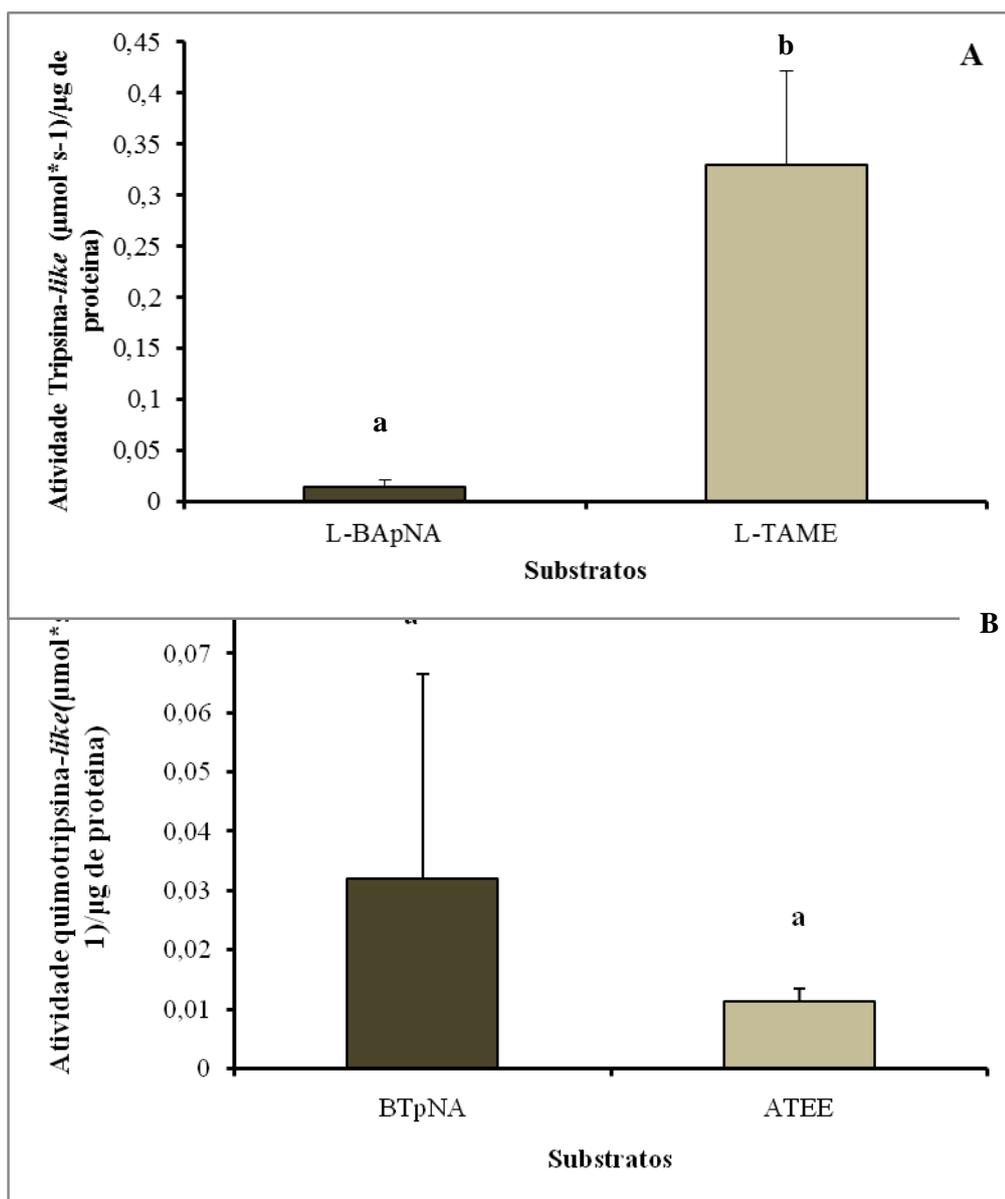


Figura 4. Atividade específica de tripsina-like mediante hidrolises dos substratos L-BApNA e L-TAME (A) e quimotripsina-like usando os substratos BTPNA e ATEE (B) nas larvas de quarto instar de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Viçosa, MG. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Embora as enzimas examinadas sejam produtos de processos independentes, elas agem juntas, e fatores regulatórios coordenam a sua atividade, de modo que algumas correlações entre as atividades enzimáticas analisadas foram encontrados e são apresentados na Figura 5.

A partir da análise de componentes principais (ACP) realizada em função das atividades enzimáticas no intestino do bicho-mineiro, o componente 1 apresentou a variabilidade mais alta (53,23%) e conseqüentemente o maior poder explicativo dos

dados. Este componente está caracterizado pela maioria dos fatores analisados como tripsina-like, usando L-BApNA e L-TAME, quimotripsina-like, utilizando L-ATEE e L-TAME, e a concentração de proteases totais. Além disso, observou-se que os valores da atividade de tripsina-like podem estar relacionados como a concentração de proteases no intestino de *L. coffeella* (Fig. 5).

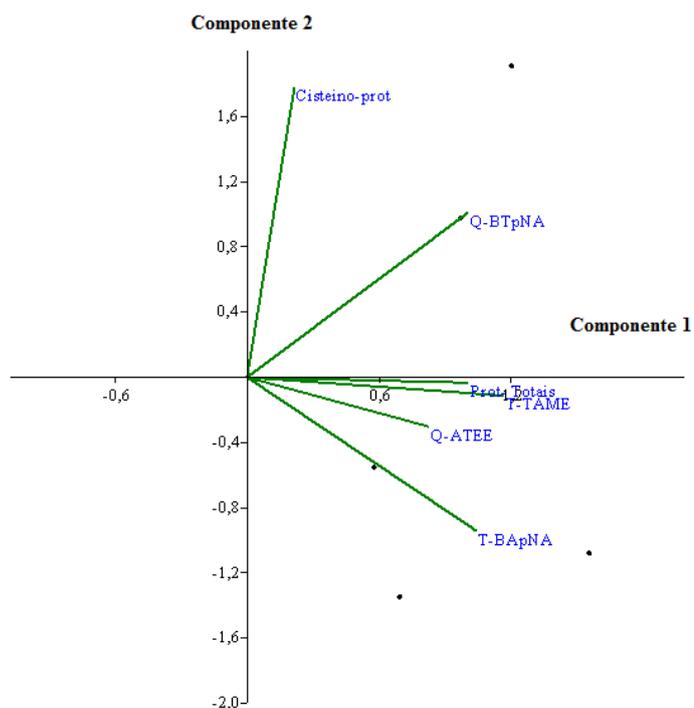


Figura 5. Análises de componentes principais (ACP) para as variáveis analisadas (Tripsina-like, quimotripsina-like, cisteíno-proteases e proteases totais) em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), Viçosa, MG. Tripsina-like usando L-BApNA (T-BApNA) e L-TAME (T-TAME). Quimotripsina usando BTpNA (Q-BTpNA) e ATEE (Q-ATEE) e proteases totais (Prot-Totais).

No segundo componente, explica-se que 21,92% da variabilidade total, que está representado só pelos valores da atividade de cisteíno-proteases, mostraram que é um tipo independente de atividade proteolítica no bicho-mineiro (Fig. 5).

5.2. Respostas defensivas de *Coffea arabica*

A atividade de lipoxigenase no tratamento 1 (PI) foi de $11,65 \pm 4,4$ e $45,08 \pm 18,8 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} / \mu\text{g}$ de proteína, antes do processo de infestação com *L. coffeella* (tempo 0) e após a infestação (tempo 1), respectivamente. Estas plantas apresentaram diferenças significativas para esta variável, sendo observado um aumento considerável

nos valores de lipoxigenase ($F= 3,703$; $p= 0,02$). Nas plantas não infestadas (PNI), que foram as plantas controle, a atividade inicial de lipoxigenase foi de $43,78 \pm 11,04 \mu\text{mol}^*\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína e depois foi de $60,76 \pm 9,83 \mu\text{mol}^*\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, sendo estatisticamente iguais ($F= 3,12$; $p= 0,16$).

