

CRISTIAN YIZARD LIZARDO CHÁVEZ

**EFEITO DOS INIBIDORES DE PROTEASES BENZAMIDINAS NAS  
RESPOSTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE *Coffea arabica* E DA  
COCHONILHA *Coccus viridis***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

L789e  
2016  
Lizardo Chavez, Cristian Yizard, 1984-  
Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas  
respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da  
cochonilha *Coccus viridis* / Cristian Yizard Lizardo Chavez. –  
Viçosa, MG, 2016.  
xii, 75f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 60-75.

1. *Coccus viridis* - Controle. 2. Café - Doenças e pragas.  
3. Café - Resistência a doenças e pragas. 4. Enzimas  
proteolíticas. 5. Lipoxigenases. 6. Relação inseto-planta.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

CRISTIAN YIZARD LIZARDO CHAVEZ

**EFEITO DOS INIBIDORES DE PROTEASES BENZAMIDINAS NAS  
RESPOSTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS DE *Coffea arabica* E DA  
COCHONILHA *Coccus viridis***

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

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016.

---

Paulo Luiz da Silva

---

Eliseu José Guedes Pereira

---

Wellington Garcia Campos  
(Coorientador)

---

Gláucia Cordeiro  
(Coorientadora)

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

*"O sucesso não é um acidente, é trabalho duro, perseverança, aprendizado, estudo, sacrifício e mais do que tudo, amor pelo que se faz ou se aprende a fazer".*

*Edson Arantes Do Nascimento  
(Pelé)*

## DEDICATORIA

*Ao meu Pai Roger Lizardo e a minha mãe Glória Chávez,*

*A meus Irmãos, Sobrinha e Sobrinhos*

*A minha esposa Karina Reyes e ao meu filho Ian, que são minha  
inspiração e minha força diária.*

*Aos meus Amigos e Colegas*

*Todos eles são parte de meu êxito pelo que dedico este logro  
alcançado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar no bom caminho e ter me dado esta oportunidade.

A Organização dos Estados Americanos e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras por me aprovarem no edital OEA-GCUB 2013 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade, a experiência e o conhecimento adquirido.

Aos Professores e Colegas do PPG-Entomologia pela amizade, apoio e experiências compartilhadas.

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

A minha coorientadora, Gláucia Cordeiro, pelas suas dicas, apoio e sua disponibilidade para sempre me ajudar.

A minha esposa e ao meu filho, obrigado por me apoiarem e sempre me acompanharem sempre. Amo muito vocês!

Aos meus pais e toda a minha família e a família da minha esposa, que sempre me deram apoio e bons conselhos, dedico todo este triunfo a vocês.

Ao Instituto Hondurenho do Café, pelo apoio institucional e financeiro.

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 professor Laércio Zambolim e o Sergio Milagres do Laboratório de Proteção de Plantas/UFV por ter disponibilizado as plantas de cafeeiro utilizadas no desenvolvimento desta pesquisa.

A toda a equipe do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Fabricio, Manuel, Jenny, Paulo, Neilier, Juan Diego, Verônica, Roberta, Francelina, Gustavo, Breno, Thayara, Rafael Rail e Rafael Barros, pela ajuda, sugestões, piadas, amizade durante estes dois anos.

Ao secretario da pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo, sempre presente e prestativo.

## **BIOGRAFIA**

Cristian Yizard Lizardo Chávez, filho de Roger Lizardo Sorto e Gloria Chávez David, nasceu no dia 16 de Junho de 1984 em Comayagua, Honduras.

Em 2003 iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Nacional Autônoma de Honduras, campus CURLA, graduando-se como Engenheiro Agrônomo em 2007.

Trabalhou no Instituto Hondurenho do Café (IHCAFE), entre 2008 e 2013, como técnico extensionista.

Em Março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Maria Goreti de Almeida Oliveira, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2016.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1. Cochonilha-verde.....	4
2.2. Cafeeiro .....	6
2.3. Cochonilha-verde X cafeeiro .....	8
2.4. Enzimas digestivas dos insetos.....	10
2.4.1. Serino-proteases .....	11
2.4.2. Cisteíno-proteases .....	12
2.5. Adaptações do sistema digestivo e enzimas digestivas da subordem Sternorrhyncha. ....	13
2.6. Defesa e inibidores de proteases em plantas.....	16
2.6.1. Defesas das plantas .....	16
2.6.2. Inibidores de proteases .....	20
2.6.3. Inibidores de serino-proteases .....	21
2.7. Inibidores de proteases sintéticos: Benzamidina e Berenil.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral .....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Local de realização dos experimentos.....	26
4.2. Material vegetal .....	26
4.3. Criação da cochonilha-verde .....	26
4.4. Experimentação.....	27
4.4.1. Experimento 1: Respostas bioquímicas .....	28
4.4.1.1. Análises da atividade enzimática em <i>C. viridis</i> .....	29
4.4.1.1.1. Extrato enzimático .....	29
4.4.1.1.2. Determinação da concentração de proteína total .....	29
4.4.1.1.3. Determinação de atividade de serino-proteases.....	30
4.4.1.1.4. Determinação de atividade de cisteino-proteases .....	32
4.4.1.1.5. Determinação de atividade de proteases totais .....	32

4.4.1.2. Atividade enzimática do café.....	33
4.4.1.2.1. Extrato foliar.....	33
4.4.1.2.2. Determinação da atividade de lipoxigenase .....	34
4.4.1.2.3. Quantificação de inibidores de proteases .....	35
4.4.1.3. Análises estatísticas.....	36
4.4.2. Experimento 2: Aspectos biológicos de <i>C. viridis</i> .....	37
4.4.2.1. Análise estatística .....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1. Atividade das enzimas digestivas de <i>C. viridis</i> .....	40
5.2. Análise dos extratos foliares de <i>C. arabica</i> .....	47
5.3. Avaliação biológica de <i>C. viridis</i> .....	51
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

## RESUMO

LIZARDO CHAVEZ, Cristian Yizard, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da cochonilha *Coccus viridis*.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Gláucia Cordeiro, Wellington Garcia Campos e Joel Antônio de Oliveira.

A cultura do café no Brasil tem muita importância econômica e relevância no setor social, gerando divisas e empregos diretos e indiretos. Por tanto, qualquer fator que diminua a sua produtividade refletirá na economia do país. Uma das possíveis causas da redução de sua produtividade é devido às injúrias que os insetos podem causar. Entre estes insetos têm-se *Coccus viridis* (Green) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae). As plantas ao serem injuriadas são capazes de aumentarem a síntese de inibidores de proteases (IPs) no local da lesão e, também, por toda a sua extensão. Estudos demonstraram que insetos alimentados com plantas previamente pulverizadas com inibidores sintéticos têm seu desenvolvimento prejudicado. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos inibidores de proteases sintéticos, benzamidina e berenil, sobre a atividade proteolítica intestinal de *C. viridis* e constatar quais foram as alterações na resposta bioquímica em plantas de *Coffea arabica*. Além disso, avaliar os efeitos destes inibidores nos aspectos biológicos desta praga. Plantas de *C. arabica* foram infestadas com ninfas de *C. viridis* e pulverizadas com benzamidina e berenil, em quatro diferentes concentrações: 0; 0,25; 0,5 e 0,75% (p/v). A resposta bioquímica do inseto e do cafeeiro foi realizada após 24 horas da pulverização, coletando-se os insetos e as folhas. A avaliação biológica foi realizada até o aparecimento de novas ninfas de o primeiro instar, sinal de que as cochonilhas chegaram à fase adulta. A atividade das serino-proteases, tripsina-like (amidásica e esterásica) e quimotripsina-like esterásica, foi reduzida devido à presença dos inibidores. O mesmo se obteve em relação à atividade das cisteino-proteases. Nos tratamentos avaliados a atividade de lipoxigenases não apresentou diferença. Entretanto, houve um incremento da produção dos IPs nas plantas com a infestação da cochonilha-verde e na ausência dos inibidores sintéticos. Já nas plantas com o inseto e

pulverizadas com os inibidores sintéticos observou-se o contrário, ou seja, uma redução na produção dos IPs. Na avaliação da atividade biológica, os IPs sintéticos usados provocaram diferenças significativas no peso dos insetos, no entanto o comprimento desses insetos não foi afetado. A presença de benzamidina e berenil causou alta taxa de mortalidade, sendo o berenil mais eficiente e não apresentando diferença significativa entre as concentrações. Isto posto, os IPs sintéticos benzamidina e berenil têm potencial uso para controlar a praga cochonilha-verde.

## ABSTRACT

LIZARDO CHAVEZ, Cristian Yizard, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Effect of inhibitors proteases benzamidine in biochemical and physiological responses of *Coffea arabica* and mealybug *Coccus viridis*.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisor: Gláucia Cordeiro, Wellington Garcia Campos and Joel Antônio de Oliveira.

The coffee culture is of an enormous relevance in the Brazil economics and social areas generating many currencies as direct and indirect employees. Such any factor, which decreases its productivity, will directly reflect in country economy. Being insect injuries one of the main causes of lost productivity the scale insect *Coccus viridis* (Green) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae) is a relevant pest in coffee crops. Plants when attacked increase the synthesis of protease inhibitors (PI's) locally or systematically. The use of pulverized synthetic proteases inhibitors prejudice insects' development. Thus, this work aimed to evaluate the effects of synthetic proteases inhibitors benzamidine and berenil on the gut proteolytic activity of *Coccus viridis* and to corroborate disrupts in biochemical response of *Coffea arabica* plants. Furthermore, effects on *C. viridis* fitness were evaluated. *C. Arabica* plants were infested with *C. Viridis* nymphs then benzamidine and berenil were pulverized in concentrations: 0; 0.25; 0.5 e 0.75% (p/v). Evaluations were performed 24 hours after pulverization, insects and leaves were collected for analysis. Biological evaluation was performed until the appearance of young nymphs of the first instar, a sign that the mealybugs reached the adult stage. Serine-proteinases, trypsin-like (amida and ester), ester quimotrypsin-like, and cysteine-proteinases activities, were reduced due to inhibitors presence. There was none differences in plant lipoxygenases between treatments. While there were PI's increments in plants infested with *C. viridis* and absence of synthetic inhibitors. Opposite to plants infested with scale insects and pulverized with synthetic inhibitors in which PI's production were reduced. Synthetic inhibitors caused significant differences in insect weight; however, the length were not affected. The presence of benzamidine and berenil caused high rates of mortality being

berenil more efficient but no matter the concentrations. These results demonstrate the high potential of benzamidine and berenil for use as biological control tools.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, chegando a atingir uma produção de 43,2 milhões de sacas (60 Kg) (CONAB, 2015), e uma exportação no ano 2015 de 37.12 milhões de sacas (60 Kg) (EMBRAPA-CAFÉ, 2016). Com base nos números da Organização Internacional do Café – OIC divulgados no "Coffee Market Report – December 2015", a participação do café brasileiro em relação à produção mundial foi de aproximadamente 30% em 2015. Além disso, é também o segundo mercado consumidor, perdendo apenas para os Estados Unidos (ABIC, 2015).

Além da importância econômica da cultura de café, ela também possui relevância no setor social do Brasil, devido a geração de empregos. Sendo assim, qualquer fator que diminua a produtividade do cafeeiro irá refletir na economia do país. Uma das possíveis causas de perdas na sua produtividade é devido às injúrias que os insetos-praga podem causar.

Os insetos herbívoros provocam severas injúrias nas plantas, que resultam em perdas econômicas. Estes danos se refletem numa menor produção de sementes pelas mesmas, diminuindo seu potencial vegetativo e reprodutivo (MARQUIS et al., 1992; AGRAWAL, 1998; CORTESERO et al., 2000). Entre as pragas que causam danos ao cafeeiro têm-se a cochonilha-verde, *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae) (LEPELLEY, 1968).

A cochonilha-verde tem elevado sua importância como inseto-praga na cultura do café, devido ao aumento da densidade de plantas por hectare e adubações desequilibradas, na busca de maiores produtividades (FERNANDES, 2007). Durante todo o desenvolvimento do cafeeiro, tanto as fêmeas adultas como as ninfas de *C. viridis* se movimentam por toda a planta, injuriando ramos, folhas e até seus frutos. Sua incidência ocorre, sobretudo, em condições de baixa luminosidade e em plantios adensados, sendo encontradas especialmente na parte adaxial das folhas (KÖHLER, 1978; STEIMAN, 2000).

Ao se alimentarem, adultos e ninfas introduzem o estilete e injetam toxinas no tecido vascular das plantas, ocasionando hipertrofia das células cambiais com colapso das células do floema. Esse dano compromete o transporte de fotoassimilados pelo floema, alterando todo o metabolismo da

planta (MAU & KESSING 1992; PEDIGO & RICE 2005). Além disso, causa definhamento, queda de folhas, redução da produtividade e em casos extremos, a morte da planta (SILVA, 1977; MOREIRA et al., 2007; WALLER, 2007).

As plantas, em geral, reagem as injúrias causadas por agentes bióticos e abióticos. Já se tem conhecimento que elas possuem um complexo sistema de defesa com o objetivo de reduzir os danos provocados pelos herbívoros (KARBAN & BALDWIN 1997; AGRAWAL, 1998). Este sistema de defesa de plantas contra insetos herbívoros pode se expressar de modo constitutivo (presente na planta independente da ocorrência da injúria) e/ou induzido (manifestando-se após alguma lesão) (CORTESE et al., 2000).

Estudos têm revelado que as plantas possuem compostos de defesa conhecidos como inibidores de proteases (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002, MERINO-CABRERA, 2015). Os inibidores de proteases desenvolvem nas plantas o papel de defesa em resposta as injúrias de insetos, através da inibição da protease no intestino dos mesmos (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Assim, a inibição de proteases irá diminuir a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto podendo acarretar até a morte (HILDER et al., 1987; RYAN, 1990; VILA et al., 2005).

Quando ocorrem ferimentos em folhas de plantas, há um grande aumento na síntese de inibidores de proteases no local da lesão (resposta local), e também por toda a planta (resposta sistêmica) (FARMER & RYAN, 1992). Tem sido observado que insetos que se alimentam de inibidores de proteases artificialmente introduzidos na dieta ou já presentes naturalmente no tecido da planta, geralmente apresentam crescimento, desenvolvimento e/ou sobrevivência prejudicados (MALONE et al., 1998; VILA et al., 2005; MARINHO, 2006; PILON et al., 2006; MARINHO 2010; PAIXÃO, 2010;)

Benzamidina é um inibidor sintético de tripsinas que vem sendo utilizado para estudar a resposta de insetos a inibidores de protease na dieta. Ao aplicar esse inibidor em soja, Pilon et al., (2006) observaram que lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 tiveram sua atividade proteolítica afetada negativamente. Resultados semelhantes foram relatados por Marinho (2006)

para a lagarta *Thyriniteina leucocerae* (Möschler, 1890) (Geometridae) alimentadas com folhas de eucalipto pulverizadas com benzamidina.

Outro inibidor sintético é o berenil, que é uma bis-benzamidina, sendo também uma das enzimas do tipo tripsina. O inibidor bis-benzamidina, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima (OLIVEIRA et al.,1993). Moreira (2007) observou que berenil adicionado à dieta artificial de *A. gemmatalis* afetou negativamente diversos parâmetros de vida do inseto, sendo ele uma alternativa promissora para estudos que visam ao controle desse herbívoro. Marinho (2010), também, verificou alterações no desenvolvimento *T. leucocerae* alimentadas folhas de goiabeira pulverizadas com este inibidor.

Diante do exposto, apenas as culturas de soja, goiaba e eucalipto possuem estudos avaliando o efeito destes inibidores sintéticos sobre suas pragas. Devido aos resultados positivos destas pesquisas, a importância do cafeeiro no Brasil e a cochonilha-verde ser uma potencial praga dessa cultura, existe a necessidade de compreendermos melhor o mecanismo de interação entre este inseto e o *Coffea arabica*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos inibidores de proteases sintéticos benzamidinas (benzamidina e berenil) sobre digestibilidade protéica de *C. viridis*, após a aplicação destes inibidores de proteases sobre as plantas estando infestadas com *C. viridis*, e sua relação com as possíveis alterações no seu desenvolvimento deste inseto. Por fim, foi analisada a resposta bioquímica das plantas de *C. arabica* expostas à herbivoria de *C. viridis* e suas mudanças em relação à presença dos IPs sobre as mesmas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cochonilha-verde

A cochonilha-verde, *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae) é uma espécie cosmopolita, de provável origem brasileira, que ocorre nas regiões tropicais do mundo (MERRIL, 1953; DEKLE, 2001).

Esta cochonilha foi descrita pela primeira vez por Green em 1889, como pertencente ao gênero *Lecaniun*. De Lotto (1960) referiu-se a essa praga com as seguintes sinônimas: *Lecaniun (Trechocoris) hesperidum africanum* Newstead; *Lecaniun viride* Green; *Coccus viridis* (Green, 1889).