A diferença média da atividade de lipoxigenase nas plantas infestadas (PI) com *L. coffeella* entre o tempo 0 e tempo 1 foi de $33,45 \pm 7,2 \mu\text{mol}^*\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína e nas plantas não infestadas esta foi de $15,97 \pm 5,8 \mu\text{mol}^*\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, ou seja, as plantas infestadas apresentaram um aumento significativo desta atividade ($F= 29,4$ $p= 0,00022$) (Fig. 6).

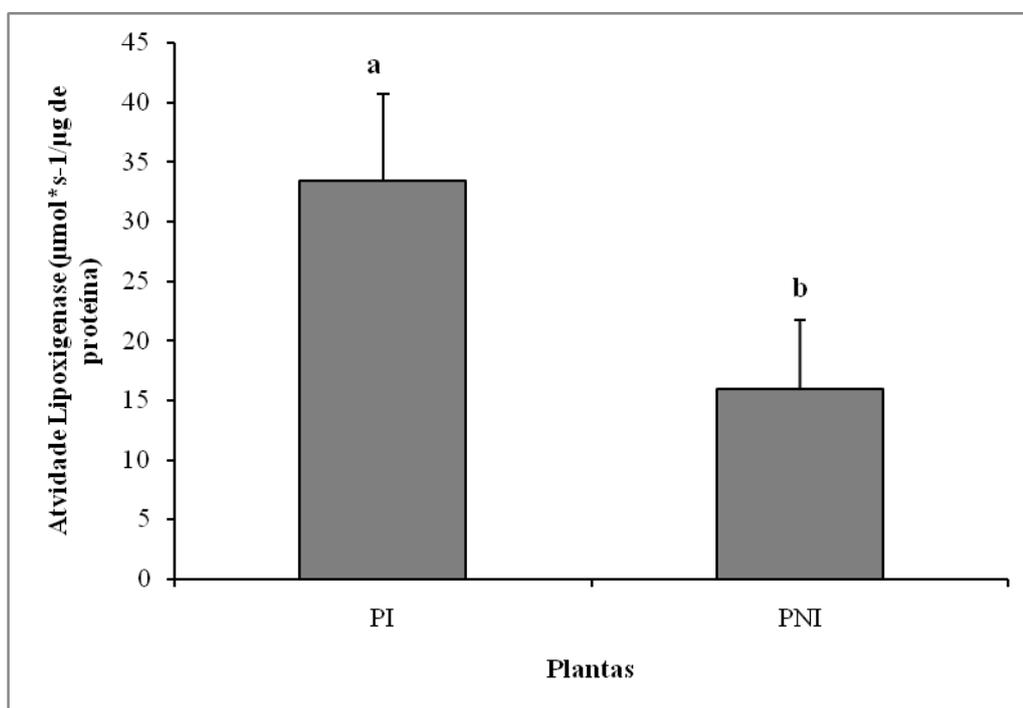


Figura 6. Diferença da variação da atividade lipoxigenase entre o tempo 0 e tempo 1 nas plantas de *Coffea arabica* não infestadas (PNI) e infestadas (PI) por *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

A quantidade de inibidores de proteases, no cafeeiro utilizadas no tratamento 1 (PI) foi de $325,3 \pm 125,5$ e $1123,7 \pm 359,7$ mg trip inibida/g de proteína, antes do processo de infestação com *L. coffeella* (tempo zero) e após infestação (tempo 1), respectivamente. Estas plantas apresentaram diferenças significativas para esta variável, sendo observado um aumento considerável nos valores de inibidores de proteases ($F= 5,64$; $p= 0,004$).

Nas plantas não infestadas (PNI), que foram as plantas controle, a quantidade inicial de inibidores de proteases foi de $857,3 \pm 365,2$ mg tripsina inibida/g de proteína e

depois foi de $1.290,0 \pm 419,8$ mg tripsina inibida/g de proteína, não sendo estatisticamente diferentes ($F= 2,56$; $p= 0,062$).

A diferença média dos inibidores de proteases nas plantas infestadas (PI) com *L. coffeella* entre o tempo zero e tempo 1 foi de $798,5 \pm 52,3$ mg tripsina inibida/g de proteína e nas plantas não infestadas, esta diferença foi de $433,6 \pm 57,8$ mg tripsina inibida/g de proteína, ou seja, as plantas infestadas apresentaram um aumento significativo na quantidade de inibidores (Fig. 7). Diferenças significativas foram observadas entre estas médias ao realizar a análise ANOVA ($F= 9,64$ $p= 0,0022$) (Fig. 7).

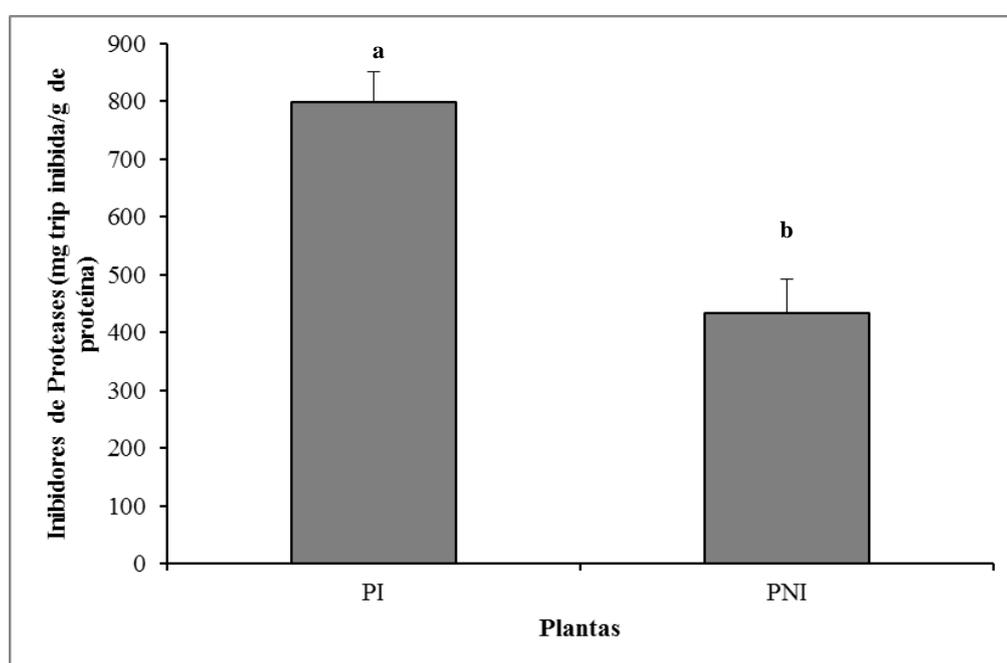


Figura 7. Diferença média dos inibidores de proteases em *Coffea arabica* infestadas (PI) e não infestadas (PNI) com *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) entre o tempo zero e tempo 1. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

A atividade de polifenoloxidasas, no cafeeiro utilizadas no tratamento 1 (PI) foi de $0,822 \pm 0,21$ e $3,537 \pm 0,35$ $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, antes do processo de infestação com *L. coffeella* (tempo zero) e após infestação (tempo 1), respectivamente. Estas plantas apresentaram diferenças significativas para esta variável, sendo observado um aumento considerável nos valores de polifenoloxidase ($F= 5,64$ $p= 0,005$).

Nas plantas não infestadas (PNI), que foram as plantas controle, a atividade inicial de polifenoloxidasas foi de $3,43 \pm 0,77$ $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína e depois foi de

$5,17 \pm 0,99 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, não sendo estatisticamente diferentes ($F= 3,12$, $p= 0,16$).

A diferença média da atividade de polifenoloxidasas nas plantas infestadas com *L. coffeella* entre o tempo 0 e 1 foi de $2,71 \pm 0,07\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína e nas plantas não infestadas esta foi de $1,74 \pm 0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\mu\text{g}$ de proteína, ou seja as plantas infestadas apresentaram um aumento significativo nesta atividade ($F= 8,41$ $p= 0,00022$) (Fig.8).