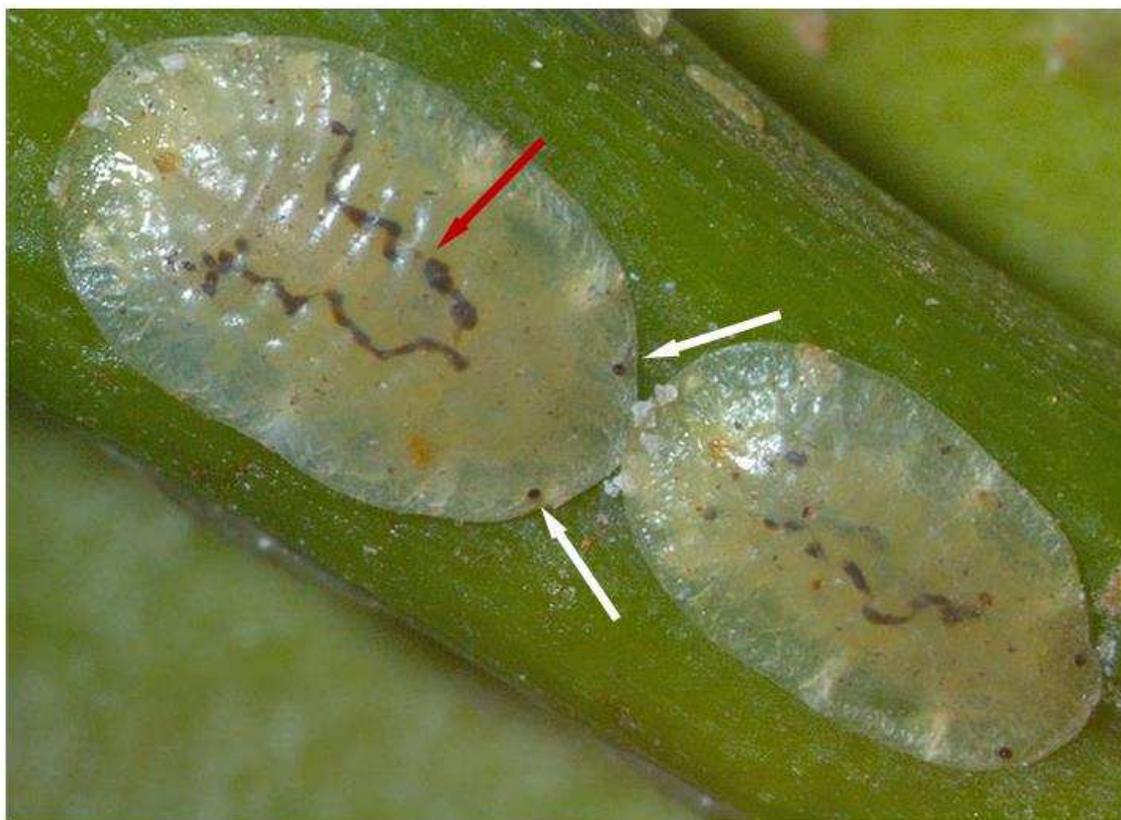
Le Pelley (1973) transferiu-a para o gênero *Coccus*, passando esta espécie a ser denominada *Coccus viridis* (Green, 1889). Fredrick (1943) Camargó & Telles Jr. (1953) e Coste (1969) relataram os nomes vulgares recebidos por essa cochonilha, sendo os principais: pulgão-verde, escama-verde e escamas-ovais. No Brasil ela é bem conhecida como cochonilha-verde-do-cafeeiro (MARICONI, 1955; GALLO et al., 2002).

*Coccus viridis* também é praga de citrus (*Citrus* spp. L.) (Rutaceae), gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) (Rubiaceae), rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) (Sapindaceae), lichia (*Litchi chinensis* Sonn) (Sapindaceae) (APHIS, 1996 e 1998), cacau (*Theobroma cacao* L.) (Sterculiaceae), goiaba (*Psidium guajava* L.) (Myrtaceae), ixora (*Ixora* spp. L.) (Rubiaceae), noni (*Morinda citrifolia* L.) (Rubiaceae), ameixa-de-natal (*Carissa macrocarpa* Eckl.) (Apocynaceae), plumeria (*Plumeria rubra* L.) (Apocinaceae) (ZIMMERMAN, 1948), macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) (Proteaceae) e orquídeas (HOLLINGSWORTH, 2000; GALLO et al., 2002).

Existe um forte dimorfismo sexual nesta espécie. O macho, quando existe, apresenta dois instares, estágios de pré-pupa e pupa e, posteriormente adulto (alado). As fêmeas passam por dois ou três estágios imaturos moveis. A fase adulta é áptera e considerada como um quarto instar sexualmente maduro, (INFORME AGROPECUÁRIO, 2014).

As fêmeas têm o corpo oval ou alongadamente oval, plano a ligeiramente convexo em vista lateral e coloração verde brilhante, muitas vezes transparente, normalmente padrão comum em forma de “U” ou de “V” no meio do corpo formado por pontos pretos visíveis ao olho humano (Figura 1), sem cobertura de cera evidente (KÖHLER, 1978). Elas também possuem duas manchas pretas marginais que só são visíveis com o uso de lente de pelo menos dez vezes de aumento (Figura 1) (SILVA, 1977; MOREIRA et al., 2007).

A reprodução é partenogenética. A fêmea coloca entre 30 a 600 ovos, os quais ficam protegidos embaixo do seu corpo, e a eclosão ocorre em alguns minutos ou pode estender-se a horas (INFORME AGROPECUÁRIO, 2014).



**Figura 1:** Fêmea de *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae), com os pontos pretos formando uma “V” (seta vermelha) e as manchas pretas marginais (setas brancas).

Fonte: ICAR-National Bureau of Agricultural Insect Resources.

Disponível em: <http://www.nbair.res.in/insectpests/Coccus-viridis.php>. Acesso em Janeiro 2016.

Durante a fase ninfal este inseto passa por três instares. As ninfas de primeiro instar (0,7mm de comprimento) têm intensa movimentação e são responsáveis pela escolha dos locais de alimentação. Já as ninfas de segundo (0,74mm) e terceiro instar (0,78mm) pouco se movimentam e adquirem formato

mais convexo e coloração mais escura, podendo se verificar a presença da vulva ainda não muito nítida (FREDRICK, 1943; SILVA, 1977; HOLLINGSWORTH, 2000).

Os adultos são sésseis e medem cerca de 2,0 a 3,25 mm de comprimento (SILVA, 1977; MOREIRA et al., 2007). O ciclo de vida de ovo a adulto apresenta duração de um a dois meses, podendo existir uma sobreposição de gerações por causa do prolongado período de oviposição (cerca de um mês e meio) (INFORME AGROPECUÁRIO, 2014).

## 2.2. Cafeeiro

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae que abrange mais de 10 mil espécies agrupadas em 630 gêneros. De acordo com classificação de Bridson (1994) e de Verdcourt (1988), os cafeeiros foram reunidos em dois gêneros: o *Psilanthus* Hook e *Coffea* L., os quais diferem, basicamente, por particularidades apresentadas nas estruturas florais.

O gênero *Coffea* é subdividido nos subgêneros *Coffea*, representado por mais de 80 espécies e *Baracoffea*, constituído por sete espécies. O subgênero *Coffea*, no qual já se encontram descritas mais de 90 espécies, destas, cerca de 25 são exploradas comercialmente, sendo que apenas quatro têm importância significativa no mercado mundial: *Coffea arabica* Lineu (café arábica), *Coffea canephora* Pierre ex Frohner (café robusta), *Coffea liberica* Hiern (café Liberica) e *Coffea dewevrei* T. Durand (café excelsa) (VERDCOURT, 1988; BRIDSON, 1994).

Outras espécies de café que merecem destaque pelo fato de serem cultivadas em seus locais de origem e principalmente por serem fontes importantes de genes para o melhoramento genético são as seguintes: *Coffea bengalensis* Heyne ex Wild, *Coffea eugenioides* S. Moore, *Coffea Stenophylla* G. Don, *Coffea racemosa* Lour, *Coffea congensis* Froenh, *Coffea zanguebariae* Lour, *Coffea abeokutoe* W. Bull e ainda as espécies da subseção *Mascharocoffea*, dos cafés descafeinados (CHARRIER, 1978; FAZUOLI, 1986; SAKIYAMA et al., 1999).

O café arábica é a espécie mais importante do seu gênero e corresponde cerca de 70% do café comercializado mundialmente. É nativa das terras altas da Etiópia, antiga Abissínia, e atualmente é cultivada no continente Americano, na África e na Ásia. Apresenta bebida de qualidade superior, de aroma marcante e sabor adocicado, sendo largamente difundida no mundo, consumida pura ou em misturas com outras espécies de cafés (CHARRIER, 1978; FAZUOLI, 1986; SAKIYAMA et al., 1999).

O grão é comercialmente conhecido como fava e compõe-se principalmente do endosperma, que apresenta coloração verde azulado. O endosperma é rico em polissacarídeos (50% a 55% da matéria seca do grão), lipídeos (12%- 18%) e proteínas (11% - 13%). Estas características estão estreitamente relacionadas com o desenvolvimento de sabores e aromas e podem variar em função da localização da lavoura, controle fitossanitário, processamento agrícola e ocorrência de defeitos (CORTEZ, 2001).

Dentre as espécies de *Coffea* já descritas, *C. arabica* é a única tetraplóide, sendo as demais diplóides. Isso significa que este café possui quatro conjuntos do número básico de cromossomos do gênero ( $n=11$ ), totalizando 44 cromossomos.

Quanto ao modo de reprodução, *C. arabica* é autógama, o que significa que a sua reprodução ocorre, principalmente por meio de autofecundação, chegando a ter 90% das suas flores fertilizadas pela junção de pólen e óvulo oriundos da mesma planta (SAKIYAMA et al., 1999).

Por enquanto o café Robusta é uma denominação generalizada que agrupa as variedades da espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. É nativo das florestas baixas da África Equatorial, na bacia do rio Congo, e atualmente cultivada em alguns países da África Central e Ocidental, no sudeste da Ásia e na América do Sul. Sua utilização é mais comum no preparo de "ligas" ou misturas (blends), nas quais é misturado ao café arábica, podendo compor até 30% do produto final. Por possuir maior teor de sólidos solúveis que o café arábica e apresentar maior rendimento após o processo de torrefação, o café robusta é componente essencial dos cafés solúveis. Normalmente, as plantas de *C. canephora* são diplóides, portanto apresentam duas cópias do número básico de cromossomos ( $n=11$ ), perfazendo um total de 22 cromossomos por núcleo celular. Apresentam reprodução alógama e auto-

incompatibilidade do tipo gametofítica, o que determina a fecundação cruzada, como único meio de reprodução sexuada da espécie. (CHARRIER, 1978; FAZUOLI, 1986; SAKIYAMA et al., 1999).

As plantas da espécie *C. canephora* são arbustos multicaules, apresentam desenvolvimento inicial mais lento do que o *C. arabica*, entretanto quando atingem a maturidade possuem copas mais desenvolvidas e porte mais elevado, os grãos de *C. canephora* têm elevado teor de cafeína, são menos aromáticos e quando torrados produzem bebida diferenciada.

A variabilidade da espécie robusta quanto à época de maturação possibilita o escalonamento da colheita e o aumento da uniformidade dos grãos, quando a lavoura é composta de talhões por mudas clonais, (MENDES & GUIMARÃES, 1996; MATIELLO, 1998)

### **2.3. Cochonilha-verde versus cafeeiro**

Apesar da importância desta praga em cafeeiros (LEPELLEY, 1968), não existem muitos trabalhos que estudem as relações entre o dano de *C. viridis* e as perdas em *C. arabica*. Fernandes et al., (2009) pesquisaram a relação desta praga com perdas em mudas de *C. arabica* e verificaram que o aumento da densidade das injúrias causadas pelas ninfas causou uma redução da área foliar e do diâmetro do caule das plantas. Além disso, constataram que o aumento da densidade de adultos reduziu o peso das raízes.

No cafeeiro, tanto as fêmeas adultas como as ninfas de *C. viridis* se movimentam na planta, injuriando ramos, folhas e até frutos de plantas jovens e adultas, sobretudo em condições de baixa luminosidade e em plantios adensados (STEIMAN, 2000). Ocorrendo em partes arbórea da planta, especialmente na parte abaxial das folhas (KOHLENER, 1978).

Ao se alimentarem, adultos e ninfas, introduzem o estilete e injetam toxinas no tecido vascular das plantas, ocasionando hipertrofia das células cambiais com colapso das células do floema, comprometendo o transporte de fotoassimilados pelo floema, alterando todo o metabolismo da planta (MAU & KESSING 1992; PEDIGO & RICE 2005), causando definhamento, queda de folhas, redução da produtividade e, em casos extremos, a morte da planta (SILVA, 1977; MOREIRA et al., 2007; WALLER, 2007).

Além disto, durante a alimentação elas excretam um líquido açucarado denominado “honeydew” ou melaço, no qual desenvolvem fungos do gênero *Capnodium* (Figura 2), que formam uma camada escura, conhecida por fumagina, recobrendo as folhas, causando a redução da fotossíntese e afetando o crescimento e a produtividade das plantas (GALLO et al., 2002; FERNANDES et al., 2009).



**Figura 2:** Muda de cafeeiro injuriada por *Coccus viridis*, destaque para a presença do fungo *Capnodium* nas as folhas.

A excreção açucarada desse coccídeo atrai formigas do gênero *Brachymyrmex* que percorrem ativamente a planta em todos os sentidos, não lhes causando prejuízo, mas são nocivas indiretamente, por defender as cochonilhas contra os inimigos naturais, sendo também o principal meio de dispersão da fumagina (CAMARGO & TELLES JÚNIOR, 1953; GALLO et al., 2002).

Essa praga apresenta-se em pontos focalizados dentro das culturas e seu nível crítica é um 10% de plantas infestadas dentro do cafezal. Para o controle de altas populações de *C. viridis* é recomendado a aplicação alterna

de inseticidas, organofosforados e piretroides. Estes são efetivos, mas pouco sustentáveis no curto prazo e tem que se aplicar em volumes maiores para ter uma boa cobertura da praga. Os óleos minerais provocam asfixia ao cobrir seus espiráculos (ASOCIACION NACIONAL DE CAFICULTORES, 2015).

No campo tem sido observados focos do fungo entomopatógeno *Verticillium lecanii*, o qual parece uma ferrugem branca sobre as cochonilhas. Além disso, têm sido observadas cochonilhas sendo parasitadas por microvespas, as que provocam a maior causa de mortalidade das ninfas da parte adaxial das folhas (ROSADO, 2009), mesmo assim tem sido observado no campo ninfas de cochonilhas sendo parasitadas por larvas de dípteros. (ASOCIACION NACIONAL DE CAFICULTORES, 2015).

#### **2.4. Enzimas digestivas dos insetos**

As enzimas digestivas dos artrópodes são hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam. Os principais grupos de enzimas digestivas dos insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último grupo melhor caracterizado. Estas são subdivididas em endopeptidases, proteases, que clivam ligações peptídicas internas na cadeia polipeptídicas e exopeptidases, que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal do polipeptídeo (JONGSMA & BOLTER, 1997; FAN & WU, 2005).

As proteases são amplamente distribuídas em quase todas as plantas, animais e microorganismos (VALUEVA & MOSOLOV, 2004; HAQ et al., 2004; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; CHRISTELLER, 2005; JOANITTI et al., 2006). Uma determinada espécie de inseto muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanístico serino, cisteino, aspartil o metalo-proteases, embora normalmente utilize um tipo principal no seu sistema digestivo (ZHU-SALZMAN et al., 2008; AHN & ZHU-SALZMAN, 2009).

As proteases digestivas são encontradas na região do intestino médio dos insetos e catalisam a clivagem de ligações peptídicas das proteínas ingeridas através do processo de hidrólise, liberando peptídeos e aminoácidos. Estão envolvidas em vários processos fisiológicos e bioquímicos incluindo

ativação de proteínas, ativação de pro-enzimas, produção de peptídeos bioativos, além da digestão de alimentos, coagulação sanguínea e fibrinólise, controle do tamanho de proteínas, resposta imune e apoptose (TERRA& FERREIRA, 2000; LEUNG-TOUNG et al., 2002; KANOST & CLARKE, 2005; CHOU&CAI, 2006).

#### **2.4.1. Serino-proteases**

Quase um terço de todas as proteases é classificado como serino proteases, assim nomeadas por apresentarem o resíduo nucleofílico de serina no sítio ativo.

Essa classe de proteases foi originalmente distinguida pela presença do sistema “relé de cargas” ou “tríade catalítica” Asp-His-Ser. Mais recentemente, serino-proteases com outras tríades e díades catalíticas foram descobertas, incluindo Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His (HENDSTROM, 2002).

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos, e em vírus. Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina (PAGE& DI CERA, 2008), participando de uma grande diversidade de processos fisiológicos, tais como na digestão, na ativação de proteínas específicas, na cascata de coagulação, no sistema imune e desenvolvimento de insetos e plantas (GORMAN et al., 2000; GILL et al., 1996).

As serino-proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidases, 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 a afinidade pelo substrato ( $K_m$ ). 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 mediador, 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, que leva a formação de um intercessor 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 30 vezes menor do que para a de desacilação. Para um substrato éster, esta velocidade pode ser de uma a três vezes maiores. 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 amidásica 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).

#### **2.4.2. Cisteíno-proteases**

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 na proximidade com a histidina catalítica (His159) cria à tríade Cys-His-Asn que é considerada análoga a tríade Ser-His-Asp arranjo encontrado em serino proteases.

As cisteíno-proteases apresentam maior atividade em pH neutro, embora algumas delas, por exemplo, as proteases lisossomais, têm sua atividade maximizada em pH ácido. As cisteíno-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 cisteíno-proteases podem variar de acordo com organismo que as produzem (RAO et al., 1998).

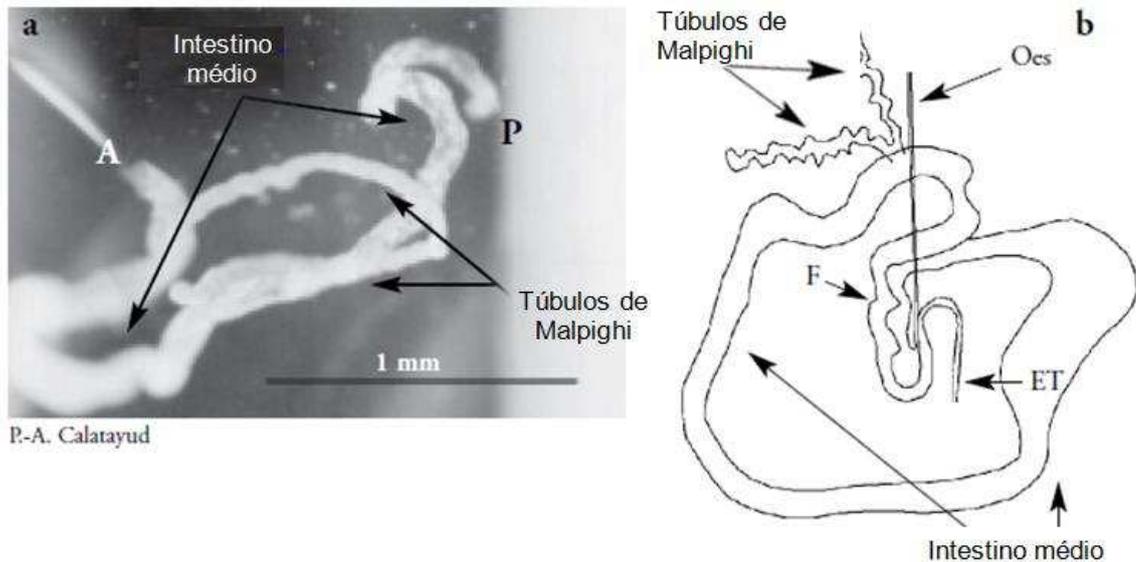
Estas enzimas desenvolvem um papel importante na degradação de proteínas de estoque durante a germinação. Na germinação de sementes, o requerimento de aminoácidos para a síntese de proteínas é fornecido pela proteólise de proteínas de reserva (POMPE-NOKOVAK et al., 2002). Possuem, ainda, importância no sistema de defesa de plantas contra insetos herbívoros (KONO et al., 2004) e estão envolvidas na morte celular programada de soja, induzida por estresse oxidativo (MENDOÇA et al., 2008).