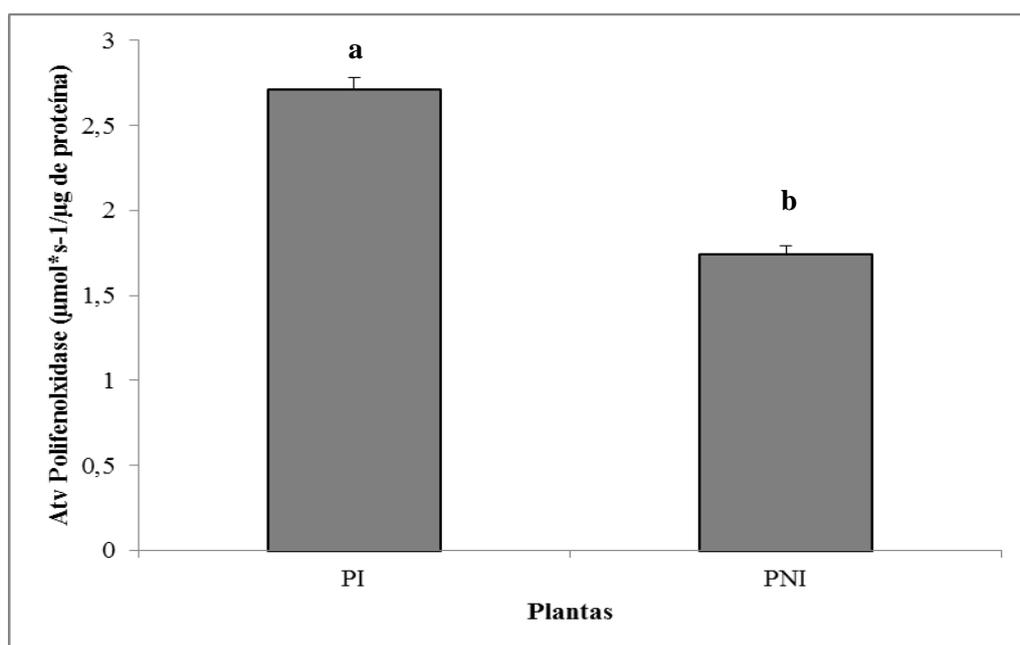


Figura 8. Diferença da variação da atividade polifenoloxidasas entre o tempo 0 e 1 nas plantas de *Coffea arabica* infestadas (PI) e não infestadas (PNI) por *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Com base na análise de correlação (r) das atividades enzimáticas do café verificou-se significância entre a atividade de LOX e PPO, ou seja, estas enzimas foram relacionadas diretamente ($r= 0,795$; $p= 0,032$) (Fig. 9).

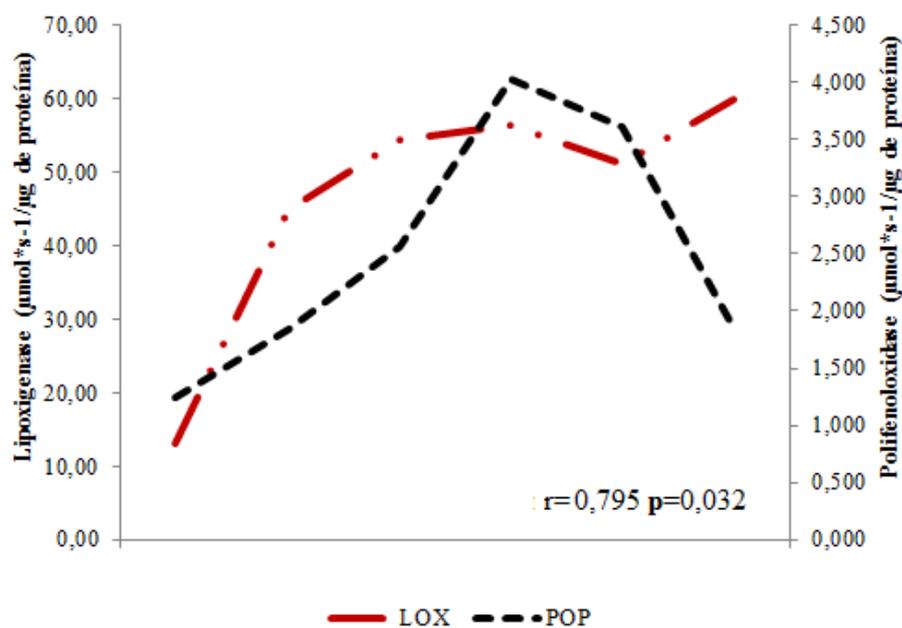


Figura 9. Correlação de Pearson (rs) entre a atividade das enzimas lipoxigenases (LOX) e polifenoloxidasas (PPO) de *Coffea arabica* (correlação significativa: $p < 0.05$).

5.3. Defesa do cafeeiro Vs atividade proteolítica de *Leucoptera coffeella*

A partir da ACP constatou-se que o componente 1 apresentou a variância mais alta (62,18%) e conseqüentemente o maior poder explicativo dos dados. Este componente foi caracterizado pelos valores de quimotripsina-like usando BTpNA do inseto e a atividade de LOX nas plantas (Fig. 10).

No componente 2 explicou-se 26,67% da variância total, e este foi representado pela maioria dos fatores analisado, caracterizado pelos valores de inibidores de proteases, a atividade da PPO nas plantas e pela atividade de tripsina-like e quimotripsina usando ATEE (Fig. 10).

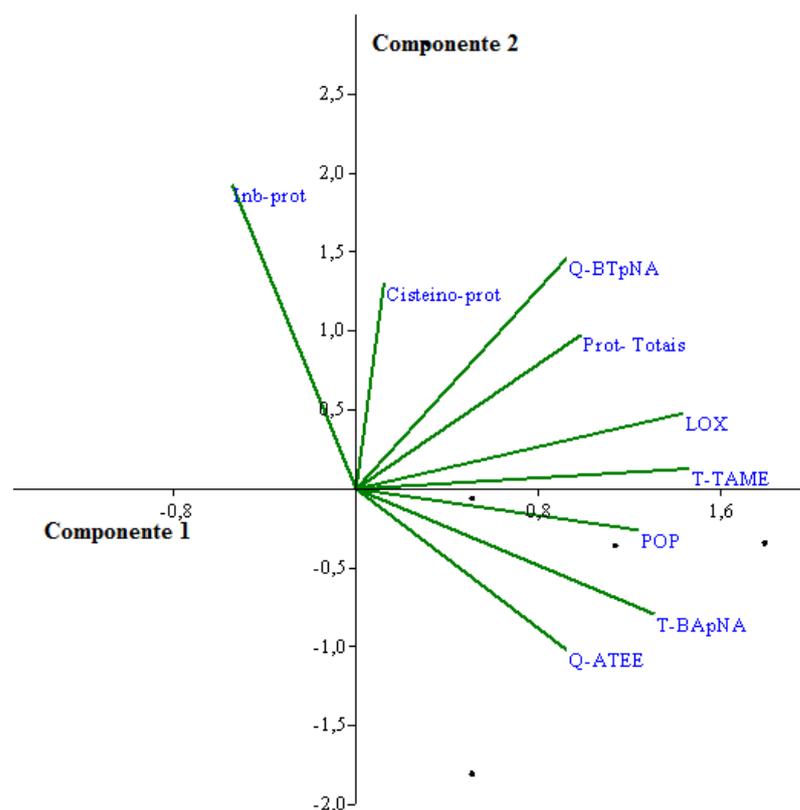


Figura 10. Análises de componentes principais (ACP) para as variáveis de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (tripsina-like, quimotripsina-like, cisteíno-proteases e proteases totais) e em *Coffea arabica* (Inibidores de proteases, atividade de lipoxigenases e polifenoloxidasas). Inibidores de proteases (Inb-prot), atividade de lipoxigenase (LOX) polifenoloxidasas (PPO), tripsina-like usando L-BApNA (T-BApNA) e usando L-TAME (T-TAME) quimotripsina usando BTpNA (Q-BTpNA) e usando ATEE (Q-ATEE), proteases totais (Prot-Totais).