Em mamíferos, cisteíno-proteases participam da degradação lisossomal de proteínas e têm sido relatadas com a invasão de células cancerígenas e com a apresentação de antígenos, as células do sistema imune (ALAVAREZ-FERNANDEZ et al., 1999). Cisteíno-proteases de parasitas da malária e da esquistosoma são consideradas potentes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra as infecções parasitárias (McKERROW et al., 1999).

## **2.5. Adaptações do sistema digestivo e enzimas digestivas da subordem *Sternorrhyncha*.**

Insetos que se alimentam do floema, uma dieta de constituintes alimentares na sua maioria simples, tais como aminoácidos livres e de açúcares, não possuem um sistema digestivo complexo, constituído por apenas um intestino médio sobre o qual está ligado um órgão excretor (tubos de Malpighi) (Figura 3) (PESSON, 1944; GRASSE, 1951).

Curiosamente, o sistema digestivo das cochonilhas também tem uma câmara de filtro(Figura 3), que é geralmente ausente em afídeos (GRASSE, 1951), mas que desempenha um papel importante na regulação da pressão osmótica e acumulação de nutrientes (YAVADA & CHANDEL, 1969).



**Figura 3:** Trato digestivo de *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero, 1977) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Pseudococcidae)(a) e Pseudococcidae em geral, de acordo com Pesson (1944). Em (b) são mostrados o A, parte anterior do intestino médio; P, parte posterior do intestino médio; Oes, esôfago; ET, tubo de excreção; F, câmara do filtro o contato das duas pontas do intestino médio.

Fonte: Calatayud, 2006.

A câmara filtro é formada por uma estreita conexão das duas pontas do intestino médio dobradas sobre si mesmo. Tal estrutura é particularmente importante para os insetos que ingerem um grande volume de seiva do floema (PESSON, 1944). Uma vez que uma proporção significativa dos nutrientes ingeridos na seiva é excretada, é provável que o inseto tenha um pH intestinal de uma faixa semelhante à da dieta ingerida. O pH do floema relatado para muitas espécies vegetais é ligeiramente a moderadamente alcalina (pH 7,2-8,5) (ZIEGLER, 1975).

Além disso, os insetos que se alimentam do floema respondem ao pH da sua dieta, preferindo dietas com um pH ligeiramente alcalino; por exemplo, quando as cochonilhas *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero foram criadas com dieta artificial a um pH 7,5 e depois foi medido o pH do intestino médio, foi estimado como ligeiramente alcalino com um pH 6,8-7,6 (GOTHILF & BECK,

1966; CALATAYUD et al.,1998; CALATAYUD, 2000; CALATAYUD et al., 2002).

Uma análise semi-quantitativa rápida das atividades enzimáticas do intestino médio de *P. herreni* após a alimentação foi realizada por Munera et al., (2006), utilizando um API-ZYM (sistema de detecção de enzimas). Ao comparar as atividades enzimáticas no intestino médio com os identificados no corpo após a extração do intestino médio, verificou-se que as principais atividades exibidas por todo o intestino médio foram para a alcalina-fosfatase, esterase e leucina-aminopeptidase. Essa presença das três principais enzimas intestinais reveladas pelo sistema API-ZYM foi confirmada pelo desenvolvimento de zimogramas de proteína por Calatayud & Le Rü (2006).

A enzima  $\alpha$ -glicosidase (ou invertase), que hidrolisa a sacarose não foi detectado em *P. herreni*, sendo que uma quantidade significativa de sacarose é excretada por tais insetos e é geralmente encontrada em grandes proporções, no *honeydew* ou melão, a sacarose (o principal composto do floema) pensa-se que é mais de um fagoestimulante do que um nutriente. Enquanto a atividade das serino-proteases tripsina-like e quimotripsina-like foram detectadas no intestino de *P. herreni*, mas não foi alta. No entanto, houve provas de uma enzima peptidase (leucina-aminopeptidase) (CALATAYUD & LE RÜ, 2006).

Enzimas peptidase também foram relatados no intestino médio de várias espécies de afídeos (SRIVASTAVA, 1987), e leucina-aminopeptidase foi encontrada em *Acyrtosiphon pisum* Harris (RAHBÉ et al., 1995), bem como detectadas no intestino médio do Aleyrodidae, *Aleurotrachelus socialis* Bondar e *Bemisia tabaci* Gennadius biótipos A e B (CALATAYUD, 2006).

As principais fontes de nitrogênio na seiva do floema são aminoácidos livres (ZIEGLER, 1975), alguns dos quais são essenciais no desenvolvimento de insetos que se alimentam do floema. Já que o floema contém também oligopéptidos (AUCLAIR, 1963; ZIEGLER, 1975; RAHBÉ et al., 1990). Os aminoácidos essenciais podem ser proporcionados como um resultado da ação das aminopeptidases digestivas, sugerindo que estas enzimas são importantes nos Sternorrhyncha (CALATAYUD & LE RÜ, 2006).

Em relação à atividade de cisteino-proteases na subordem Sternorrhyncha, estudos na distribuição de enzimas digestivas do afídeo

*Acyrtosiphon pisum* Harris mostraram que a enzima mais ativa foi a cisteino-protease catepsina-L-like, mesmo assim encontraram atividade de  $\alpha$ -Glucosidase e aminopeptidase. Isto sugeriu que as cisteino-protease e aminopeptidase tem um papel importante no sistema imune do inseto podendo eliminar toxinas presentes no floema além de procesar outras proteínas presentes neste (CRISTOFOLETTI et al., 2003).

## **2.6. Defesa e inibidores de proteases em plantas**

### **2.6.1. Defesas das plantas**

Muitos são os tipos de estresses que as plantas estão sujeitos, tais como, oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar e injurias causadas por pragas ou patógenos. Ao longo de uma coexistência de pelo menos 100 milhões de anos, plantas e insetos desenvolveram uma série de interações que podem ser benéficas ou maléficas (STOTZ et al., 1999), em uma relação constante, complexa e que é observada nos mais diversos ecossistemas. Esta interação pode ser mutuamente benéfica, quando os insetos propiciam às plantas atividades como polinização e defesa e quando as plantas propiciam aos insetos abrigo, local para reprodução e alimentação. Por outro lado, alguns insetos injuriam as plantas prejudicando seu desenvolvimento. No entanto, a capacidade das plantas responderem seus agressores parece ser bem desenvolvida, apresentando estratégias de defesa contra organismos como vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros, insetos e até mesmo mamíferos (DICKE et al., 2003). Sua habilidade em resistir as injuria de insetos são baseadas em defesas constitutivas e induzidas, que visam reduzir o desempenho dos herbívoros (ARIMURA et al., 2005).

As defesas das plantas precisam ser sincronizadas tanto no tempo quanto no espaço, através de complexas redes regulatórias que são influenciadas por interações com outras vias de sinalização. O resultado dessa integração de vias é um padrão característico de expressão gênica resultando, entre muitas outras atividades, na produção de fotoquímicos que vão agir contra herbívoros ou patógenos. Na defesa constitutiva, a planta expressa resistência de forma continua e este mecanismo não está ligado à presença ou

ação de herbívoros. O aparato que compreende este tipo de defesa é formado por compostos químicos e estruturas morfológicas que dificultam o acesso dos insetos a planta, podendo prejudicar alguns parâmetros do ciclo biológico, como reprodução e desenvolvimento do herbívoro (KARBAN & BALDWIN, 1997). Esses componentes podem ser encontrados em todas as partes das plantas, geralmente suas concentrações e quantidades variam com a idade da mesma (GOULD, 1998).

Defesas induzidas estão relacionadas às mudanças morfológicas e aumento do nível de metabólitos secundários ou proteínas relacionadas à defesa. Como tais eventos reduzem a qualidade nutricional do vegetal para os herbívoros, são consideradas como defesas diretas (KANT et al., 2004).

A ativação destas respostas específicas requer o reconhecimento das injúrias causadas pelo herbívoro, o que ativa os genes da planta através das vias de sinalização celular em poucos minutos (MAFFEI et al., 2007).

A maioria dos compostos de defesa sintetizados pelas plantas são metabólitos secundários pequenos e não protéicos, como alcalóides, terpenóides, flavonóides e saponinas (HILDER & BOULTER, 1999; PIUBELLI et al., 2005), além das proteínas de defesa, como os inibidores protéicos de protease (DE LEO et al., 2001).

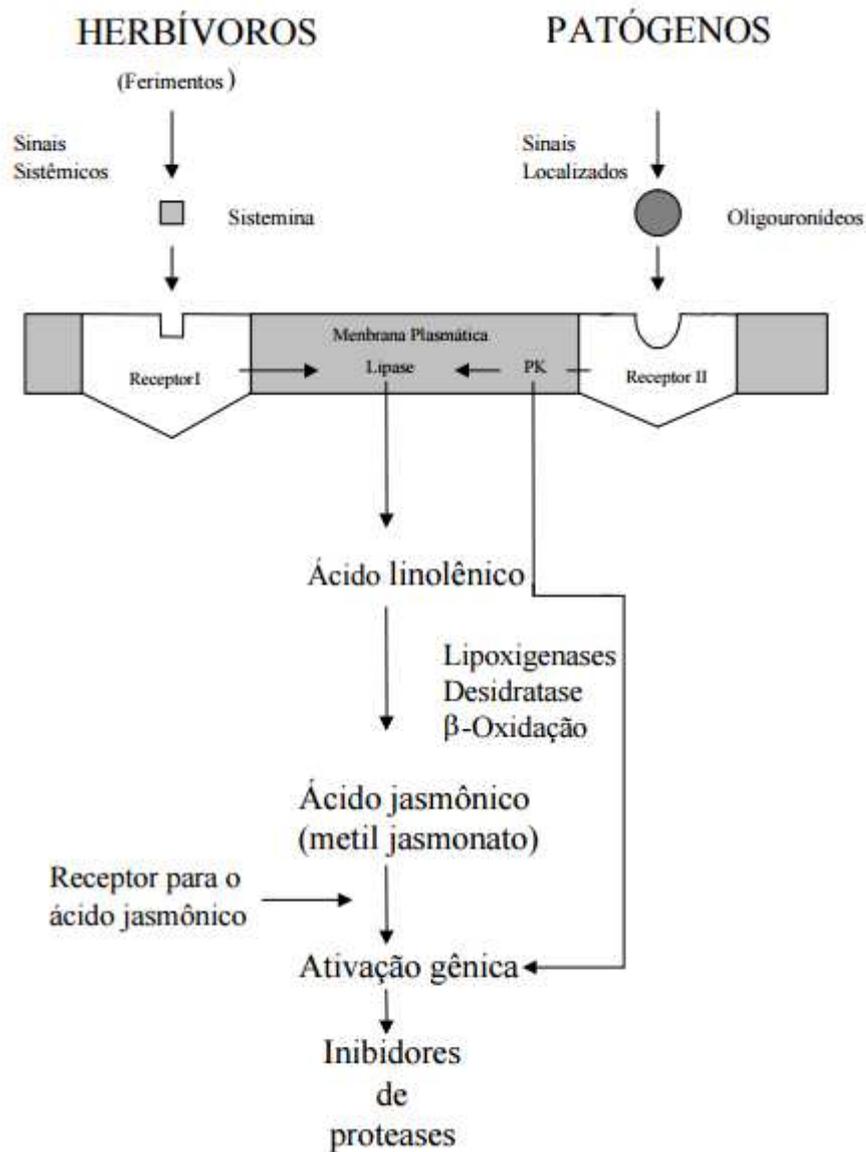
Um importante elemento envolvido na transdução de sinal após o ferimento no tecido vegetal por herbívoros é representado por uma rede de fitormônios. Onde através de interações sinérgicas e antagônicas, os herbívoros e plantas fornecem uma resposta que regula a expressão gênica, controlando assim a indução de proteínas de defesa (MAFFEI et al., 2007).

Uma das principais formas de defesas direta das plantas contra os insetos é mediada pela via das Lipoxigenases. Nessa via ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010). Desta forma as plantas respondem as injúrias dos insetos com a produção do hormônio jasmonato, ocorrendo uma ativação de genes de inibidores de protease nas folhas injúriadas e não injúriadas (GUIMARÃES et al., 2008; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010).

O modelo proposto por Farmer & Ryan (1992) para genes que codificam inibidores de proteases em plantas de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill.

(Solanaceae), mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa (Figura 4). Os autores postularam que o ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa (inibidores de proteases). Segundo esses autores, quando a planta é ferida por um inseto, é produzido um sinal sistêmico: sistemina (um peptídeo constituído de 18 resíduos de aminoácidos); ou quando a planta é injuriada por um patógeno, é produzida uma molécula-sinal: oligouronídeo (polissacarídeo presente na parede celular de plantas, liberado pela ação de patógenos).

A sistemina age na via sinalizadora octadecanóide que gera ácido jasmônico, um sinalizador chave para desencadear o processo genético de defesa (BARI & JONES, 2009). Quando uma folha é ferida por herbivoria ou mecanicamente, os genes codificadores de sistemina são expressos, transcritos e rapidamente transportados via floema para outras partes da planta ainda intactas (FARMER & RYAN 1992).



**Figura 4.** Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. PK=Proteína quinase (FARMER & RYAN, 1992).

De acordo com Matsubayashi & Sakagami (2006) a sistemina atua sobre a *mitogen activated protein* - MAP- cinase levando à ativação da fosfolipase e consequentemente a liberação do ácido linoléico das membranas e a ciclo-oxigenase que gera o intermediário do ácido jasmônico, o ácido 12-oxo-fitodienólico OPDA. Estes eventos culminam no aumento da produção de ácido jasmônico que regula, via *feedback* positivo, a expressão gênica da prosistemina. O ácido jasmônico produzido move-se através do sistema vascular onde alcança folhas intactas, desencadeando o processo de defesa

no vegetal provocando a inibição da herbivoria (PICCHI et al., 2009; SHIVAJI et al., 2010).

As plantas se defendem contra as diversas pragas e patógenos pela indução de defesas geral e específica (BRUCE & PICKETT, 2007; KESSLER & HALITSCHKE, 2007). Halitschke & Baldwin (2005) observaram que durante a infestação a de lagartas, a injúria no tecido das folhas da planta hospedeira induziu a biossíntese de fitohormônios oxilipinas, tais como ácido jasmônico (AJ), o qual resulta em resistência geral induzida dependente de octadecanóide. As plantas também atingem sua resposta de defesa especificamente contra os insetos herbívoros. O estudo do efeito do tratamento com ácido jasmônico em plantas de repolho (Brassicaceae) com relação a sua aceitabilidade para oviposição por duas espécies de mariposas, *Pieris rapae* Linnaeus (Pieridae, 1758) e *P. brassicae* Linnaeus (Pieridae, 1758) mostrou uma menor oviposição nas folhas tratadas com ácido jasmônico comparado com o controle (BRUINSMA et al., 2007).

A produção de ácido jasmônico é um processo regulado e as concentrações desse ácido em tecidos normais (não estressados) da planta são, geralmente, muito baixas. Entretanto, o ácido jasmônico acumula-se em plantas feridas ou em células de plantas tratadas com pragas e patógenos (WANG et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2008; SHIVAJI et al., 2010).

O papel dos jasmonatos na indução de genes de defesa contra estresse tem sido caracterizado com respeito à expressão de genes de inibidores de proteases induzidos por ferimento, os quais protegem a planta contra serino-proteases digestivas de insetos herbívoros (FARMER & RYAN, 1992).

### **2.6.2. Inibidores de proteases**

A existência de tais proteínas inibidoras foi inicialmente descoberta por Weinland em 1903, que usou o termo 'Antienzimas' para explicar a resistência de certos nematódeos (*Ascaris*) à digestão pelas enzimas do canal alimentar do seu hospedeiro. Suspeitou-se da ocorrência de compostos químicos semelhantes em tecidos de plantas por certo número de anos e finalmente foi confirmado em 1940 quando Kunitz isolou e purificou uma proteína termolábil a

partir da soja, que inibiu a tripsina , e Kneen & Sandstedt (1939) encontraram um inibidor da  $\alpha$ -amilase em grãos de cereais (RICHARDSON, 1980).

O mais conhecido desses inibidores de proteínas são as que afetam as atividades das enzimas proteínase. Ao bloquear a síntese de proteases intestinais, param o crescimento e podem até provocar a morte por jejum. As proteases são enzimas presentes no intestino do inseto que realizam a degradação da proteína do alimento ingerido pelos mesmos. As proteases são classificadas em quatro tipos de acordo com os aminoácidos ativos e o centro de reação (KOIWA et al., 1997): serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases. Elas degradam a proteína alimentar e biodisponibilizam os aminoácidos necessários ao crescimento e desenvolvimento normais do inseto (VILA et al., 2005).

Espécies de insetos das ordens Coleoptera e Heteroptera tendem a utilizar cisteíno-proteases (MURDOCK et al., 1987), enquanto espécies de Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Diptera usam principalmente serino-proteases (RYAN, 1990; WOLFSON & MURDOCK, 1990; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Ainda que as serino-proteases também têm sido identificadas nas glândulas salivais e no intestino médio dos Heteroptera (BOYD et al., 2002).

### **2.6.3. Inibidores de serino-proteases**

A classe das serino-proteases, à qual pertencem proteases como tripsina, quimotripsina e elastase, é responsável pela digestão inicial de proteínas de muitos animais. Todos os inibidores de serino-proteases de plantas realizam inibição competitiva, inibindo a protease pelo mesmo mecanismo (LASKOWSKI & KATO, 1980).

As serino-proteases têm sido identificadas em extratos do trato digestivo de muitas famílias de insetos, por exemplo, em Lepidoptera (HOUSEMAN et al., 1989; POMPERMAYER, 2000; POMPERMAYER et al., 2001). Os insetos dessa ordem, à qual pertencem muitas pragas de culturas importantes, apresentam pH ótimo no intestino numa faixa de 9-11 (APPLEBAUM, 1985), onde serino-proteases e exopeptidases são mais ativas (MARINHO et al., 2006).

As plantas sintetizam diversos inibidores de serino-proteases, sendo estes encontrados inicialmente em seus órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, e posteriormente, detectados nas folhas e nos frutos (XAVIER-FILHO, 1992). Além de protegerem as plantas contra as injúrias de insetos, os inibidores de protease também são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

Pompermayer et al., (2003) verificaram a interferência negativa da ingestão de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1774) (Lepidoptera: Crambridae) e outros estudos têm demonstrado o efeito antinutricional desses inibidores contra insetos da ordem Lepidoptera, quando oferecidos na alimentação (SHULKE & MURDOCK, 1983; APPLEBAUM, 1985).

O número de inibidores de serino proteases bem caracterizados excede o número de inibidores descritos para as outras três classes, podendo ser agrupados em, no mínimo, 16 famílias baseadas na similaridade de sequência e mecanismo de ligação (LASKOVSKI & KATO, 1980; BODE & HUBER, 1992). Os inibidores de serino proteases de plantas são agrupados em oito famílias: Bowman-Birk, Kunitz, Potato I, Potato II, Curcubita, Superfamília dos cereais, Ragi e Thaumatin PR-like (RICHARDSON, 1991).

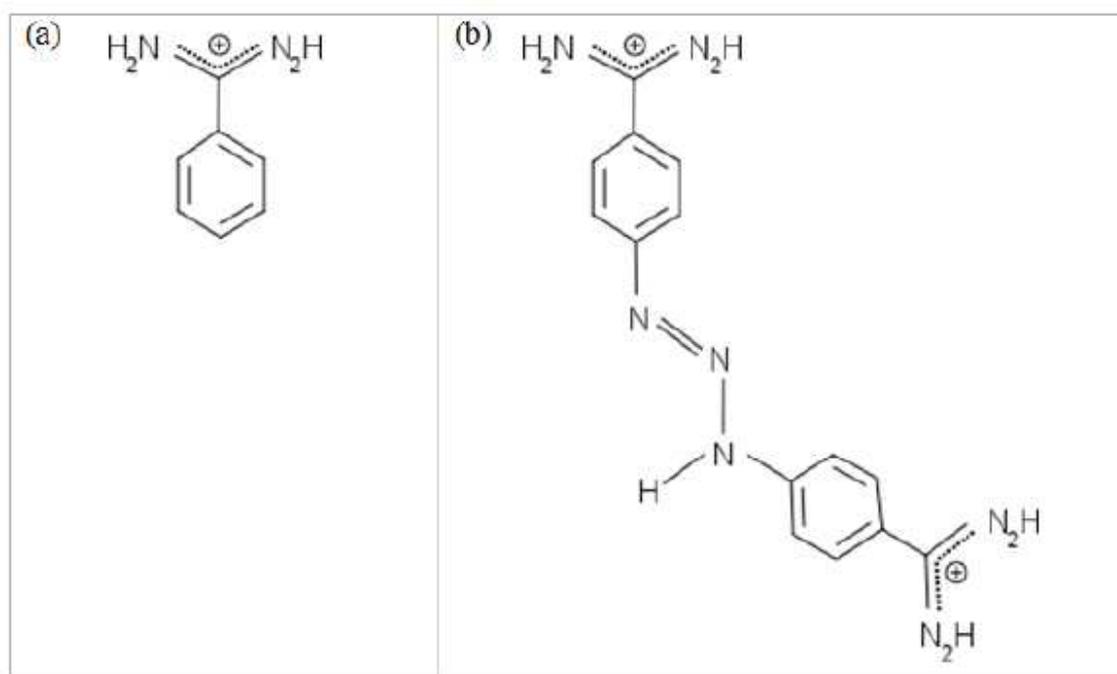
Em relação a outros inibidores de proteases, o mecanismo de interação dos inibidores de serino-proteases com suas enzimas alvo é mais conhecido. Estudos de sequenciamento e cristalografia por raios-X mostraram que estes inibidores, apesar de não serem homólogos, em sua maioria, interagem com um mesmo mecanismo padrão (LASKOVSKI & KATO, 1980). Este grupo de inibidores compreende pequenas proteínas de 29 a 190 resíduos de aminoácidos aproximadamente. Todos possuem um *loop* de ligação exposto em conformação bem característica (BODE & HUBER, 1992).

## **2.7. Inibidores de proteases sintéticos: Benzamidina e Berenil**

A benzamidina é uma amidina aromática, inibidor sintético competitivo de tripsina, apresentando constante de inibição ( $K_i$ ) de 1,0 mM (MARES-GUIA et al., 1981). A benzamidina, quando presente no meio de reação em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S1, da tripsina,

onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e, por interação eletrostática, entre seu grupamento amidina e entre um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico presente na porção do fundo do bolso do sítio S1 (MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993).

O berenil (aceturato de diminazeno) é uma molécula formada por duas moléculas de benzamidina (Figura 5) ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição 4 de cada anel. A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (RAETHER et al., 1974). Sendo também inibidor sintético das enzimas do tipo tripsina. O inibidor berenil, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima (OLIVEIRA et al., 1993). Apresenta um  $K_i$  de  $1,79 \mu\text{M}$  e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de uma variedade de infecções tripanossômicas quando administrado intramuscularmente em animais de interesse agrônômico como gado, ovelhas, cabras, porcos e cavalos (PEREGRINE & MAMMAN, 1993).



**Figura 5.** Estruturas da benzimidina (A) e do berenil (B).

Tem sido feito estudos dos efeitos destes IPs sobre pragas de importância econômica, sendo o berenil e benzamidina exemplos de IPs com potencial para uso como inseticida.

Marinho (2006; 2010) estudou o uso da benzamidina e berenil contra *Thyrnteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae), a benzamidina interferiu na resposta bioquímica das lagartas, as quais responderam com uma elevação da atividade das serino-proteases, como resposta a uma ativação enzimática frente à ingestão crônica do inibidor. No entanto não se mostrou eficiente em reduzir a atividade enzimática no intestino médio delas, provavelmente devido à adaptação das mesmas ao inibidor de proteases. Com relação ao berenil, este IP do tipo bis-benzamidina causou atraso no desenvolvimento larval e sobrevivência das larvas, também foram severamente afetadas por concentrações crescentes de berenil e concentrações sub-letais prejudicando parâmetros da tabela de vida de *T. arnobia*.

Pilon(2004) estudou a resposta da lagarta-da-soja *A. gemmatalis* ao inibidor de protease benzamidina quando incorporado à dieta artificial. Mostrou que alterou significativamente a digestibilidade do alimento protéico, afetando negativamente na fase larval desse inseto, tais como aumento do ciclo larval, diminuição de ganho de peso e aumento da mortalidade. Verificaram também que a presença do inibidor alterou os perfis de atividades enzimáticas, sugerindo que os insetos, após a ingestão alta de inibidores de proteases, podem apresentar respostas de defesa através da hiperprodução de proteases sensíveis à benzamidina e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor.

O efeito do berenil sobre lagarta-da-soja foi estudado por Paixão(2010), registrando interferência deste inibidor na resposta comportamental desses insetos, que tiveram preferência por plantas que não receberam pulverizações com o inibidor. Paixão (2010) também relatou que ocorreu uma redução significativa no ganho de peso e uma significativa redução na sobrevivência e no tempo de vida das larvas alimentadas com dieta artificial contendo este inibidor. Além disso este mesmo autor relatou inibição das atividades proteolítica e trípica do intestino das lagartas.

Por outro lado, Moreira (2007) avaliando concentrações crescentes do berenil acrescentado na dieta artificial de *A. gemmatalis* registrou que esse IP afetou negativamente o desempenho do inseto, reduziu o consumo alimentar, a

digestibilidade e a eficiência na assimilação do alimento ingerido e digerido, também reduziu a atividade proteolítica e triptica do inseto.

Todos estes resultados sugerem que a utilização de inibidores de protease possa ser uma estratégia promissora no controle de muitas pragas.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da presença dos inibidores de proteases sintéticos, benzamidina e berenil, sobre as enzimas digestivas e biologia de *C. viridis*. Além disso, verificar quais são os efeitos desses compostos na resposta bioquímica de *C. Arabica* sendo infestadas por *C. viridis*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito dos inibidores de proteases sintéticos na atividade proteasica intestinal do inseto sugador *C. viridis*.
- Determinar as concentrações de lipoxigenases e inibidores de proteases totais em folhas de mudas de *C. arabica*, com dano mecânico, com e sem infestação de *C. viridis*; e na presença e ausência de inibidores de proteases sintéticos.
- Avaliar os efeitos nos aspectos biológicos (crescimento, desenvolvimento, sobrevivência) de *C. viridis*, quando são pulverizados com inibidores sintéticos de tripsina em folhas de *C. arabica*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de realização dos experimentos**

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As avaliações biológicas foram realizadas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia/UFV, com temperatura de  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2. Material vegetal**

Mudas de cafeeiro de *C. arabica* da variedade Catuai vermelho, de seis meses de idade, foram obtidas no banco de germoplasma do programa de melhoramento genético de café da Universidade Federal de Viçosa. Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia/UFV.

### **4.3. Criação da cochonilha-verde**

Ninfas e adultos de cochonilhas *C. viridis* foram coletadas em folhas de café das plantações do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético de café da Universidade Federal de Viçosa e foram criadas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFV, seguindo o método usado por Rosado(2009). As ninfas foram transferidas para folhas do café catuai vermelho isentas de pragas e doenças. Posteriormente, foram colocadas no interior de uma gaiola (1,0m de comprimento x 0,5m de largura x 1,0m de altura) telada com organza branca, sobre uma bancada de madeira a uma altura de um metro do solo, onde ficaram protegidas de predadores e parasitóides.

#### 4.4. Experimentação

Foram instalados dois experimentos, separadamente e sob as mesmas condições. Nesses experimentos foram avaliadas as enzimas digestivas da cochonilha-verde do café, seus parâmetros biológicos e a resposta do cafeeiro.

As concentrações de inibidores sintéticos foram baseadas em estudos realizados com insetos mastigadores (MARINHO, 2006; PAIXÃO, 2010). A solução de Triton X-100 ao 0,005% (v/v) teve por objetivo aumentar a aderência da solução à folha segundo estes mesmos autores.



**Figura 6:** (a) Mudas de *Coffea arabica* utilizadas no experimento. (b) Detalhe da infestação de *Coccus viridis* em mudas de *C. arabica*. (c) Barreira feita com cola entomológica para isolar as cochonilhas do resto da planta.

A infestação das mudas foi feita semelhante à realizada por Rosado(2009) com algumas mudanças. Em cada muda foram presas, com clips (Figura 6-b), duas folhas providas das mudas da criação, que juntas continuam mais de 50 ninfas de *C. viridis* no primeiro instar. Estas folhas foram

colocadas no primeiro par de folhas de um dos ramos apicais durante 24 horas, para que as ninfas migrassem para a muda. Após este período, as folhas foram retiradas e, com auxílio de pinças e lupa manual, com aumento de 20 vezes, foram mantidas apenas 50 cochonilhas do primeiro instar por cada muda. Em seguida, foi colocado cola entomológica no entrenó mais próximo a essas folhas com o objetivo de evitar que as cochonilhas migrassem para o resto da planta.

#### **4.4.1. Experimento 1: Respostas bioquímicas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições (plantas) e nove tratamentos. Os tratamentos foram:

T1: Plantas limpas (sem insetos e sem inibidores sintéticos, somente pulverizados com a solução Triton X-100 0,005%(v/v))

T2: Plantas com ferimentos mecânicos e sem insetos, pulverizadas com a solução Triton X-100 0,005%(v/v);

T3: Plantas com insetos e pulverizadas com a solução Triton X-100 0,005%(v/v);

T4: Plantas com insetos e pulverizadas com a solução Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,25% (p/v) em água destilada;

T5: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,50% (p/v) em água destilada;

T6: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,75% (p/v) em água destilada;

T7: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,25% (p/v) em água destilada;

T8: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,50% (p/v) em água destilada;

T9: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,75% (p/v) em água destilada.

Para todos os tratamentos, o solvente para o Triton X-100 foi água destilada.

Para a avaliação da resposta bioquímica, as plantas foram expostas ao ataque dos herbívoros por sete dias. Depois desse tempo foi feita a pulverização, com as ninfas nas folhas, mimetizando uma aplicação do produto no campo (MARINHO, 2006). A pulverização foi feita utilizando um pulverizador plástico de pressão manual, contendo 150 mL da solução do inibidor de cada tratamento. Esta pulverização foi realizada às oito horas da manhã, quando as folhas do cafeeiro não apresentavam condições que possam diminuir a penetração do inibidor de proteases como, por exemplo, dureza da cutícula foliar, estomas fechados e estado iônico da folha (MALAVOLTA et al., 1980).

No caso do tratamento das folhas com injúria mecânica, esta foi feita ao mesmo tempo da infestação nos demais tratamentos, com ajuda de um alfinete entomológico, onde foram feitos um total de 50 perfurações.

Para as análises de concentração de proteína, atividade de lipoxigenases e da produção de inibidores de proteases, foram retiradas as duas folhas inicialmente infestadas. Para as atividades das enzimas digestivas da cochonilha-verde, foram realizadas com 30 ninfas de segundo e terceiro instar coletadas nas folhas e armazenadas em microtubos (1,5 mL). 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. As coletas das amostras foram feitas 24 horas após da pulverização dos IPs.

#### **4.4.1.1. Análises da atividade enzimática em *C. viridis***

##### **4.4.1.1.1. Extrato enzimático**

No laboratório, os 30 insetos foram macerados inteiros, com bastão de vidro estéril, adicionado 1 mL de solução HCl  $10^{-3}$  M e centrifugado a 10.000g 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.

##### **4.4.1.1.2. Determinação da concentração de proteína total**

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

#### 4.4.1.1.3. Determinação de atividade de serino-proteases

##### **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- $\alpha$ -12 Benzoil-L-arginine-4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM a 25°C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2mM. A mistura reacional consistiu de 400  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0; 500  $\mu$ L de substrato e 100  $\mu$ 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<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. 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:

A<sub>410</sub>= Absorbância a 410 nm;

$\epsilon$ = 8800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (coeficiente de extinção molar);

t= 120 segundos (tempo de incubação); e

l= 1,0cm (caminho ótico).

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

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato L-TAME (N- $\alpha$ -Tosyl-L-argininemethyl ester hydrochloride) na concentração final de 0,1mM a 25 °C, em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>. A mistura reacional consistiu de 450  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0; 500  $\mu$ L

de substrato e 50  $\mu\text{L}$  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  $540 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . A partir dos valores de absorbância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em  $\mu\text{M/s}$ , a partir da seguinte fórmula:

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

Onde :

$A_{247}$  = absorvância a 247 nm;

$\epsilon$  =  $540 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (coeficiente de extinção molar);

$t$  = 120 segundos (tempo de incubação); e

$l$  = 1,0cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a  $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína

### **Quimotripsina-like**

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato ATEE (N-5 Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate) na concentração final de 0,1mM a 25°C, em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM  $\text{CaCl}_2$ . A mistura reacional consistiu de 450  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0; 500  $\mu\text{L}$  de substrato e 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm por 2,5 minutos. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as atividades de formação dos produtos em  $\mu\text{M/s}$ , e atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades pela concentração de proteína (mg/mL).

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

Onde:

$A_{410}$  = absorvância a 410 nm;

$\epsilon$  =  $8800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (coeficiente de extinção molar);

$t$  = 120 s (tempo de incubação); e

$l = 1,0 \text{ cm}$  (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a  $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína

#### 4.4.1.1.4. Determinação de atividade de cisteino-proteases

A atividade amidásica de cisteino-proteases foi realizada pelo método descrito por Erlanger et al., (1961) com modificações conforme Mendonça et al., (2011; 2012), utilizando-se 500  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA) na concentração final de 0,5mM, a 25°C e 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 5 mM de Ditioneitol (DTT) para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Em 50  $\mu\text{L}$  de extrato foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do inibidor de serino-proteases benzamidina na concentração final de 1 mM, a qual corresponde ao  $K_i$  de inibição de tripsinas-*like* por benzamidina. A reação foi realizada durante 2,5 minutos com leitura de absorvância a 410 nm a cada 30 segundos. Para a determinação da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, p-nitroanilina,  $8800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . A partir dos valores de absorvância obtidos a 410 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

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

Onde :

$A_{410}$  = absorvância a 410 nm;

$\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (coeficiente de extinção molar);

$t = 120$  segundos (tempo de incubação); e

$l = 1,0\text{cm}$  (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a  $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína.

#### 4.4.1.1.5. 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 0,1M, pH 8,0; a 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 8000 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 determinadas a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas totais expressadas em mg/mL para a obtenção da atividade específica. Todas as análises do experimento foram realizadas em triplicatas.