Com base nas relações encontradas a partir destas análises verificaram-se que entre os inibidores de proteases produzidos pelas plantas e a atividade de quimotripsina-like (Q-ATEE) houve uma relação inversa, ou seja, quando os valores de inibidores de proteases no cafeeiro foram, altos existiu uma diminuição da atividade quimotríptica no bicho-mineiro. Além disso, determinou-se uma relação positiva entre a atividade LOX e PPO nas plantas com a atividade de tripsina-like (L-TAME). As polifenoloxidasas apresentaram também uma relação positiva com a atividade de tripsina-like usando substrato L-BApNA (T-BApNA).

Estas relações encontradas com as análises de componentes principais foram confirmadas através da correlação de Pearson (Tabela 1), a qual gerou uma medida da associação ou da independência entre as variáveis, tanto no inseto como nas plantas. Uma correlação negativa foi encontrada entre os inibidores de proteases e a quimotripsina-like usando ATEE (Q-ATEE) ($r = -0,828$; $p = 0,03$) (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação de Pearson (r) entre os inibidores de proteases (Inb-prot), lipoxigenases (LOX) e polifenoloxidades (PPO) determinadas em cafeeiro e a de atividade tripsina-like (T-BApNA e T-TAME), quimotripsina-like (Q-BTpNA e Q-ATEE), cisteíno-proteases (Cisteíno-prot) e proteases totais (Prot-Totais) analisadas em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae).

Variáveis	Inb-prot		LOX		PPO	
	r	p	r	p	r	p
T-BApNA	-0,428	0,355	0,485	0,355	0,885	0,016*
T-TAME	-0,314	0,563	0,6	0,033*	0,828	0,033*
Q-BTpNA	0,028	1	0,714	0,136	0,485	0,291
Q-ATEE	-0,828	0,03*	0,085	0,802	0,428	0,355
Cisteíno-prot	0,371	0,419	0,257	0,538	-0,08	0,535
Prot- Totais	0,314	0,563	0,942	0,002*	0,371	0,355

*correlação significativa: $p < 0,05$

A atividade PPO no cafeeiro esteve relacionada positivamente apenas com a atividade trípica das serino-proteases usando substrato L-TAME ($r = 0,885$; $p = 0,016$) e L-BApNA ($r = 0,828$; $p = 0,033$). Enquanto a atividade LOX foi relacionada positivamente com a tripsina-like (L-TAME) ($r = 0,6$; $p = 0,033$) e com as proteases totais do bicho-mineiro ($r = 0,942$; $p = 0,002$) (Tabela 1).

Os valores significativos da correlação encontrados foram superiores a 0,6; o que significa que estas variáveis foram correlacionadas no mínimo a 60%, gerando a confiabilidade nos dados.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análises da atividade enzimática em *Leucoptera coffeella*

Os substratos L-BApNA e L-TAME, do tipo amidásico e esterásico, respectivamente, são utilizados para determinar a atividade de tripsinas. Existem evidências suficientes de que a maioria das enzimas presentes no intestino médio dos insetos que hidrolisa estes substratos é do tipo tripsina-like (TERRA & FERREIRA, 1994) e estes substratos foram eficientes na determinação desta atividade no intestino de *L. coffeella* (Fig. 4A).

As reações catalisadas pelas serino-proteases possuem uma etapa de acilação lenta durante sua atividade amidolítica formando acil-enzima, seguida pela formação do produto a partir de uma desacilação rápida, enquanto que o oposto acontece durante a atividade esterolítica (INAGAMI, 1972; FASTREZ & FERSHT, 1973). Além disso, o passo determinante da velocidade da hidrólise amidásica realizada por tripsina-like é a aciliação, enquanto que na hidrólise éster é a desacilação com consequente formação do produto (FASTREZ & FERSHT, 1973). Este mecanismo pode explicar a maior capacidade catalítica de tripsina-like encontrada com L-TAME (Fig. 4A).

Em outros lepidópteros herbívoros a maioria dos trabalhos analisou a atividade amidolítica ou esterolítica (ORTEGO et al., 1996; BROADWAY, 1989). Entretanto Oliveira et al. (2005) e Xavier et al. (2005), avaliando L-BApNA e L-TAME, verificaram que a tripsina-like em *A. gemmatalis*, na soja, apresentou maior eficiência catalítica para o substrato esterolítico o qual também foi relacionado ao mecanismo de reação da enzima, assim como observamos no bicho-mineiro (Fig. 4A). No trabalho realizado em bicho-mineiro avaliando atividade tripsina-like usaram só o substrato L-BApNA (ROSSI et al., 2009). Assim, este é o primeiro trabalho a realizar a comparação da atividade amidolítica e esterolítica em tripsina-like do bicho-mineiro, contribuindo para o esclarecimento da proteólise nestes insetos.

A atividade de quimotripsina-like em larvas de lepidópteros, com base na hidrólise de BTpNA, ATEE e outros substratos, pode estar reduzida ou completamente ausente (CHRISTELLER et al., 1992; MCMANUS & BURGESS, 1995). Assim, a presença reduzida de atividade quimotripsina-like, no bicho-mineiro, com os dois substratos utilizados (ATEE e BTpNA) (Fig. 4B) esta em concordância com o observado em outras lepidópteras .

Os substratos (ATEE e BTPNA) foram hidrolisados por esta enzima no intestino de *L. coffeella* (Fig. 4B). A igualdade na hidrólise destes substratos pode ser devido ao fato de que existem quimotripsinas-like, onde seu centro ativo é mais "universal", ou seja, diferentes substratos (por exemplo, esterásicos e amidásicos ou curtos e longos) podem ser utilizados (STYGAR et al., 2010). Johnston et al. (1995) confirmou a eficiência do substrato BTPNA para quimotripsina-like quando determinou a atividade proteolítica no intestino de larvas de *H. virescens*. Enquanto que Tamir et al. (1996) comprovaram que o substrato ATEE é hidrolisado, também, por esta enzima e foi empregado para determinar sua atividade esterásica. Assim, fica claro que estes substratos podem ser empregados para caracterizar a atividade de quimotripsina-like. valores de atividade encontrados em quimotripsina-like sugerem que ambos

De forma geral, as atividades de endoproteases (tripsina e quimotripsina) relativamente baixas no intestino de *L. coffeella* (Fig. 4) sugerem que as proteínas das folhas não foram utilizadas de forma eficiente e é possível que o nível de aminoácidos livres e as proteínas solúveis de baixo peso molecular sejam suficientes para o desenvolvimento inicial das larvas, como foi demonstrado por Stygar et al. (2010) nas larvas de *C. ohridella* em plantas de castanhas, que apresenta hábito alimentar semelhante ao do ao bicho-mineiro.

Os dados obtidos indicam que o total da atividade proteolítica em *L. coffeella* foi representado pela atividade esterásica da tripsina-like, sendo esta aproximadamente 33 vezes maior do que a quimotripsina-like (Fig. 4). Resultados semelhantes, nos quais a atividade de tripsina foi maior que a quimotripsina-like, foram obtidos para a *Pyralis interpunctella* (Pyrilidae) (Hübner), *Heliotis zea* (Noctuidae) (Boddie), *Parnassius apollo* (Papilionidae) (Linnaeus) (NAKONIECZNY et al., 2007; LENZ et al., 1991), e *C. ohridella* (Gracillariidae) (STYGAR et al., 2010).