#### **4.4.1.2. Determinação de lipoxigenase e inibidor de protease em folhas de cafeeiro**

##### **4.4.1.2.1. Extrato foliar**

As folhas foram limpas com o auxílio de uma pinça para a retirada das cochinilhas, em seguida elas foram lavadas com água destilada, para evitar alterações nas análises por resíduos dos IPs pulverizados, posteriormente foram cortadas com uma tesoura, acondicionadas imediatamente em envelopes de alumínio e colocadas em caixas de isopor, onde foram cobertas com nitrogênio líquido e transportadas ao Laboratório de Enzimologia - BIOAGRO, onde foram armazenadas no ultrafreezer a -80°C.

No laboratório, uma amostra da folha foi pesada (g) e imediatamente adicionado nitrogênio líquido. Em seguida, as folhas foram maceradas no almofariz até obtenção de um pó fino. Feito isso, adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% (p/v), ou seja, 2g de PVPP para cada 100mL de meio de extração. O PVPP teve como objetivo desativar os compostos fenólicos para que estes não interferiram com a atividade da lipoxigenase. 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 0,1M pH 8,2 e 20 mM CaCl<sub>2</sub>. Para a atividade lipoxigenase nas folhas, foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,5. Em todos os extratos, para as atividades enzimáticas e os inibidores, empregou-se o tampão na proporção 1:5 (p/v) isto é, a cada 1g de material vegetal foram adicionados 5 mL de tampão. O extrato foi homogeneizado e colocado em microtubos 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 espectrofotométricos.

#### **4.4.1.2.2. Determinação da atividade de lipoxigenase**

A extração 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 10mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer, envolvido por papel alumínio, contendo aproximadamente 10mL de água deionizada, previamente fervida, adicionou-se 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de tween 20 (SIGMA). Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática, tomando o cuidado para não formar bolhas. Para o clareamento da solução foram adicionadas gotas de NaOH 0,5M. 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 microtubos de 1,5mL com tampa, envolvidos em papel alumínio e armazenados a -20°C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases misturou-se 6,0 µL do extrato bruto foliar e 8,0 µL da solução estoque de linoleato de sódio em 990 µL 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, para a análise de controle (branco da reação) foram utilizadas as quantidades 998 µL do tampão e 6 µL de extrato bruto. 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:

$$\text{Velocidade de formação de produto} = \frac{A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

Onde:

$A_{234}$  = absorvância a 234 nm;

$\epsilon$  = 25000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm);

$t$  = 120 segundos (tempo de incubação); e

$l$  = 1,0cm (caminho ótico).

#### 4.4.1.2.3. Quantificação de inibidores de proteases

A extração de inibidores de proteases no extrato foliar foi determinada utilizando tripsina marca SIGMA ALDRICH com uma pureza de 99,8%. A determinação da atividade tríptica foi baseada no seguinte procedimento analítico: 20 µL do extrato foliar; 580 µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M, adicionados em um microtubo de 1,5mL. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro microtubo, 600 µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> 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 CaCl<sub>2</sub> e 500 µL da solução de L-BAPNA 1,2 mM. A absorvância 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:

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

Em que:

A = absorvância em 410 nm do controle – absorvância em 410 nm do teste;

B = diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e

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

$$\text{Velocidade de formação de produto} = \frac{A_{234}}{\varepsilon \cdot l \cdot t}$$

Onde:

A<sub>234</sub> = absorvância a 234 nm;

ε = 25000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm);

t = 120 segundos (tempo de incubação); e

l = 1,0cm (caminho ótico).

#### 4.4.1.3. Análises estatísticas

Os valores obtidos foram transformados para raiz quadrada de “x” com a finalidade de reduzir o coeficiente de variação. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov–Smirnov para atividade de proteases totais, atividade amidásica de tripsinas-*like*, atividade esterásica de tripsinas-*like*, atividade amidásica de quimotripsinas-*like*, cisteino-proteases de *C. viridis*, atividade de lipoxigenases e concentração de inibidor de proteases das plantas de *C. arabica*.

Em todas as análises, foram verificadas as pressuposições para análise de variância (ANOVA) pelo teste F a 5% de significância e comprovar

diferenças entre tratamentos. Comprovadas as diferenças, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software estatístico R version 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

#### **4.4.2. Experimento 2: Aspectos biológicos de *C. viridis***

A infestação das mudas foi feita conforme descrito no item 4.4. Cada planta tinha 50 ninfas de *C. viridis* no primeiro instar ao momento de fazer a aplicação dos inibidores de proteases. Foi realizada somente uma pulverização de IPs 24 horas após de ter feito a infestação dos insetos nas mudas de cafeeiro.

Para a avaliação dos parâmetros biológicos de *C. viridis* foi instalado um experimento com delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições (plantas) e sete tratamentos. Os tratamentos foram:

T1: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005%(v/v);

T2: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,25% (p/v) em água destilada;

T3: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,50% (p/v) em água destilada;

T4: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e benzamidina na concentração de 0,75% (p/v) em água destilada;

T5: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,25% (p/v) em água destilada;

T6: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,50% (p/v) em água destilada;

T7: Plantas com insetos e pulverizadas com Triton X-100 0,005% (v/v) e berenil na concentração de 0,75% (p/v) em água destilada;

Em todos os tratamentos, o solvente para Triton X-100 foi água destilada.

Para a avaliação da atividade biológica de *C. viridis* em plantas de *C. arabica* submetidas a tratamentos com os IPs benzamidina e berenil, o número de insetos mortos de *C. viridis* foi monitorado diariamente em todas as

repetições. Esses insetos foram monitorados com lupa de aumento de 20 vezes, após 24 horas da aplicação dos inibidores sintéticos. Acompanhou-se o desenvolvimento das ninfas até que as fêmeas se tornassem adultas e originassem a primeira ninfa.

Foram consideradas como mortas as cochonilhas que apresentavam necroses no seu interior (Figura 7) e que não se movimentavam. Avaliou-se, também o comprimento e peso alcançado pelas cochonilhas que chegaram à fase adulta. Na determinação do comprimento individual foi feito com ajuda de uma lupa estereoscópica trinocular, logo foi feita uma média aritmética simples por indivíduo de cada tratamento. O peso foi obtido usando uma balança Mettler AT200, pesando todas as cochonilhas adultas de cada tratamento de uma vez, foi feita uma média aritmética simples de peso por indivíduo dos insetos por cada tratamento.



**Figura 7:** *Coccus viridis* apresentando necroses no seu interior pelo efeito dos IPs.

#### **4.4.2.1. Análise estatística**

Os valores de peso (mg), e comprimento (mm) e porcentagem de mortalidade dos insetos que chegaram a adultos foram analisados.

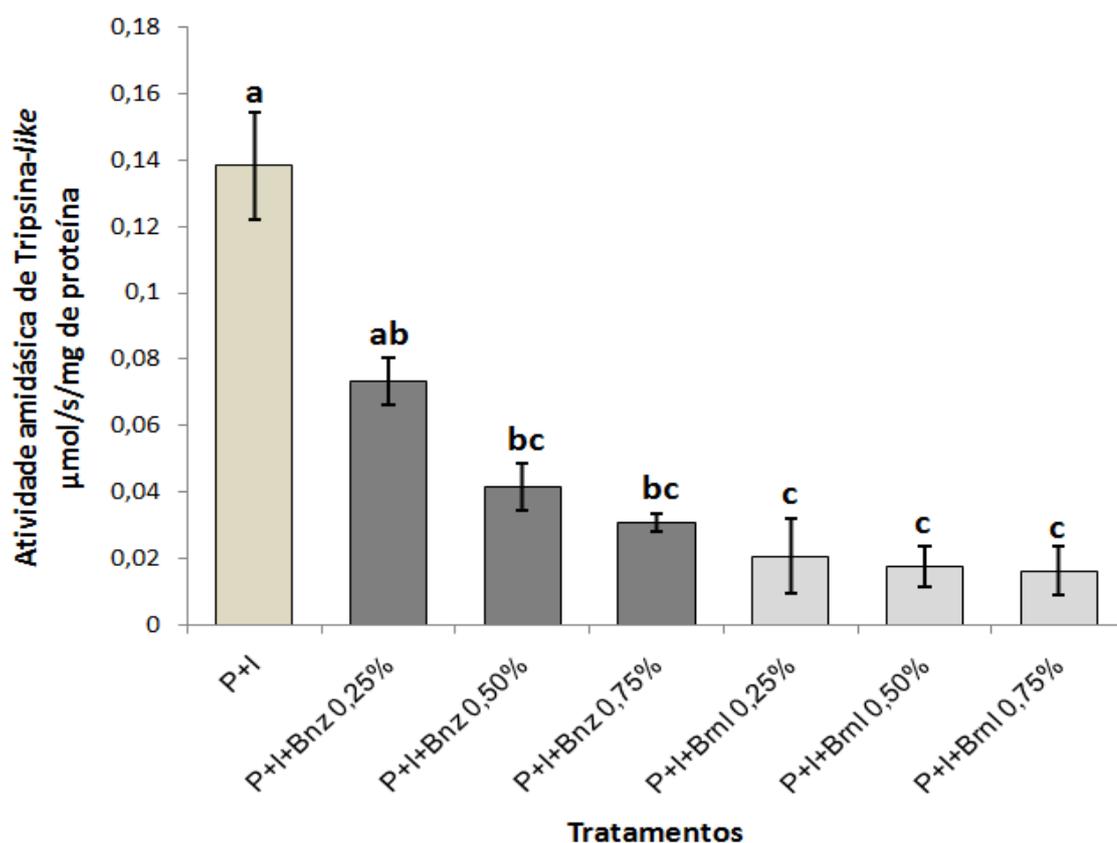
A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov–Smirnov assim como a homogeneidade das variâncias. Em todos as análises, foram verificadas as pressuposições para análise de variância (ANOVA) de um fator de interesse pelo teste F a 5% de significância para comprovar diferenças entre tratamentos. Para testar a diferença entre os tratamentos para peso, tamanho e porcentagem de mortalidade com os valores das medias foi feito o teste F a 5% de significância através de análise de variância ANOVA. O teste de Tukey HSD foi aplicado a 5% de significância para comparação de médias dos tratamentos. Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software Excel de Microsoft e o software estatístico R version 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Atividade das enzimas digestivas de *C. viridis*

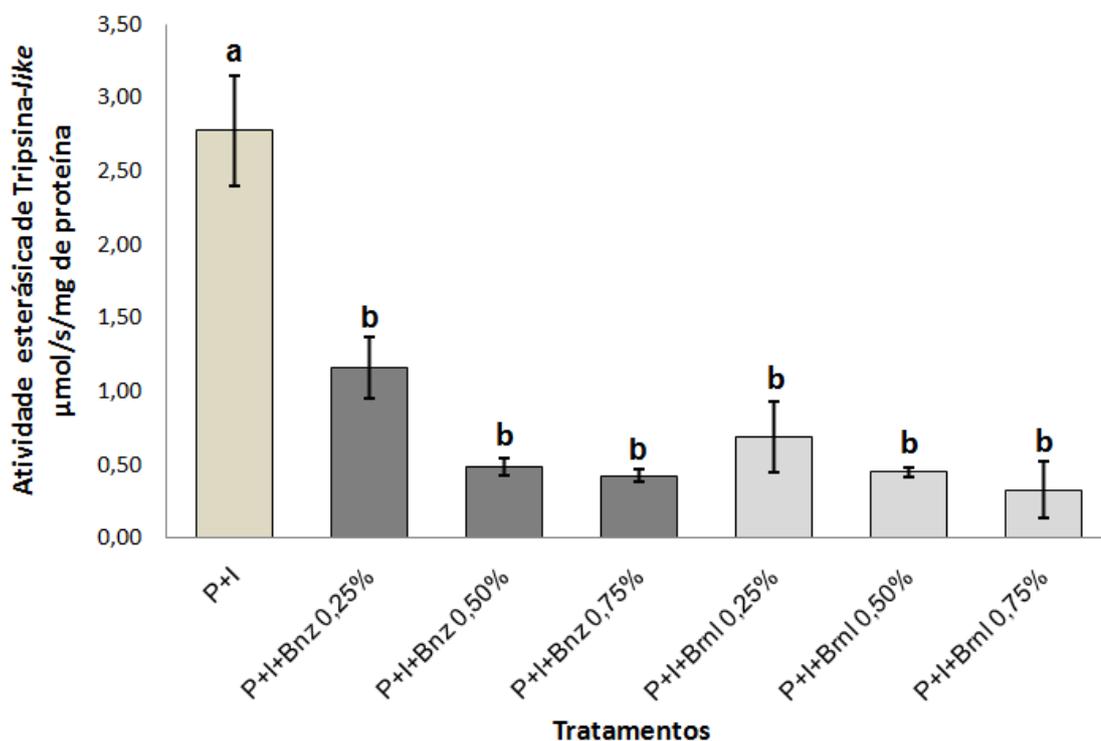
Para a atividade das enzimas de *C. viridis* considerou-se o tratamento 3 (Plantas com insetos e pulverizadas com a solução Triton X-100 0,005% (v/v)) como sendo o tratamento controle.

Na atividade amidásica de tripsina-like os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas. O controle foi significativamente diferente dos demais, com exceção do tratamento benzamidina 0,25%. Enquanto aos tratamentos benzamidina 0,50%, 0,75% e berenil 0,25%; 0,50% e 0,75%, não apresentaram diferenças significativas entre eles (Figura 8).



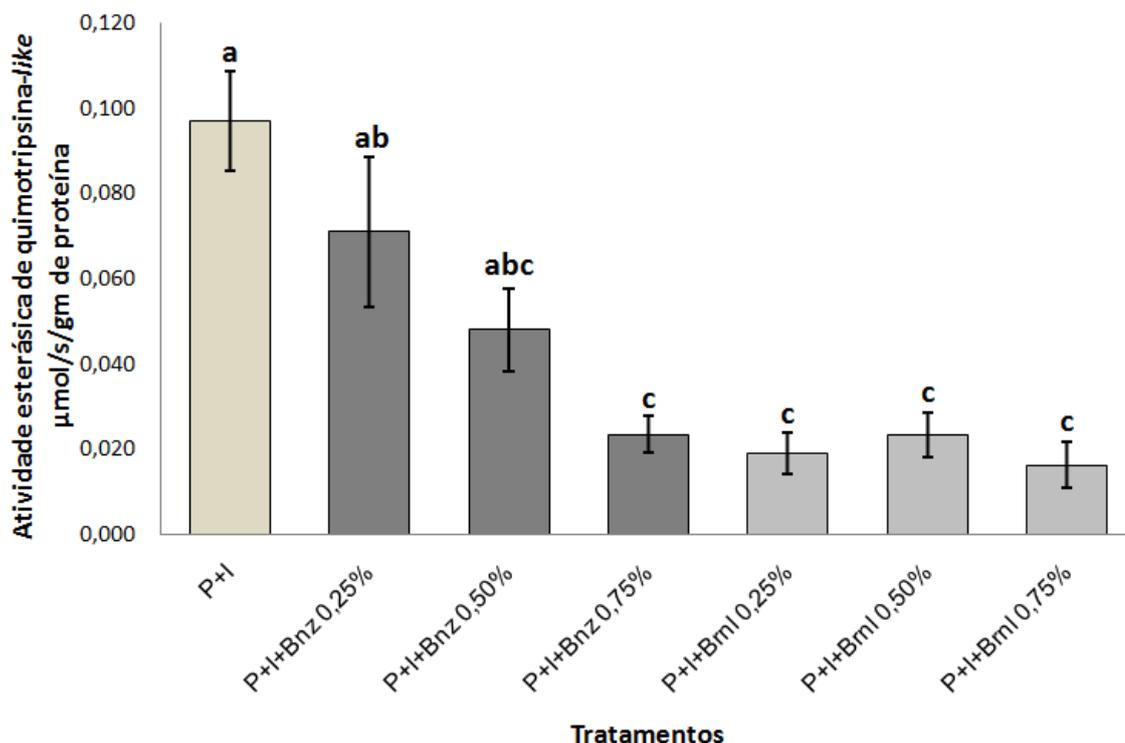
**Figura 8:** Atividade amidásica de tripsina-like ( $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos. Médias ( $\pm$  Desvpad;  $n=3$ ) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A barra de erro representa o desvio padrão das médias. (P=planta; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl=Berenil).

Houve diferença estatística entre os tratamentos com inibidores e o controle para a atividade esterásica da enzima tripsina-*like*(Figura 9). Foi verificado ainda que, para os dois tipos de inibidores não houve diferença estatística entre eles.



**Figura 9:** Atividade esterásica de tripsina-*like* ( $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos. Médias ( $\pm$  Desvpad;  $n= 3$ ) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A barra de erro representa o desvio padrão das medias. (P=planta; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl=Berenil).

Para a atividade esterásica de quimotripsina-*like*, a atividade do tratamento controle foi igual aos tratamentos benzamidina 0,25% e 0,50%. Enquanto para os tratamentos benzamidina 0,50%; 0,75% apresentaram os mesmos níveis de atividade dos tratamentos com berenil em todas as concentrações utilizadas (Figura 10).



**Figura 10:**Atividade esterásica de quimotripsina-*like*( $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína) para *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) sob os diferentes tratamentos. Médias ( $\pm$  Desvpad; n= 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.A barra de erro representa o desvio padrão das medias. (P=planta; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Bm1= Berenil).

As atividades das serino-proteases (tripsina-*like* amidásica, esterásica e quimotripsina-*like* esterásica), em geral, apresentaram um comportamento similar em todos os tratamentos, onde o tratamento controle apresentou diferenças significativas com os tratamentos benzamidina 0,75% e berenil 0,25%, 0,50% e 0,75%.

Os resultados sugerem que o berenil foi mais eficiente que a benzamidina na inibição da atividade das serino-proteases. Berenil, mesmo na menor concentração usada, reduziu a atividade enzimática na mesma proporção que a maior concentração usada para benzamidina. É observado também para berenil, que a inibição não é proporcional a dosagem utilizada, sendo a concentração de 0,25% tão eficaz quanto a 0,75%.

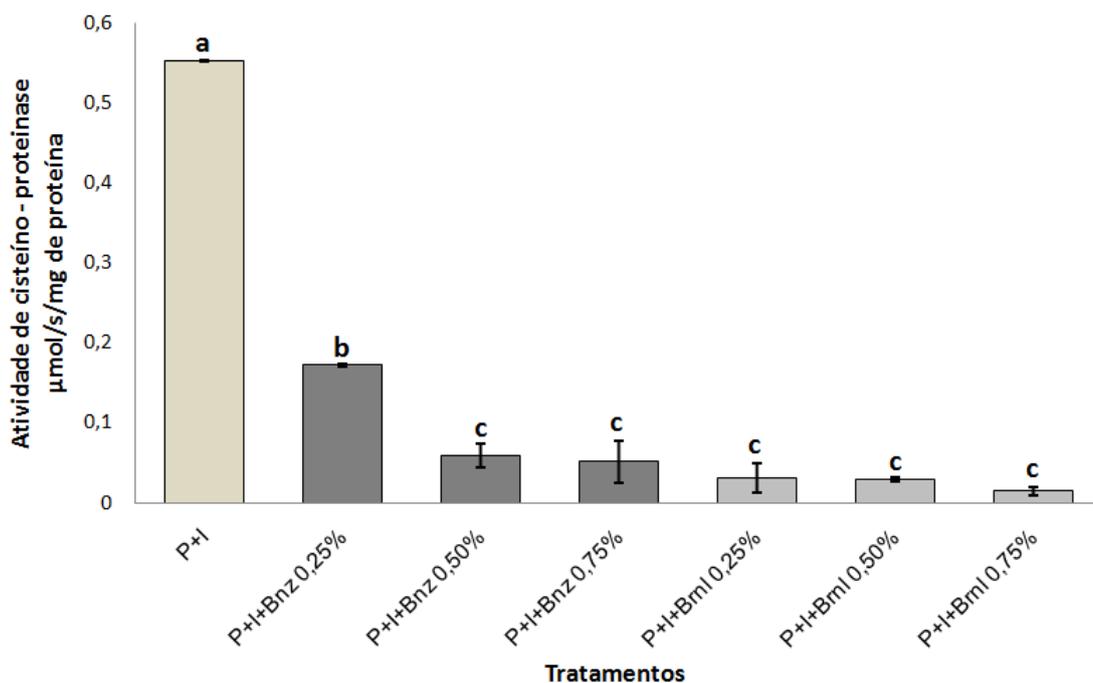
Isso pode ser explicado devido ao mecanismo de ação dos inibidores sintéticos e sua capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvos, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima. A benzamidina composta por uma sola molécula de seu mesmo nome,

posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S1, da tripsina, enquanto o berenil, tem uma entropia menor, com uma molécula deste (duas benzamidas) pode ocupar o centro ativo (S1) da tripsina como inibidor competitivo, e liga-se ao sítio ativo secundário (S2) da enzima, acoplado a cada molécula de benzamida a cada sítio ativo da enzima (MARES-GUIA et al., 1981; OLIVEIRA et al., 1993).

Os inibidores sintéticos de proteases são considerados agentes antimetabólicos que podem causar deficiência proteica nos insetos. Sua ação inibitória é atribuída à interferência na digestão proteica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto, podendo eventualmente ocasionar sua morte pela inibição das proteases digestivas ou por uma hiperprodução destas enzimas (JONGSMA & BOLTER, 1997; POMPERMAYER et al., 2001; XAVIER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

Os efeitos do berenil e benzamida nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras, tais como, incorporando na dieta artificial dos insetos (PILON et al., 2006; RAMOS et al., 2009), pulverização direta sobre a planta (PILON, 2008; MARINHO, 2010; PAIXÃO, 2010) e através da expressão em plantas transgênicas (VILA et al., 2005; MAHESWARAN et al., 2007; STEPPUHN & BALDWIN, 2007). Mas os trabalhos dos autores acima mencionados foram feitos com insetos mastigadores. Ficando também evidente neste trabalho, que os inibidores de proteases sintéticos (IPs) podem causar efeitos deletérios sobre a atividade proteolítica dos insetos sugadores da ordem Heteroptera.

Para atividade de cisteino-proteases o controle foi estatisticamente superior aos demais tratamentos. A dosagem de benzamida 0,25%, exceto para o controle, apresentou maior atividade que as outras concentrações de IPs. Os tratamentos benzamida 0,50%; 0,75% e berenil 0,25%; 0,50% e 0,75% apresentaram o mesmo nível de inibição para cisteino-proteases (Figura 11).



**Figura 11:** Atividade esterásica de cisteino-proteases ( $\mu\text{mol/s/mg}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos. Médias ( $\pm$  Desvpad;  $n= 3$ ) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A barra de erro representa o desvio padrão das medias. (P=planta; l=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl= Berenil).

Ao igual que nos resultados das serino-proteases, o berenil foi mais eficiente que a benzamidina na inibição da atividade das cisteino-proteases. Uma vez que, o berenil na menor concentração testada, inibiu a atividade enzimática na mesma magnitude que as duas maiores concentrações usadas para benzamidina. Além disso, a inibição produzida por este inibidor não foi proporcional a dosagem usada, pelo que a concentração de 0,25% é tão eficaz como a 0,75%. Pelo que se pode considerar que a dose com a concentração de berenil ao 25% foi a mais eficientes de todas as testadas.

Em relação à atividade de cisteino-proteases no intestino de *C. viridis*, foi afetada negativamente pela presença da benzamidina e do berenil. Fato que não era esperado, já que em teoria, a benzamidina e o berenil são especialmente inibidores competitivo de serino-proteases, como foi descrito em estudos com tripsina-like usando benzamidina em *A. gemmatalis* (PILON, 2004; XAVIER et al., 2005; PAIXÃO, 2010), *T. leucoceraea* (MARINHO, 2006), *Locusta migratoria* (LAM et al., 2000), *Rhyzopertha dominica* (ZHU & BACKER,

1999), *Sesamia nonagroides* (NOVILLO et al., 1999) e *Ostrinia nubilalis* (BERNADI et al., 1996).

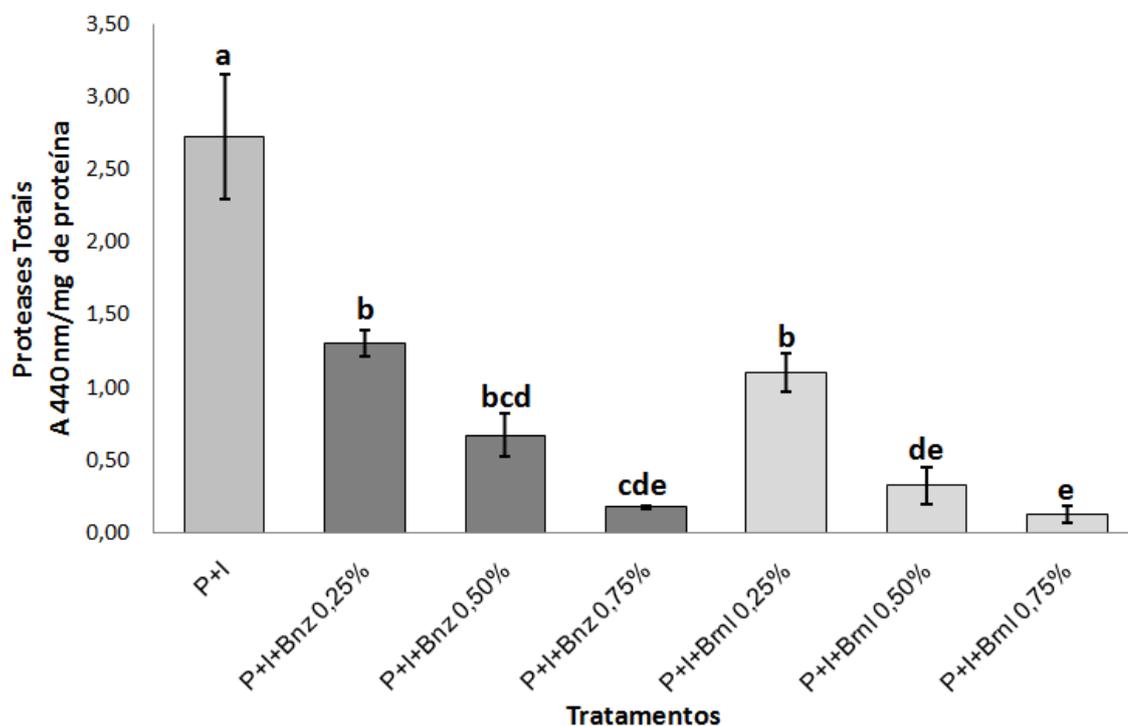
Em contrapartida, trabalhos realizados com o berenil e a lagarta-parda do eucalipto *Thyrintea arnobia* (Stoll, 1782) (Geometridae) mostraram uma diminuição na atividade específica de cisteíno-proteases em presença de berenil (MARINHO, 2010).

Em estudos realizados por Paixão (2010), com a lagarta-da-soja, não encontraram diferença na atividade de cisteíno-proteases no intestino médio entre os tratamentos testados, ou seja, a presença de berenil não induziu o aumento da atividade catalítica dessas enzimas, mantendo os níveis de cisteíno-proteases normais ou evitando seu incremento. Isso seria uma tentativa desse inseto de impedir a diminuição nas atividades proteolítica e trípica provocada pela ação desse inibidor. Sugerindo que o berenil inibiu a ação das cisteíno-proteases.

De acordo com Marinho (2010) e Paixão (2010) o berenil além de inibir tripsina-*like*, inibe a ação de cisteíno-proteases que são produzidas como estratégia de defesa do inseto, uma vez que serino e cisteíno-proteases são as enzimas mais importantes na quebra de proteínas no intestino de lepidópteros e heterópteros.

Existem outros relatos sobre inibidores de serino proteases que também são ativos sobre outras enzimas, como por exemplo, inibidores de tripsina que também inibem papaína (uma cisteíno protease) (MACEDO et al., 2004; SOUZA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007), e também aqueles que apresentam uma atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (KOIWA et al., 1997; BELITZ & GROSCH, 1997).

A atividade de proteases totais nas cochonilhas do tratamento controle apresentou maior atividade em relação aos outros tratamentos. Os tratamentos benzamidina 0,25%, 0,50% e berenil 0,25% foram estatisticamente iguais, enquanto aos tratamentos com concentrações de benzamidina 0,75% e berenil 0,50%, 0,75% não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 12).



**Figura 12:** Atividade de proteases totais (Absorvência 440 nm/mg de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos. Médias ( $\pm$  Desvpad; n= 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A barra de erro representa o desvio padrão das médias. (P=planta; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brl=Berenil).

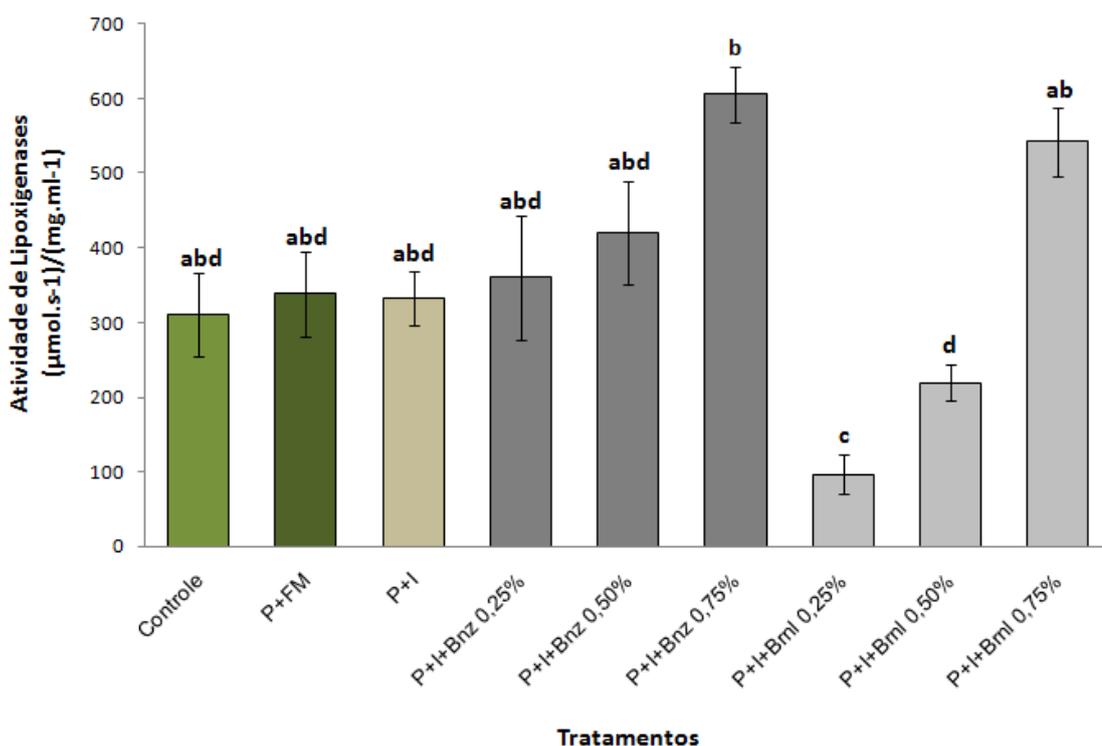
Assim como ocorreu com a atividade de serino-proteases e cisteino-proteases, os menores valores de atividade de proteases totais foram nos tratamentos com a aplicação dos IPs benzamidina e berenil (Figura 12), indicando que a atividade proteases totais nos tratamentos pulverizados com IPs ocorreu uma redução da atividade proteásica total, afetando negativamente a fisiologia do inseto. A avaliação da atividade de proteases totais indicou que o efeito de inibição dos inibidores de protease benzamidina e berenil pulverizado sobre as folhas, afetou da mesma magnitude, quando foram comparando, dose x dose, não apresentou diferenças significativas entre a benzamidina e berenil nas mesmas concentrações.

Estudos indicam que o efeito de proteínas anti-nutricionais, tais como os IPs, no controle de insetos não são adequadamente avaliados quando os bioensaios se baseiam na incorporação dos inibidores em dietas artificiais (POMPERMAYER et al., 2003). Porém, neste trabalho onde os IPs sintéticos foram aplicados diretamente sobre as folhas de cafeeiro sendo infestadas por

*C. viridis*, e depois de obter os resultados da atividade de proteases totais pode-se sugerir que os IPs sintéticos benzamidina e berenil têm um potencial para controlar este inseto, afetando diretamente sua atividade proteolítica.

## 5.2. Análise dos extratos foliares de *C. arabica*

Para a atividade de lipoxigenases (LOX), verificou-se que não houve diferenças na atividade de enzimas lipoxigenases entre o tratamento controle (planta sem inseto e sem IPs), tratamento de plantas com ferimentos mecânico, tratamento de plantas sob ataque de *C. viridis* e os tratamentos de plantas infestadas com *C. viridis* pulverizadas com benzamidina nas concentrações 0,25%; 0,50%; 0,75% e berenil na dose 0,75% (Figura 13).



**Figura 13:** Atividade específica de lipoxigenase (LOX), ( $\mu\text{mol.s}^{-1}$ )/( $\text{mg.ml}^{-1}$ ) de plantas de *Coffea arabica*, plantas controle, plantas com ferimento mecânico e plantas sob herbivoria após de oito dias de infestação (um dia após da pulverização de IPs) de acordo com os tratamentos. A barra de erro representa o desvio padrão das medias. Médias dos tratamentos ( $\pm$  Desvpad; n= 3) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P=planta; FM= ferimento mecânico; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl= Berenil).

As quais apresentaram diferenças estatísticas com o tratamento berenil 0,25%. Enquanto o tratamento berenil 0,50% apresentou diferenças estatísticas com os tratamentos de benzamida 0,75% e berenil 0,25%; 0,75%, sendo igual ao resto dos tratamentos.

Então, sendo o tratamento de berenil 0,25% o único que apresentou diferenças com todos os tratamentos, em especial com a dose maior do mesmo inibidor. Apresentando o tratamento do berenil com menor concentração, uma maior inibição da lipoxigenase, e a maior concentração uma menor inibição. Efeito inverso ou oposto ao que se esperava, hipoteticamente poderia se dizer que o berenil tem um efeito bifásico sobre a atividade da lipoxigenase onde a menor concentração, maior a inibição da lipoxigenase e conseqüentemente a maior concentração do berenil menor inibição da enzima.

Com tudo, a expressão da resistência está frequentemente acompanhada pela ativação das enzimas fenoloxidasas e polifenoloxidasas e pela peroxidação de lipídeos por enzimas como as lipoxigenases (GOODMAN & NOVACKY, 1994). No entanto, não se observou um aumento significativo das atividades lipoxigenases nas folhas de café após a injúria de *C. viridis*, que se possa relacionar diretamente com o sistema de defesa do cafeeiro contra a cochonilha-verde. Tal como foi observado em estudos feitos por Merino-Cabrera (2015), em plantas de *C. arabica* injuriadas por bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), onde a atividade das lipoxigenases aumentou sendo diferentes em relação as plantas controle (limpas).