Os parâmetros bioquímico-cinéticos de serino-proteases do extrato solúvel e ligadas à membrana celular do intestino médio da lagarta-da-soja são conhecidos (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005). O segundo grupo de proteases funcionais que exercem papel significativo na digestão de proteínas desta lagarta são as cisteíno-proteases (TERRA & FERREIRA, 1994). Ao comparar os valores entre cisteíno e serino-proteases (tripsina e quimotripsina-like) em *L. coffeella* encontrou-se que os valores de atividade de cisteíno-proteases foram iguais a os encontrados em

quimotripsina-like (ATEE e BTpN) e atividade amidásica (L-BApNA) de tripsina-like. Desse modo podemos inferir que o bicho-mineiro apresenta atividade de cisteíno-proteases em igual proporção que a atividade serino-proteasica de tipo amidásica no intestino. Entretanto existe a necessidade de novos estudos mais específicos na cinética destas enzimas para compreendermos o seu mecanismo de ação. Até o momento, não havia relatos na literatura de estudos sobre a caracterização da atividade cisteíno-proteases de *L. coffeella*, iniciando-se, assim, os primeiros dados sobre estas enzimas e seu papel na interação planta-inseto em café.

Ao relacionar todas as atividades enzimáticas determinadas em *L. coffeella*, a relação foi positiva entre tripsina-like e a concentração de proteases totais (Fig. 5), o que pode confirmar a função principal que estas enzimas têm na digestão de proteínas no intestino do inseto. Já as cisteíno-proteases não apresentaram relação com os outros variáveis analisados (Fig. 5), mostrando independência de atividade proteolítica no bicho-mineiro. As cisteíno-proteases, a pesar de ter um mecanismo de ação muito semelhante ao das serino-proteases, possui um resíduo de asparagina conservado na proximidade com a histidina catalítica que cria a tríade Cys-His-Asn (considerada análoga a tríade Ser-His-Asp arranjo encontrado em serino-proteases), fazendo com que estas enzimas sejam diferente (RAO et al., 1998), o que pode explicar a pouca relação encontrada entre estas enzimas nas análises de componentes principais.

Atualmente os estudos sobre a digestão em Lepidoptera têm-se centrado, principalmente, nas atividades enzimáticas de pragas importantes, visando contribuir na utilização do controle biológico. As enzimas digestivas proteolíticas do bicho-mineiro ainda não são amplamente investigadas. Seu tamanho reduzido, fase larval escondido, e o esforço considerável exigido para coletar uma quantidade suficiente de material biológico são as razões pelas quais a investigação destes insetos é difícil para os pesquisadores (STYGAR et al., 2010). Do acima referido, este trabalho contribui com informação inicial para futuros estudos que permitam uma melhor compressão do processo digestivo desta praga do cafeeiro.

6.2. Resposta defensiva de *Coffea arabica*

A expressão da resistência está frequentemente acompanhada pela ativação das enzimas fenol-oxidases e polifenoloxidases e pela peroxidação de lipídeos por enzimas como as lipoxigenases (GOODMAN & NOVACKY, 1994). Neste estudo, observou-se

um aumento significativo de 74% das atividades lipoxigenases nas folhas de café após a injúria de *L. coffeella* (PI) (Fig. 6), ou seja, as plantas ativaram esta via metabólica como sistema de defesa. Estes resultados também foram observados em outros trabalhos, indicando que os níveis de atividade de LOXs são modulados em resposta a estresses bióticos e abióticos, tais como injúria mecânica (HILDEBRAND et al., 1988) e ataque de patógenos ou de pragas (SILVA et al., 2004; FORTUNATO et al., 2007).

Na cultura do café, são escassos os estudos de atividade lipoxigenase, e os relatos encontrados foram descritos por Pereira et al. (2008), Patui et al. (2007), Dussert et al. (2003) e Rojas et al. (1993). Essa escassez pode ser devido às dificuldades técnicas em evidenciar e caracterizar esta atividade em seus frutos, devido à presença de lipídeos (PATUI et al., 2007), e no caso da utilização das folhas o maior interesse tem sido a análise em plantas infestadas com ferrugem (ROJAS et al., 1993).

Os valores de atividade de lipoxigenase no cafeeiro (Fig. 6) foram superiores aos registrados por PEREIRA et al. (2009), que obtiveram atividades entre 1 e 1,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteína, na avaliação do efeito da aplicação de silício via foliar para redução da severidade da ferrugem nesta cultura. Rojas et al. (1993) estudaram as variações da atividade de LOX em folhas de café saudáveis e durante o desenvolvimento da infecção da ferrugem e encontraram que esta atividade aumentou, concluindo que houve a participação de LOX na sequência de eventos que caracterizou a expressão do café contra ferrugem. Estes trabalhos demonstraram a ação de LOX conferindo resistência ao café contra o patógeno. Entretanto não se conhecia a atividade dessa via na presença do bicho-mineiro, sendo o presente trabalho inovador neste aspecto o que poderá auxiliar o entendimento do sistema de defesa do café contra esta importante praga.

Na resposta da planta a sinais indutivos, como a herbivoria, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de ácido jasmônico e metil jasmonatos que, por sua vez, atuam na indução da síntese de inibidores de proteases (SANTNER et al., 2009; SHIVAJI et al., 2010). O aumento da atividade das lipoxigenases proporcionou, conseqüentemente, um acréscimo na síntese de inibidores de proteases (Fig. 7). Esse aumento na produção de inibidores foi aproximadamente de um 71%, nas folhas de café após ataque do bicho mineiro (PI).

Assim como o constatado no presente estudo, Fortunato et al. (2007) e Pilon (2009) também observaram um aumento significativo nos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja injuriadas por lagartas *A. gemmatalis*. Além disso, Silva et

al. (2004) verificaram aumento da produção de inibidores de proteases em folhas de duas variedades de soja, após o ataque da mosca-branca (*Bemisia argentifolli*) (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). De modo semelhante, Scott et al. (2010) verificaram que houve uma interferência pós-digestiva correlacionada com uma diminuição de duas vezes a atividade das enzimas digestivas serino-proteases nas lagarta de *T. ni* que foram alimentadas com tomateiro superexpressoras de jasmonato em relação ao Def-1 (mutante deficiente de jasmonato). Marinho et al. (2010) observou um aumento na produção de inibidores de proteases após 12 e 24 horas da infestação de *Thyrinteina leucoceraea* (Rindge) (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiabeira.

As famílias Poaceae, Fabaceae, Solanaceae e Cruciferae são as mais utilizadas nos estudos de inibidores de proteases, apresentando registro de várias famílias de inibidores de proteases (tipo Kunitz, Bowman-birk, squash, entre outros) (LOPES et al., 2004). Os primeiros relatos do possível papel dos inibidores de proteases sobre insetos fitófagos foram realizados por Mickel & Standish (1947) em soja (Fabaceae). No café não se tem relatado a participação dos inibidores sobre insetos pragas, sendo este o primeiro estudo realizado em Rubiaceae.

Os resultados observados de aumento da atividade de lipoxigenases e de inibidores de proteases apresentados indicam um possível mecanismo de resposta da planta de café ao ataque de *L. coffeella*, passando pela via das lipoxigenases.

O aumento na atividade de lipoxigenases gera o acréscimo na produção de inibidores de proteases, devido ao aumento da eficiência catalítica de LOX, levando à conversão dos hidroperóxidos em ácido 12-oxofitodienoico e, posteriormente, à produção de ácido jasmônico. Foi proposto que este ácido interage com um receptor de membrana, ativando a expressão de genes para inibidores de proteases (SHIVAJI et al., 2010; FARMER & RYAN, 1992). Desta forma, reforça-se a hipótese de que as lipoxigenases são enzimas chave do mecanismo de resposta do cafeeiro às injúrias do bicho-mineiro e que o acúmulo de inibidores de proteases esteja envolvido nesse mecanismo.

As polifenoloxidasas têm sido relacionadas a reações de defesa das plantas contra herbivoria em diversas espécies (FELTON et al., 1989; CONSTABEL et al., 2000). A atividade defensiva é baseada na capacidade desta enzima em oxidar rapidamente o-diidroxifenóis para a correspondente o-quinona, quando o tecido é danificado. As quinonas se ligam covalentemente aos aminoácidos alquilatáveis –

lisina, histidina, cisteína e metionina - das proteínas da planta, tornando-os indisponíveis para os insetos (FELTON et al., 1989).