Resultados similares aos de Merino-Cabrera (2015), 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, além de Merino-Cabrera (2015), 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

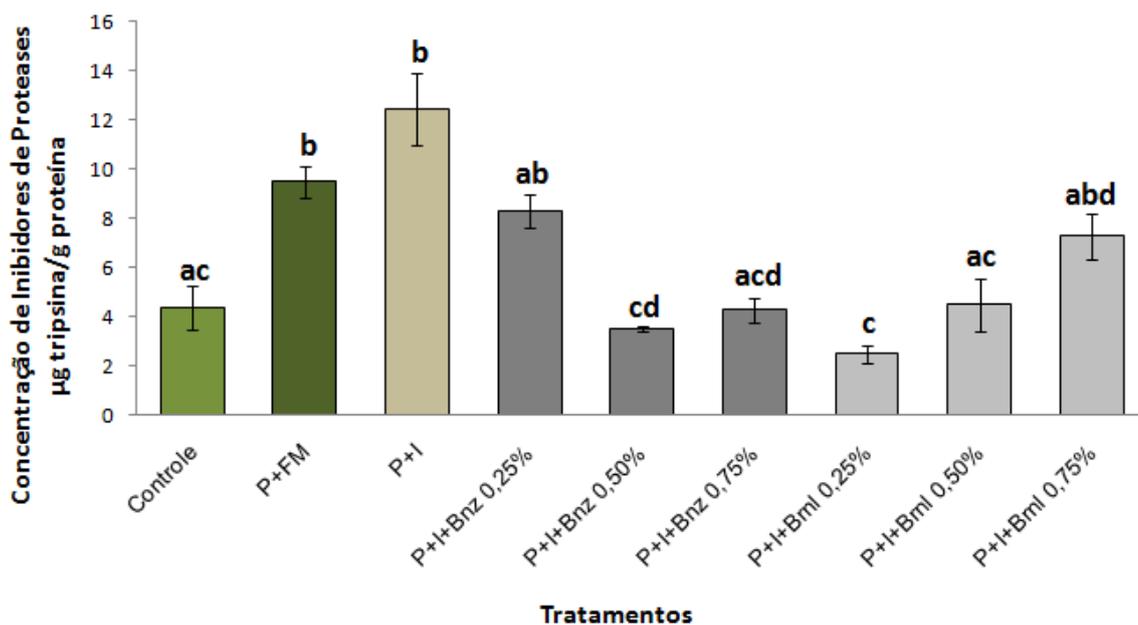
(PATUI et al., 2007), e no caso da utilização das folhas o maior interesse tem sido a análise em plantas infestadas com ferrugem (ROJAS et al., 1993).

PEREIRA et al., (2009), indicou aumento da atividade desta enzima, em plantas infestadas de ferrugem, 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 seqüência de eventos que caracterizou a expressão do café contra ferrugem. Estes trabalhos demonstraram a ação de LOX conferindo resistência ao café contra o patógeno.

Com os resultados obtidos neste trabalho, não é possível relacionar diretamente a atividade das lipoxigenases com a defesa do cafeeiro e os efeitos que os IPs benzamidina e berenil podem ter sobre a atividade desta enzima, já que não houve diferenças significativas nos tratamentos.

Isso pode ser explicado pelo fato das lipoxigenases apresentarem outras funções na planta, não somente estando envolvidas na resposta a ferimentos e defesas contra danos causados por insetos-praga e patógenos, além disso as lipoxigenases também apresentam papel importante em crescimento e desenvolvimento da planta, senescência, e biosíntese de moléculas regulatórias (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991), pelo que sua atividade pode-se ver afetada por qualquer dessas situações.

Para os valores de concentração de inibidores de proteases, plantas do tratamento controle (plantas limpas) tiveram baixas concentrações de IPs, apresentando somente diferenças estatísticas com os tratamentos de plantas com ferimento mecânico e plantas sob ataque de *C. viridis*. Sendo os tratamentos das plantas infestadas com *C. viridis* pulverizados com benzamidina e berenil em todas as concentrações usadas, iguais estatisticamente com o controle. Além disso, os tratamentos com concentrações de benzamidina 0,25% e berenil 0,75% não tiveram diferenças estatísticas com os tratamentos de plantas com ferimento mecânico e plantas com *C. viridis*, tendo diferenças com estes tratamentos os que tinham concentrações de benzamidina 0,50%; 0,75% e do berenil 0,25% e 0,50% (Figura 14).



**Figura 14:** Concentração de IP ( $\mu\text{g}$  de tripsina inibida/g de proteína) de plantas de *Coffea arabica*, plantas controle, plantas com ferimento mecânico e plantas sob herbivoria após oito dias de infestação (um dia após da pulverização de IPs) de acordo com os tratamentos. A barra de erro representa o desvio padrão das medias. Médias dos tratamentos ( $\pm$  Desvpad;  $n=3$ ) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P=planta; FM= ferimento mecânico; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Bml= Berenil).

De acordo com Silva et al., (2002) as plantas de soja apresentam aumento significativo na produção de inibidores de proteases como resposta as lesões causadas pela lagarta *A. gemmatilis*. Também plantas de café robusta (*Coffea canephora*) suscetíveis ao acaro-vermelho (*Oligonychus ilicis* Berlese, 1886) (Acari: Tetranychidae), aumentaram os níveis de inibidores de proteases após da injurias causada por esse acaro (SILVA et al., 2015).

Plantas de amieiro (*Alnus glutinosa*) também responderam as injurias do besouro *Agelastica alni* com aumento da produção de inibidores de proteases (TSCHARNTKE et al., 2001). Igualmente, plantas de cafeeiro apresentaram um incremento na produção de inibidores de proteases após da herbivoria causada pelo bicho-mineiro (*L. coffeella*) (MERINO-CABRERA, 2015).

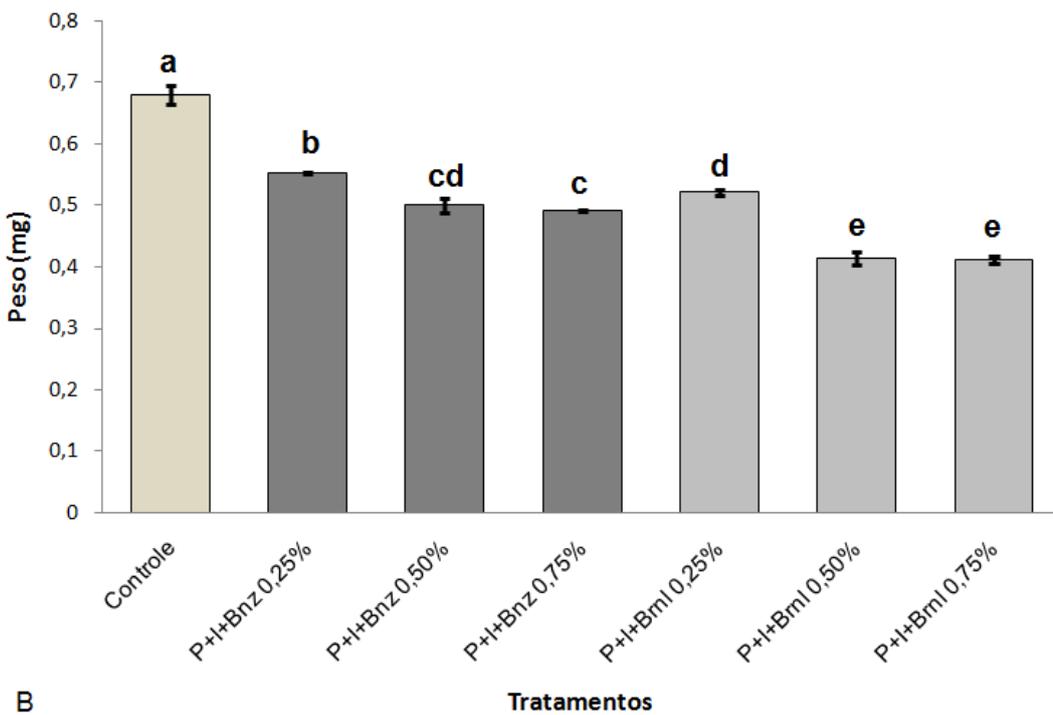
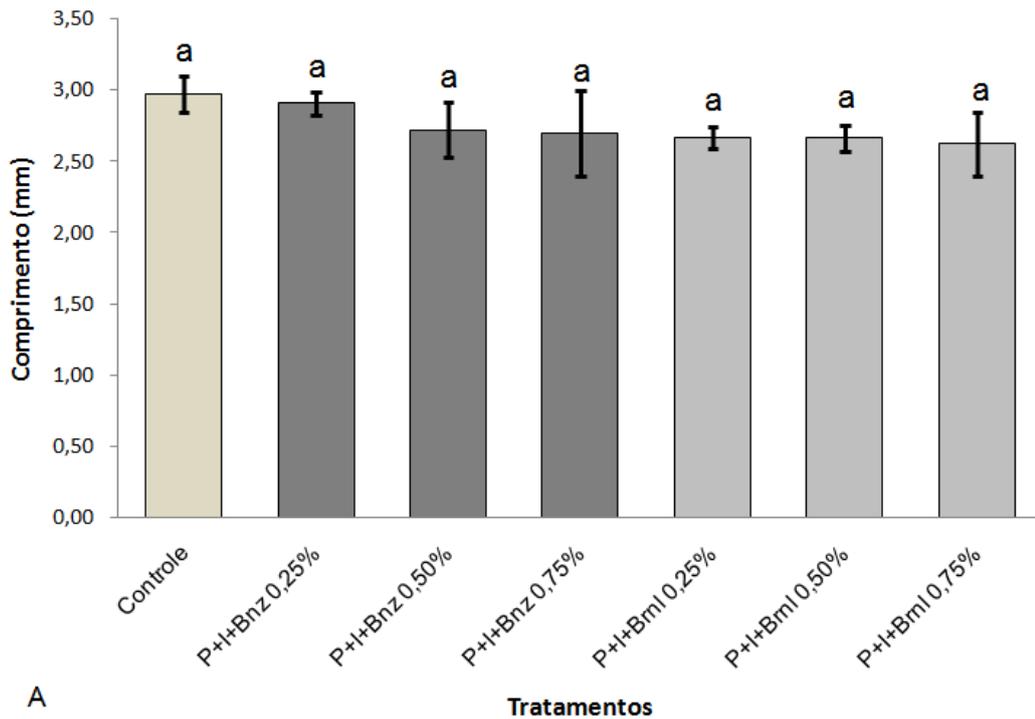
Os resultados indicam que as plantas de *C. arabica* apresentaram uma resposta contra *C. viridis* através da ativação da via de sinalização de defesa do ácido jasmônico (JA). Desta forma, acontece a produção JA o qual ativa os

genes que expressam os inibidores de proteases (FARMER RYAN & 1992; SCOTT et al., 2010;. SHIVAJI et al., 2010).

Plantas injuriadas por *C. viridis* e pulverizadas com benzamidina na concentração 0,50%, 0,75% e berenil nas concentrações 0,25% e 0,50% apresentaram uma atividade menor de inibição de enzimas proteolíticas. Considerando que as plantas estavam nas mesmas condições no momento da pulverização dos inibidores, ou seja, as concentrações de inibidores de proteases das plantas de todos os tratamentos sob ataque de *C. viridis* eram iguais, isso significa que aplicação exógena de IPs induziu a uma menor produção desse composto pela planta. Possivelmente a ação das moléculas sintéticas sobre o inseto atenuou as injurias desse sobre a planta. Indicando que os IPs benzamidina e berenil poderiam ter um efeito positivo sobre a planta, já que a segundo McKey (1974; 1979) e Rhoades (1979), a planta evita custos ou gasto de recursos em defesas os quais poderiam ser usados em crescimento e desenvolvimento dela, melhorando assim seu desempenho. Sendo a aplicação de inibidores sintéticos através da pulverização benéfica para as plantas de cafeeiro.

### **5.3. Avaliação biológica de *C. viridis***

Os efeitos dos inibidores sintéticos benzamidina e berenil sobre o comprimento e peso das cochonilhas estão apresentados na Figura 15. Pode-se observar que não houve diferença estatística nos tratamentos em relação ao comprimento das cochonilhas-verde (Figura 15-A). A variação do comprimento desses insetos foi similar ao citado por Fredrick (1943), quem relatou que o comprimento de *C. viridis* na fase adulta varia de 2,5 a 3,3mm. Sendo assim estes IPs não afetaram esta característica do inseto.



**Figura 15:** (A) Avaliação do comprimento de adultas de *Coccus viridis* em plantas limpas e quando foram pulverizadas com diferentes concentrações dos IPs benzamidina e berenil no primeiro instar sobre as folhas de *Coffea arabica*. (B) Avaliação do peso final alcançado por adultos de *C. viridis*, controle e quando foram pulverizadas com diferentes concentrações dos IPs de benzamidina e berenil no primeiro instar sobre folhas de *C. arabica*. A barra de erro representa o desvio padrão das médias. Nos dois parâmetros, as médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P=planta; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl= Berenil).

O peso final das cochonilhas das plantas de cafeeiro pulverizadas com os IPs benzamidina e berenil foi estatisticamente diferente quando comparado com o controle (Figura 15-B).

As cochonilhas do controle foram as mais pesadas e apresentaram média de  $0,68 \pm 0,15$  mg. Os insetos do tratamento com benzamidina 0,25% foi o que alcançou estatisticamente maior peso ( $0,55 \pm 0,01$  mg) em relação aos demais tratamentos contendo inibidores sintéticos em diferentes concentrações.

Os insetos dos tratamentos com doses de benzamidina 0,50% e 0,75% não apresentaram diferenças entre si e o peso médio das cochonilhas foi de  $0,50 \pm 0,02$  e  $0,49 \pm 0,01$  mg, respectivamente. Já os insetos do tratamento de berenil 0,25% pesaram, em média,  $0,52 \pm 0,04$  mg e foram estatisticamente iguais ao do tratamento benzamidina 0,50%. Os indivíduos dos tratamentos com concentrações de berenil 0,50% e 0,75% não apresentaram diferenças estatísticas entre si, foram os insetos mais leves, com peso médio de  $0,41 \pm 0,01$  mg, para ambas as concentrações de berenil.

Os resultados sugerem que o ganho de peso esta relacionado com atividade enzimática dos insetos, pois as atividades enzimáticas de *C. viridis* apresentaram uma redução nos tratamentos que continham os inibidores de proteases sintéticos (Figuras 8, 9, 10,11). Os insetos tratados com o berenil apresentaram um menor peso final ao chegar na fase adulta, já que as cochonilhas dos tratamentos com concentrações de 0,50% e 0,75% foram 39,7% mais leves que as do controle.

Essas diferenças entre os pesos indicam que os inibidores sintéticos que ocupam apenas o sítio S1 do centro ativo da enzima não têm a mesma eficiência inibitória que o berenil, que ocupa além do sub-sítio S1 o subsítio de ativação secundária S2 (OLIVEIRA et al.,1993).

As doses de benzamidina e berenil afetaram o peso das cochonilhas, esse fato pode prejudicar a performance dos adultos formados. Isso pode ser explicado pelo efeito dos inibidores sintéticos sobre as enzimas serino-proteases e cisteino-proteases de *C. viridis*, atuando no intestino do inseto ligando-se fortemente ao sítio ativo da enzima, através da formação de um complexo bastante estável enzima-inibidor, reduzindo dessa forma, a disponibilidade de aminoácidos essenciais à biosíntese de

proteínas importantes para o crescimento e desenvolvimento (MACEDO et al., 2007; PILON, 2008; CHOUGULE et al., 2008; PAIXÃO, 2010).

Alguns trabalhos comprovaram que os inibidores de proteases sintéticos incluídos no dia afetam o peso dos insetos. Paixão (2010) em estudos de ganho de peso de *A. gemmatalis* com o IP berenil verificou que as doses 0,20; 0,60 e 1,0% diminuíram em mais de 90% o ganho de peso das lagartas em comparação com o controle.

Bhattacharyya et al., (2007), examinando os efeitos de dois inibidores de protease, o inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) e o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI), adicionados na dieta do lepidóptero *S. litura*, verificaram uma diminuição no ganho de peso do inseto, sendo essa redução mais severa nos seis primeiros dias do desenvolvimento larval.

O mesmo foi observado por Silva et al., (2008) em lagartas de *D. saccharalis* tratadas com o inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* (ApTI). Srinivasna et al., (2005) mostraram que havia um decréscimo no peso médio das larvas de *H. armigera*, bem como uma inibição das enzimas tripsinas deste inseto, quando as larvas eram alimentadas em dietas contendo o inibidor de tripsina de *Cicer arietinum*. A alimentação de *Helicoverpa armigera* por duas gerações sucessivas com dietas artificiais contendo várias doses de dois inibidores de extratos de folhas de *Capsicum annum* demonstrou alto potencial de inibição em relação ao peso e ao desenvolvimento larval desse inseto (TAMHANE et al., 2005).

Todos estes trabalhos feitos com insetos da ordem Lepidoptera com aparelho bucal mastigador, mostraram resultados eficientes na redução de ganância de peso. Porém, nosso trabalho foi feito com um inseto da ordem Hemiptera, a qual possui um comportamento de alimentação do tipo sugador, sendo estes os primeiros relatos dos efeitos deletérios que tem os inibidores sintéticos em insetos sugadores a traves da sua aplicação em sua dieta.

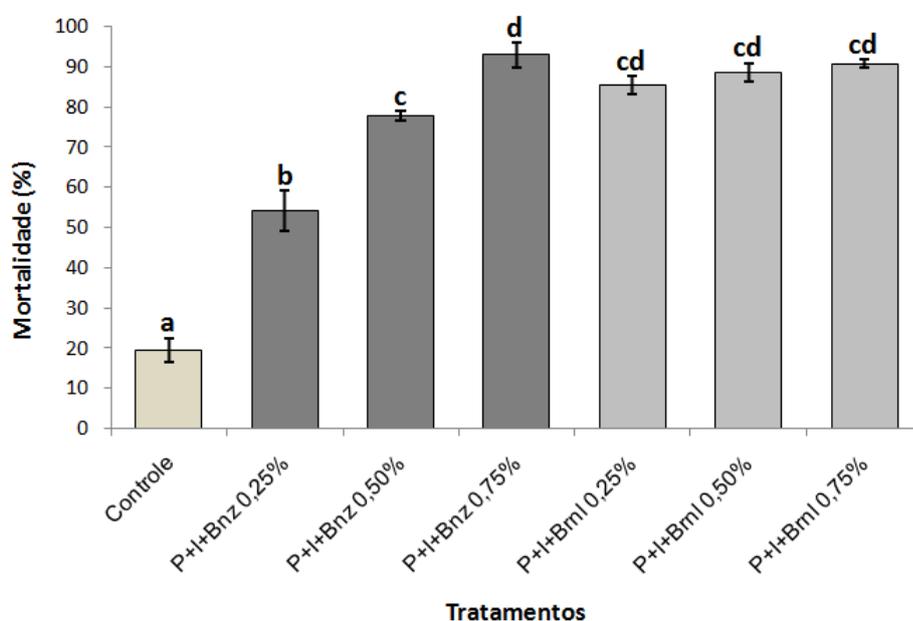
Na avaliação do efeito dos IPs benzamidina e berenil na mortalidade das cochonilhas *C. viridis*, verificou-se que as cochonilhas dos tratamentos de plantas de cafeeiro pulverizadas com 0,25%, 0,50% e 0,75 % destes inibidores sintéticos sofreram maior mortalidade do que as cochonilhas dos tratamentos das plantas controle (Figura 16), evidenciando, portanto, o efeito prejudicial dos

inibidores na atividade das enzimas digestivas desse inseto, causando redução no desenvolvimento, aumentando, assim, a mortalidade.