O cafeeiro apresentou ativação das polifenoloxidasas quando injuriadas pelo bicho-mineiro (PI) (Fig. 8), o mesmo comportamento foi observado quando esta cultura foi inoculada pelo fungo causador da ferrugem (MELO et al., 2006; ROJAS et al., 1993). Em plantas suscetíveis á ferrugem a atividade das polifenoloxidasas mantiveram-se estável, mesmo quando estas foram submetidas a estresses bióticos (inoculação com o fungo) e abióticos (danos mecânicos), mas nas resistentes houve um acréscimo nesta atividade (MELO et al., 2006). Em contrapartida, no mesmo estudo, Melo et al.(2006) também avaliaram a atividade da PPO em cafeeiro contra o bicho-mineiro, nas mesmas condições do patógeno, não encontrando alterações nesta atividade. Estes autores sugeriram que esta enzima não está envolvida nos processos de defesa contra o bicho-mineiro. Diferentemente de Melo et al. (2006), encontramos diferenças entre as plantas controle e as submetidas ao ataque de *L. coffeella*, e nestas últimas, existiu um aumento de 70% da atividade polifenoloxidasas (Fig. 8). Sabe-se que as folhas jovens sob herbivoria apresentam uma maior resposta defensiva e uma maior atividade de polifenoloxidasas (CONSTABEL & BARBEHENN, 2008). Assim podemos inferir que a diferença constatada entre o estudo de Melo et al. (2006) e a presente pesquisa pode estar relacionada a idade da planta utilizada.

A correlação positiva e significativa entre a atividade das lipoxigenases e as polifenoloxidasas (Fig. 9) pode estar relacionada com o fato que em algumas plantas o incremento da atividade de PPO tenha sido relacionado à produção de compostos como o ácido jasmônico e o metil jasmonato, que são produtos da via de transdução de sinal dos octadecanoides, na qual a lipoxigenase participa (CONSTABEL et al., 1995).

6.3. Defesa do cafeeiro Vs atividade proteolítica de *Leucoptera coffeella*

Os estudos da interação entre enzimas digestivas de insetos e inibidores de proteases mostraram que os perfis da expressão das proteases apresentaram diferentes respostas. Os inibidores de proteases analisados em *C. arabica* proporcionaram um efeito negativo da atividade de tripsina-like e de quimotripsina-like. Todavia apenas para quimotripsina-like este efeito foi maior e estatisticamente significativo (Tabela 1, Fig. 10). Este resultado pode revelar uma possível resistência da tripsina-like aos efeitos dos inibidores, assunto que já tem sido corroborado em outros estudos como o

de Lopes et al. (2004), que relataram que os inibidores produzidos pelas plantas, tem uma região chamada sítio reativo, que interage com o sítio ativo da enzima alvo. Os sítios reativos de muitos inibidores de proteases são hidrofílicos como o resíduo de lisina em P₁. Como as tripsinas de lepidóptera têm subsítios hidrofóbicos e preferem lisina mais que arginina, em P₁, elas são usualmente mais resistentes a inibidores de proteases que outras tripsinas de outros insetos (LOPES et al., 2004). Brito et al. (2001) também descreveram maior resistência das tripsinas comparado com as quimotripsinas de *H. virescens*, ao serem expostos aos inibidores das folhas de tabaco. Com esta correlação encontrada, o próximo passo seria determinar o porquê as tripsinas do bicho-mineiro podem ser mais resistentes aos inibidores.

Como já mencionado, a atividade de LOX induziu a produção de inibidores de proteases, por isso esta atividade pode estar relacionada diretamente com uma maior atividade de tripsina-like no intestino do bicho-mineiro. Este fato está em concordância com as análises de correlação, que foi positiva e estatisticamente significativa entre estes dois parâmetros (LOX e tripsina-like) (Tabela 1, Fig. 10).

A PPO forma quinonas por oxidação de fenóis nas plantas, que podem se ligar covalentemente às proteínas das folhas, inibindo as enzimas proteolíticas dos insetos herbívoros (BHONWONG et al., 2009). Mas os insetos podem responder aos processos de inibição das suas proteases no intestino de diferentes formas, como através da hiperprodução de proteases sensíveis (enzimas mais usadas na digestão das proteínas) ao inibidor, no intuito de suprir o efeito deletério destes inibidores e diminuir a expressão das enzimas menos sensíveis (PETEK et al., 2012; JAMAL 2012; AHN et al., 2009). Isso explicaria a relação positiva encontrada entre a atividade PPO de *C. arabica* e a tripsina-like do bicho-mineiro (Tabela 1, Fig. 10), onde o inseto respondeu aumentando sua atividade proteolítica à maior atividade de PPO nas plantas.

7. CONCLUSÕES

- ❖ Nas larvas de *L. coffeella* existe atividade tanto serino como cisteíno-proteases, mas a atividade serino-proteases é quem caracteriza o intestino destes insetos. Estas informações são referências novas sobre o tema de digestão enzimática destes insetos.
- ❖ As diferenças encontradas entre os substratos utilizados na avaliação da atividade de tripsina-like, mostra que existe uma maior afinidade desta enzima pelo substrato L-TAME comparado como L-BApNA. Propomos que deve-se realizar a caracterização das proteases tripsina-like de *L. coffeella*, desde a purificação destas enzimas, até a determinação dos parâmetros cinéticos que permitam definir o processo de hidrolises destes substratos.
- ❖ A produção de inibidores de proteases e as atividades de LOXs e PPOs nas plantas de *C. arabica* apresentam aumento na presença de *L. coffeella*, o que indica a possível participação destas vias no processo de defesa da planta. A caracterização desses inibidores produzidos e seu efeito sobre as proteases em *L. coffeella* dariam continuidade à determinação da função destas vias na interação de *C. arabica* com este inseto praga.
- ❖ A correlação negativa encontrada entre os inibidores de proteases e a quimotripsina-like, além das correlações positivas entre LOX e PPO com a tripsina-like, geram informação de como o inseto responde ao mecanismo de defesa de *C. arabica*. Determinando-se que existe um aumento da atividade das proteases mais essenciais e uma diminuição das proteases secundárias (menos usadas) como quimotripsina-like. Estudos mais aprofundados onde estas interações poderão ser caracterizadas contribuirão para um melhor entendimento do mecanismo da resposta do inseto ao sistema de defesa da planta, visando gerar novas alternativas para o manejo desta praga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN J, ZHU-SALZMAN, K. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potencial role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology*, 55:678–685.

AMARAL S. 1953. Considerações sobre o bicho-mineiro e sua importância econômica. *O Biológico*, São Paulo, 19, 5:85–92.

AVILES D, MATIELLO J, PAULINI A, PINHEIRO M. 1983. Infestação de bicho-mineiro em Catuaí e Conilon em lavouras intercaladas e isoladas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10 Poços de Caldas. Rio de Janeiro: IBC/ GERCA, 324–325.

AXELROD B, CHEESBROUGH T, LAASKO S. 1981. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymology*, 71:441–451.

BAIRD I, MOSI R, OLSEN M, CAMERON B, FRICKER S, SKERIJ R. 2006. 3 + 1 mixed-ligand oxorhenium (V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. *Inorganica Chimica Acta*, 359: 2736–2750.

BARRET A. & RAWLINGS N. 2001. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 382: 727–733.

BARRET A. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymology*, 244: 1–15.

BATISTA R, OLIVEIRA M, PIRES C, PIOVESAN N, REZENDE S, MOREIRA M. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1517–1524.

BERTHOLDO-VARGAS L, NASCIMENTO R, BORDIN J, SALVADOR D, SCHAFFER, MONTEIRO DE BARROS N. 2009. Oxidative and genotoxic action of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiology*, 55: 51–58.

BHONWONG A, STOUT M, ATTAJARUSIT J, TANTASAWAT P. 2009. Defensive role of tomato polyphenol oxidase against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *J Chemical Ecology*, 35:2838.

BIGGER M. 1969. Partial resistance of arabica coffee to the coffee leaf miner *Leucoptera meyricki* Ghesp. (Lepidoptera: Lyonetiidae). *East African Agricultural and Forest Journal*, Nairobi, 34: 441–445.

BLÉE E. 1976. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Science*, 7: 315–22.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analisis Chemical*, 72: 248–254.

BONOMO P, CRUZ C, VIANA J, PEREIRA A, OLIVEIRA V, CARNEIRO P. 2004. Avaliação de progênies obtidas de cruzamentos de descendentes do Híbrido de Timor com as cultivares Catuaí vermelho e Catuaí amarelo. *Bragantia*, 63, 2: 207–219.

BRIDSON D. & VERDCOURT B. 1988. *Flora of tropical East Africa: Rubiaceae. (Part 2)*. Cape Town: Iziko Museums of Cape Town, 415–747.

- BRITO L, LOPES A, PARRA J, TERRA W, SILVA-FILHO M. 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 365–375.
- BROADWAY R. 1989. Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 7.
- CARRILLO L, HERRERO I, CAMBRA I, SANCHEZ-MOGNE R, DIAZ I, MARTINEZ M. 2011. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1191–1200.
- CHRISTELLER J, LAING W, MARKWICK N, BURGESS E. 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 735–746.
- CLEMENTE E. & PASTORES G. 1998. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Ciencia e Tecnologia Alimentos*, 32: 167–171.
- COSTA MONDEGO J, DUARTE M, KIYOTA E, MARTÍNEZ L, RODRIGUES S, DE CAROLI S, SANTOS B, CARMELLO S, VILELA M, GUERREIRO-FILHO O, MENOSSI M. 2011. Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during development and leaf miner infestation. *Planta* 233:123–137.
- CONSTABEL C. & BARBEHENN R. 2008. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In A. Schaller (ed.), *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer, New York.
- CONSTABEL C, YIP L, PATTON J, CHRISTOPHER E. 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 124: 285–295.
- CONSTABEL C, BERGEY D, RYAN C. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 407–411.
- CRAIK C, ROCZNIAK S, LARGMAN C, RUTTER W. 1987. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. *Science*, 237: 909–913.
- CROWE T. 1964. Coffee leaf miners in Kenya. I. Species and life histories. *Kenya Coffee*, Nairobi, 29: 173–183.
- DUARTE G, DONIZETE C, APARECIDA G, DUARTE A, PATTO C, AND RADE G. 2009. Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Ciência e Agrotecnologia*, 33: 180–190.
- DUSSERT S, CHABRILLANGE N, MONTILLET J, AGNEL J, ENGELMANN F, NOIROT M. 2003. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage. *Physiology Plant*, 119: 534–543.
- ENZYME NOMENCLATURE (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>), 2015.
- ERLANGER B, KOKOWSKY N, COHEN W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271–278.
- FARMER E. & RYAN C. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129–134.

- FASTREZ J. & FERSHT A. 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*, 12: 2025–2034.
- FELTON W, DONATO K, DELVECCHIO R, DUFFEY S. 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 2667–2694.
- FERREIRA A, MATIELO J, PAULINI A. 1979. Provável resistência do cultivar Conilon (*C. canephora*) à infestação de bicho mineiro do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Guér.-Mém., 1842). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRAS, 7, Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 330–331.
- FORTUNATO F, OLIVEIRA M, BRUMANO M, SILVA C, GUEDES R, MOREIRA M. 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hubner). *Journal of Pest Science*, 120–126.
- FEYS B. & PARKER J. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genetical*, 16: 449–455.
- GALLO D, NAKANO O, SILVEIRA NETO S, CARVALHO R, BATISTA G, BERTI-FILHO E, PARRA J, ZUCCHI R, ALVES S, 1978. *Manual de Entomologia Agrícola*. 531p.
- GIRI A, HARSULKAR A, KU M, GUPTA V, DESHPANDE V, RANJEKAR P, FRANCESCHI V. 2003. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds, *Phytochemistry*, 63: 523–532.
- GILL I, LOPEZ-FANDIÑO R, JORBA X, VULFSON E. 1996. Biologically active peptides and enzymatic to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 162–183.
- GOMES M, OLIVEIRA M, CARNEIRO G, BARROS E, MOREIRA M. 2001. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 1: 69–72.
- GOODMAN R. & NOVACKY A. 1994. *The hypersensitive reaction in plants to pathogens*. St Paul: APS Press.
- GORMAN M, ANDREEVA O, PASKEWITZ M. 2000. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene*, 251: 9-17.
- HILDEBRAND D, HAMILTON-KEMP T, LEGG C, BOOKJANS G. 1988. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions, *Current Topics in plants Biochemistry and Physiology*, 7: 201-219.
- HILDEBRAND D. 1989. Lipoxygenases. *Physiol. Plantarum*, 76: 249–253.
- ILLY E. 2002. Um dos prazeres simples da vida é bastante complicado: A saborosa complexidade do café. *Revista Scientific American Brasil*, 48–53.
- INAGAMI T. 1972. Trypsin. In: Funatsu, M., Hiromi, K., Imahori, K., Murachi, T., Narita, K. (Eds.), *Proteins—Structure and Function*, 1 – 83.
- JAMAL F, PANDEY P, SINGH D, KHAN M. 2012. Serine protease inhibitors in plantas: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemical*, 56, 25-34.
- JARAMILLO J, BORGEMEISTER C, BAKER P. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research*, 96:1–12.

- JOHNSTON K, LEE M, BROUGH C, HILDER H, GATEHOUSE A, GATEHOUSE J. 1995. Protease Activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 3: 375—383.
- KAKADE M, RACKIS J, McGHEE J, PUSKI G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51: 376–382.
- KAPUR R, TAN-WILSON A, WILSON K. 1989. Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna-radiata*). *Plant Physiology*, 91: 106–112.
- KAR M. & MISHRA D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315–319.
- KUNAKBAEVA Z, CARRASCO R, ROZAS I. 2003. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur to Michael acceptors type compounds *Journal of Molecular Structure*, 626: 209–216.
- KUNITZ M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of Genetic and Physiology*, 30: 291–310.
- LASKOWSKI M.& KATO I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593–626.
- LENZ J, KANG W, RICE A, MCINTOSH G, CHIPPENDAL K, SCHUBERT. 1991. Digestive proteinases of larval of the corn earworm, *Heliothis zea* characterization, distribution, and dietary relationship. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16: 201–212.
- LOPES A, JULIANO M, JULIANO L, TERRA W. 2004. *Archives of insect biochemistry and physiology. Coevolution of Insect Trypsins and Inhibitors*, 55: 140–152.
- LOUREIRO A, NICOLE M, VÁRZEA V, MONCADA P, BERTRAND B, SILVA M. 2012. Coffee resistance to *Colletotrichum kahawae* is associated with lignification, accumulation of phenols and cell death at infection sites. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 20: 23–32.
- MACK A, PETERMAN T, SIEDOW J. 1987. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. *Current Topics in Biological and Medical Research*, 13: 127–154.
- MARINHO J, OLIVEIRA M, GUEDES R, PALLINI A, OLIVEIRA J. 2010. Resposta bioquímica de *Thyrinteina leucoceraea* a inibidor de proteases em plantas de goiaba. *Idesia*, 28, 3: 101–109.
- MATIELLO J. et al. 2002. *Coord. Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações*. Rio de Janeiro-RJ e Varginha –MG: Edição -MAPA/PROCAFÉ. Gráfica Reptoarte.
- MAZZAFERA P. & ROBINSON S. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*, 55: 285–296.
- MAZZAFERA P, GONÇALVES W, FERNANDES J. 1989. Fenóis, peroxidases e polifenoloxidases na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia*, 48: 131–142.
- MCFARLANE J. 1985. Nutrition and digestive organs. In “*Fundamentals of Insect Physiology*” (Blum, M.S., Eds), Wiley, New York.

- McLELLAN K. & ROBINSON D. 1984. Heat stability of peroxidase from Orange.Foos Chemistry Barking, 13: 139–147.
- McMANUS M. & BURGESS E. 1995. Effect of soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on the growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*, 41: 731–738.
- MELO G, MASSAO M, MAZZAFERA P. 2006. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, 67: 277–285.
- MENDONÇA E, VISÔTTO E, SANTOS COSTA C, RIBEIRO F, OLIVEIRA J, OLIVEIRA M. 2011. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). *Ciência e. agrotecnologia*, 35: 3-8.
- MICKEL C. & STANDISH J. 1947. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. *University of Minnesota Agric. Exp. Stn. Tech. Bull*, 178: 1–20.
- MOSOLOV W. & VALUEVA T. 2008. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 3: 233–240.
- NAKONIECZNY M, MICHALCZYK K, KE, DZIORSKI A. 2007. Midgut protease activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*, C. R. *Biologies* 330: 126–134.
- NEVES C. 1974. A história do café. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 52 p.
- NOTLEY F. 1948. The leucoptera leaf miners of coffee on Kilimanjaro. I. *Leucoptera coffeella*, Guér. *Bulletin of Entomological Research*, 39, 3: 339–416.
- ORTEGO F, NOVILLO C, CASTAIIERA P. 1996. Characterization and Distribution of Digestive Proteases of the Stalk Corn Borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32: 163–180.
- OLIVEIRA M, SIMONE S, XAVIER L, GUEDES R. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140B: 369–380.
- PARRA J. 1985. *Biologia comparada de Perileucoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Entomologia*, 29, 1: 45–76.
- PATUI S, PERESSON C, BRAIDOT E, TUBARO F, COLUSSI A, BONNLÄNDER B, MACRÌ F, VIANELLO A. 2007. Lipoxygenase Distribution in Coffee (*Coffea arabica* L.) Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8223–8230.
- PEREIRAR, ALVES E, RIBEIRO M, VILELA DE RESENDE M, CIAVARELI G, FERREIRA J. 2008. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 43, 10: 1287–1296.
- PERONA J. & CRAIK C. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 4: 337–360.
- PETEK M, TURNSEK N, GASPARIC M, NOVAK M, GRUDEN K, SLAPAR N, POPOVIC T, STRUKEIJ B, JONGSMA M. 2012. Complex of genes involved in adaptation of

- Leptinotarsa decemlineata larvae to induced potato defense. Archives of insect biochemistry and physiology, 79, 3: 153–181.
- PILON A, OLIVEIRA M, PILON F, GUEDES R, OLIVEIRA J, FAZOLLO A. 2009. Adaptação da lagarta da soja Anticarsia gemmatalis Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibitor de protease benzamidina. Cere, 56, 6: 744–748.
- R CORE TEAM, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.2013.
- RAO M, APARNA M, GHATGE M, DESPHANDE V. 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 597–635.
- RAWLINGS N, BARRETT A, BATEMAN A. 2010. MEROPS: the peptidase database, Nucleic Acids Research, 38: 227–233.
- READ J. & HAAS L. 1938. The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. Cereal Chemistry, 15:59–68.
- REIS P, LIMA J, SOUZA J. 1975. Flutuação populacional do Bicho-mineiro das folhas do cafeeiro, Perileucoptera coffeella (Lepidoptera- Lyonetiidae) nas regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais e identificação de inimigos naturais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3: 217–218.
- REIS P. & SOUZA J. 1994. Manejo integrado do bicho-mineiro das folhas do cafeeiro e seu reflexo na produção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Guarapari. MAA-PROCAFE, 23–24.
- RENA A. & GUIMARÃES P. 2000. Sistema radicular do cafeeiro: estrutura, distribuição, atividade e fatores que o influenciam. Belo Horizonte: EPAMIG, 80p.
- ROCHA E. & FERREIRA M. 2001. Análise dos indicadores de inovação tecnológica no Brasil: comparação entre um grupo de empresas privatizadas e o grupo geral de empresas. Ciência e Informação, Campinas, 30, 2: 64–69.
- ROJAS M, MONTES DE GOMEZ V, OCAMPO C. 1993. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. Physiology and. Molecular Plant Pathology, 43: 209–219.
- ROMERO F, GARCIA L, SALAS J, DIAZ M, QUIROS L. 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from Serratta marcescens grown in whey. Process of. Biochemistry, 36: 507–515.
- ROSSI G, SANTOS C, CARVALHO G, CORRÊA A, ABREU C, CARVALHO G. 2009. Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro Leucoptera coffeella (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Ciência e Agrotecnologia, v. 33, Edição Especial, 1871–1876.
- RYAN C. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens, Annual Review of Phytopathology, 28: 425–449.
- SANTNER A, CALDERON-VILLALOBOS LI, ESTELLE M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chemical Biology 5: 301–307.

- SANTOS C, FERREIRA C, TERRA W. 1983. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. *Journal of Insect Physiology*, 29, 9: 707–714.
- SCOTT I, THALER J, SCOTT J. 2010. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 490–499.
- SHIVAJI R, CAMAS A, ANKALA A, ENGELBERTH J, TUMLINSON J, WILLIAMS P, et al. 2010. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 179–191.
- SIEGEL B. 1993. Plant peroxidases: an organism perspective. *Plant Growth Regulation*, 12: 303–312.
- SILVA F, OLIVEIRA M, BRUMANO M, PIRES C, ALMEIDA F, OLIVEIRA J, PILON A, SILVA C, MOREIRA M. 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolli*). *Ciência e Agrotecnologia*, 28, 2: 406–413.
- SOARES R, MARINGONI A, LIMA G. 2004. Ineficiência de acibenzolar-S-metil na indução de resistência de feijoeiro à *muchuca-de-curtobacterium*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 373–377.
- SOUZA J, REIS P, RIGITANO R. 1998. O bicho mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG, Boletim Técnico, 54, 48p.
- STYGAR D, DOLEZYCH B, NAKONIECZNY M, MIGULA P, MICHALCZYK K, ZAAK M. 2010. Digestive enzymes activity in larvae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Biologies*, 333: 725–735.
- TAMIR S, BELL J, FINLAY T, SAKAL E, SMIRNOFF P, GAUR S, BIRK Y. 1996. Isolation, characterization, and properties of a trypsin and chymotrypsin inhibitor from Amaranth seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 15, 2: 219–228.
- TERRA W. & FERREIRA C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 1–62.
- TERRA W. & FERREIRA C. 2005. Biochemistry of digestion, in: L.I. Gilbert, K. Latrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, 171–224.
- TOMARELLI R, CHARNEY J, HARDING M. 1949. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 34: 428.
- TRAVIS J. & SALVESEN G. 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 655-709.
- TROIANI E, TROIANI C, CLEMENTE E. 2003. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). *Ciencia e Agrotecnologia*, 27, 3: 635–642.
- VALERO E, VARÓN R, CARMONA G. 1988. Characterization of polyphenoloxidase in romaine grape. *Journal of Food Science*, 53, 5: 1482–1485.
- XAVIER L, OLIVEIRA M, GUEDES C, SANTOS V, DE SIMONE S. 2005. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147–153.

- WAR A, SHARMA H, PAULRAJ M, WAR M, IGNACIMUTHU S. 2011. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant signal Behaviour*, 6: 1973 – 1978.
- WESTFALL R.& HAUGE M. 1948. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *The Journal of Nutrition*, 35: 374– 389.
- WHITAKER, R. 1994. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O.R (ed.). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York: Marcel Dekker Inc, 543 – 556
- YANAGIMOTO K. 2004. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3: 592 – 596.
- ZHAO R, DAI H, QIU S, LI T, HE M, CHEN Z, WU Y, LI W, CAO Z. 2011. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom, *PLoS One*, 6: 27540 – 27548,
- ZHU-SALZMAN K, HOIWA K, SALZMAN R, SHADE E, AHNE. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine proteinase inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 5: 135 – 145.