Cochonilhas em plantas sem inibidor (controle) apresentaram uma porcentagem de mortalidade de  $19,62 \pm 3,06$ . Apresentando o controle diferenças estatísticas com o resto dos tratamentos.

Os insetos dos tratamentos com benzamidina apresentaram uma porcentagem de mortalidade de  $54,19 \pm 5,03\%$  na concentração 0,25%, e  $77,83 \pm 1,15\%$  e  $93,02 \pm 3,05\%$  nas concentrações deste inibidor de 0,50% e 0,75%, respectivamente. Foram estatisticamente diferentes entre si, apresentado uma relação onde a maior a concentração usada, maior a mortalidade causada. O tratamento com concentração de benzamidina 0,25% foi diferente com os tratamentos do berenil em todas as concentrações usadas.

Os tratamentos com berenil nas concentrações 0,25%; 0,50% e 0,75%, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, com uma mortalidade porcentual de  $85,06 \pm 2,31\%$ ;  $88,57 \pm 2,31\%$  e  $90,82 \pm 1,15\%$  respectivamente. Mesmo assim, não tiveram diferenças estatísticas com os tratamentos benzamidina 0,50 e 0,75%, quando comparados individualmente com estes.



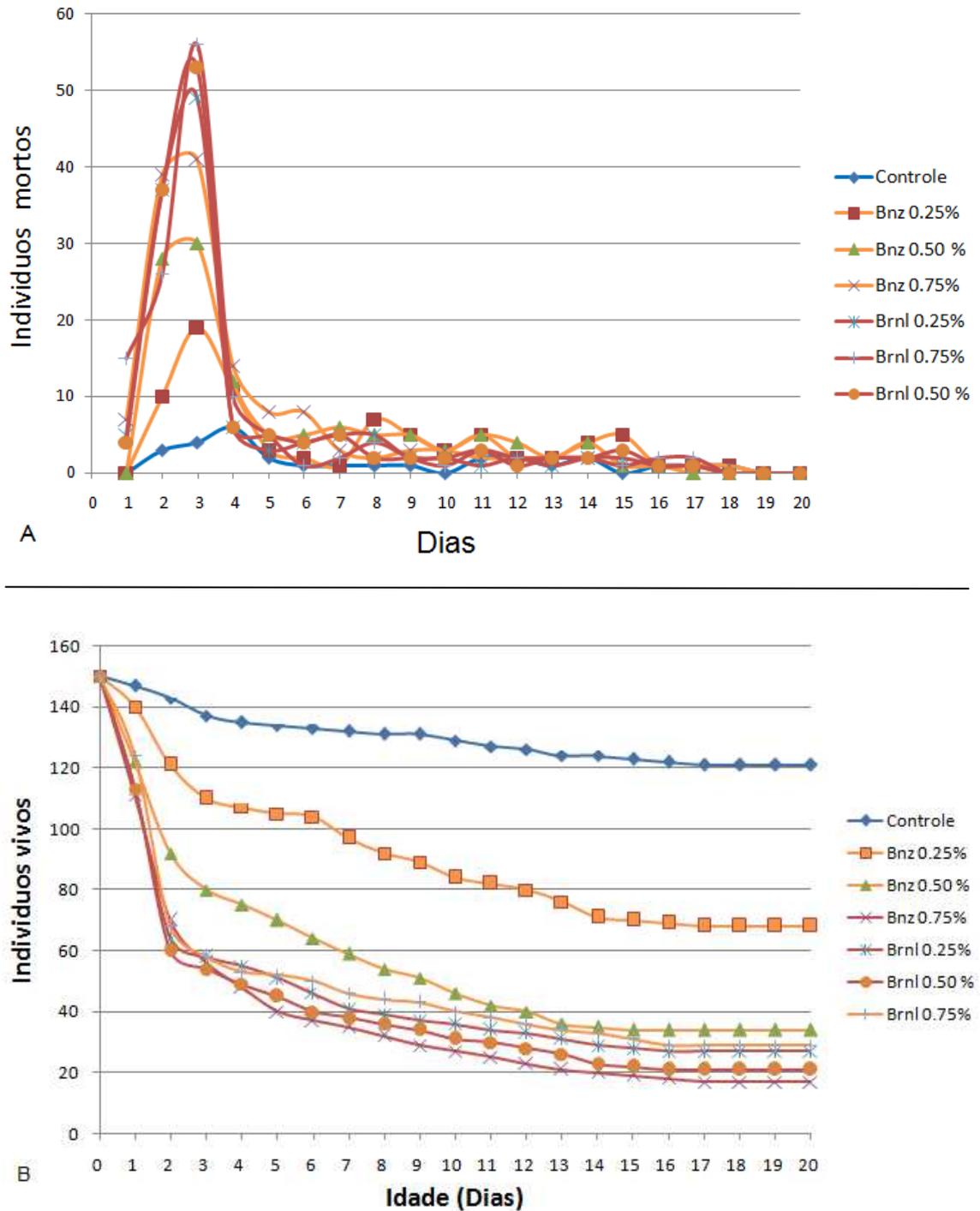
**Figura 16:** Avaliação da mortalidade de *Coccus viridis*, em plantas limpas pulverizadas com diferentes concentrações de benzamidina e berenil sobre a folha de *C. arabica*. A barra de erro representa o desvio padrão das médias. Médias dos tratamentos ( $\pm$  Desvpad; n= 3) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P=planta; FM=; I=inseto; Bnz=Benzamidina; Brnl= Berenil).

Embora não houve diferenças significativas nos tratamentos de benzamidina 0,75% com o berenil ao 0,25%, 0,50% e 0,75%, este último apresentou maior eficiência em relação à concentração usada, pois a concentração mais baixa (0,25%) atingiu a mesma mortalidade que os tratamentos com concentrações maiores (da benzamidina e do berenil). Mas sob o ponto de vista econômico, e pondo em prática com aplicações nas lavouras no campo, a benzamidina (75%) seria a recomendada já que o custo é muito menor em comparação com o berenil.

Analisando as figuras 17 (A e B), a maior mortalidade de *C. viridis* foi alcançada após as 72 horas de ter aplicado os inibidores sintéticos, além disso, neste período foi observado que ocorria uma mortalidade deste inseto, aonde a maior concentração dos IPs havia uma resposta de maior mortalidade.

O efeito da benzamidina se manteve ativo por mais tempo que o berenil, causando morte dos insetos por um período mais longo, chegando o tratamento da benzamidina 0,75% a causar a maior mortalidade dos insetos ( $93,02 \pm 3,05\%$ ). No entanto, nesse mesmo período, as dosagens de berenil apresentaram maior mortalidade, para o mesmo tempo, do que as doses de benzamidina, sendo o berenil mais rápido em causar efeitos negativos na tabela de vida da cochonilha.

Este fato mostra que um inibidor protéico, um peptídeo, ou um peptídeo mimético que ocupe os sub-sítios S1 e S2' do centro ativo de tripsina-*like* pode se tornar eficiente num controle de pragas como via alternativa ao uso de agrotóxico (PAIXÃO, 2010).



**Figura 17:** (A) Curva de mortalidade de *C. viridis* desde o primeiro instar até chegar a adultas, tratamento controle e tratamentos com pulverizações com diferentes concentrações de benzamidina e berenil no primeiro instar sobre as folhas de *Coffea arabica*. (B) Curva de sobrevivência do mesmo inseto desde o dia 0 até o dia 20, tratamento controle e tratamentos acima mencionados.

Outros trabalhos feitos com insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera mostraram que a benzamidina e o berenil fornecidos em dieta artificial aumentaram o período larval e a porcentagem de mortalidade das larvas de *A.*

*gemmatalis* (MOREIRA, 2007; PILON et al., 2006). Ramos et al., (2009) testando o efeito do inibidor PFIT, um inibidor purificado das sementes de *Plathymeria foliolosa* (Mimosoideae), observaram uma redução significativa na sobrevivência de larvas do lepidóptero *A. kuehniella*. Larvas recém eclodidas do coleóptero bicudo-da-banana, *Cosmopolites sordidus*, alimentadas com dietas contendo 0,2% do inibidor de tripsina de soja STI apresentaram menores taxas de sobrevivência e reduções significativas no crescimento larval (MONTESDEOCA et al., 2005).

Telanget et al., (2009) ao testarem os efeitos de um inibidor de serino-proteases em *H. armigera* verificaram uma significativa redução na sobrevivência das larvas após terem sido alimentadas com o inibidor incorporado na dieta artificial. Marinho (2010) observou um efeito significativo de berenil no aumento da mortalidade de larvas de *T. leucoceraea*. Segundo este autor, a dose de 0,09% de berenil pulverizadas nas folhas de eucalipto causou a morte de mais da metade da população das lagartas de *T. arnobia*.

Paixão (2010) testou o efeito do berenil na mortalidade das larvas de *A. gemmatalis*, verificou-se que as lagartas que foram alimentadas com folhas de soja pulverizadas com 0,20, 0,60 e 1,0% (p/v) de berenil sofreram maior mortalidade do que as lagartas alimentadas com folhas não pulverizadas com o inibidor.

Os resultados indicam que os IPs podem ser usados no controle de *C. viridis*, pois tem atingido taxas de mortalidade similares aos alcançadas por fatores naturais quando esta praga mantém baixo o nível de dano econômico. Rosado (2009), analisando os fatores naturais de mortalidade desta praga concluiu que pode alcançar uma taxa de mortalidade 96,08% durante seu ciclo de vida. Segundo este autor os fatores mais responsáveis pela mortalidade desta praga foram, chuva, parasitismo, predação, queda de folha e doença fúngica.

Estes fatores têm que se apresentar normalmente para que esta praga poda-se manter baixo nível de dano econômico, pois ao falhar a presença de um destes pode se apresentar o incremento de esta praga tornando-se de importância econômica para as culturas.

## 6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os inibidores sintéticos benzamidina e berenil prejudicam a atividade proteolítica das cochonilhas-verdes mostrando redução de atividade nas serino-proteases e cisteino-proteases. Sendo *C. viridis* um inseto sugador pertencente a um grupo de insetos (Heteroptera) de muita importância econômica como praga, é recomendável fazer estudos em outras pragas desta ordem usando inibidores sintéticos de proteases.
- As plantas *C. arabica* sob herbivoria por *C. viridis* e ferimentos mecânicos respondem com o aumento dos níveis de inibidores de proteases foliares, mas não foi possível comprovar se as plantas de café ativaram o mecanismo de defesa pela via das lipoxigenases.
- Os resultados sugerem que os inibidores de proteases benzamidina e berenil podem ter um efeito positivo no desempenho da planta, ao induzir a redução da produção de inibidores de proteases pelas plantas, reduzindo assim os custos de defesa. Pelo que se recomenda fazer estudos sobre os efeitos que tem os inibidores sintéticos no desempenho das plantas.
- Benzamidina e berenil prejudicam a atividade biológica da cochonilha (*C. viridis*), apresentando alta mortalidade após a pulverização e provocando redução de ganho peso nas cochonilhas que chegaram à fase adulta.

## BIBLIOGRAFIA

ABIC. O café no Brasil. Disponível em:

<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>.

Acesso em: 28 Nov. 2015.

AGRAWAL, ANURAG A. "Induced responses to herbivory and increased plant performance." **Science**, 279.5354 1201-1202, 1998.

AHN, JI-EUN, & KEYAN ZHU-SALZMAN. "CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin." **Journal of insect physiology**, 55.8 (2009): 678-685.

ALVAREZ-FERNANDEZ, M., BARRETT, A. J., GERHARTZ, B., DANDO, P. M., NI, J., & ABRAHAMSON, M. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. **Journal of Biological Chemistry**, 274(27), 19195-19203, 1999.

ARIMURA, G. I., KOST, C., & BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1734(2), 91-111, 2005.

ASOCIACION NACIONAL DE CAFICULTORES. Manual El manejo de plagas y enfermedades relacionadas al Mal de Viñas. Disponível em: [https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Mal\\_de\\_Vinas\\_Manejo\\_Plagas](https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Mal_de_Vinas_Manejo_Plagas). Acesso em: 20 Maio de 2015.

AXELROD, BERNARD, THOMAS M. CHEESBROUGH, & SIMO LAAKSO. "[53] Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13. 11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase." **Methods in enzymology** 71: 441-451, 1981.

BARI, RAJENDRA, & JONATHAN DG JONES. "Role of plant hormones in plant defence responses." **Plant molecular biology** 69.4: 473-488, 2009.

BELL, H. A., FITCHES, E. C., DOWN, R. E., FORD, L., MARRIS, G. C., EDWARDS, J. P., & GATEHOUSE, A. M. R. Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Pest management science**, 57(1), 57-65, 2001.

BERNARDI, R., TEDESCHI, G., RONCHI, S., & PALMIERI, S. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, 26(8), 883-889, 1996.

BHATTACHARYYA, ARINDAM, SUDESHNA MAZUMDAR LEIGHTON, & C. R. BABU. "Bioinsecticidal activity of Archidendron ellipticum trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145.4 (2007): 669-677.

PRADO, JEANNE SCARDINI MARINHO. "Bioatividade de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, sobre *Thyrinteina arnobia*.", 2010.

BODE, WOLFRAM, AND ROBERT HUBER. "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases." *EJB Reviews. Springer Berlin Heidelberg*, 43-61,1993.

BOYD, DAVID W.; COHEN, ALLEN CARSON; ALVERSON, DAVID R. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 95, n. 3, p. 395-401, 2002.

BRADFORD, MARION M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIDSON, D.; VERDCOURT, BERNARD. Flora of tropical East Africa: Rubiaceae (part 2). *Rotterdam: AA Balkema*, 1988.

BRUCE, TOBY JA; PICKETT, JOHN A. Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Current opinion in plant biology*, v. 10, n. 4, p. 387-392, 2007.

BRUINSMA, M., VAN DAM, N. M., VAN LOON, J. J., & DICKE, M. Jasmonic acid-induced changes in *Brassica oleracea* affect oviposition preference of two specialist herbivores. *Journal of chemical ecology*, 33(4), 655-668, 2007.

CALATAYUD, P. A., DELOBEL, B., GUILLAUD, J., & RAHBE, Y. Rearing the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti*, on a defined diet. *Entomologia experimentalis et applicata*, 86(3), 325-329, 1998.

CALATAYUD, P.-A. Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus manihoti* in artificial diets. *Entomologia experimentalis et applicata*, v. 96, n. 1, p. 81-86, 2000.

CALATAYUD, PAUL-ANDRÉ; LE RÜ, BRUNO P. Cassava-mealybug interactions. *IRD éditions*, 2006.

CALATAYUD, PAUL-ANDRÉ; MÚNERA SÁNCHEZ, DIEGO FERNANDO. Defensas naturales de la yuca a las plagas de artrópodos, 2002.

CAMARGO, R.A.Q.; TELLER, J.R. O café no Brasil: sua aclimação e industrialização: Rio de Janeiro, *Serviço de Informação Agrícola-Série Estudos Sociais*, v.11, n.41, 1953, 1255p.

CARLINI, CÉLIA R.; GROSSI-DE-SÁ, MARIA FÁTIMA. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002. *Cell*, 4: 129-134, 1992.

CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (Mascaracoffea): Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Paris: *Orstom*, 223 p. 1978.

CHOU, KUO-CHEN; CAI, YU-DONG. Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 339, n. 3, p. 1015-1020, 2006.

CHOUGULE, N. P., DOYLE, E., FITCHES, E., & GATEHOUSE, J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*, 54(3), 563-572, 2008.

CHRISTELLER, JOHN T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*, v. 272, n. 22, p. 5710-5722, 2005.

CORTESERO, A. M.; STAPEL, J. O.; LEWIS, W. J. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biological control*, v. 17, n. 1, p. 35-49, 2000.

CORTEZ, JOSÉ GUILHERME. Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café. 2001.

CRAIK, C. S., ROCZNIAK, S., LARGMAN, C., & RUTTER, W. J. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science*, 237(4817), 909-913, 1987.

CRISTOFOLETTI, P. T., RIBEIRO, A. F., DERAISON, C., RAHBÉ, Y., & TERRA, W. R. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 49(1), 11-24, 2003.

DA SILVA FORTUNATO, F., DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G., BRUMANO, M. H. N., SILVA, C. H. O., GUEDES, R. N. C., & MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest Science*, 80(4), 241-247, 2007.

DA SILVA FORTUNATO, F., DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G., BRUMANO, M. H. N., SILVA, C. H. O., GUEDES, R. N. C., & MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest Science*, 80(4), 241-247, 2007.

DA SILVEIRA RAMOS, V., FREIRE, M. G. M., PARRA, J. R. P., & MACEDO, M. L. R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymentia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 152(2), 255-261, 2009.

PAIXÃO G. P., ALMEIDA OLIVEIRA M.G.A., GUEDES R.N.C, OLIVEIRA J.A., Efeito de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis- benzamidina, nas respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de lagarta da soja *anticarsia gemmatalis*. (Doctoral dissertation, universidade federal de viçosa), 2010.

DE LEO, F., BONADÉ-BOTTINO, M., CECI, L. R., GALLERANI, R., & JOUANIN, Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect biochemistry and molecular biology**, 31(6), 593-602, 2001.

DEKLE, G. W. & FASULO, T. R. Green Scale, *Coccus viridis* (Green) (Insecta:Hemiptera:Coccidae): DPI Entomology Circular 165, Department of Entomology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. **Edis** Website: <http://edis.ifas.ufl.edu/>.

DELLEDONNE, M., ALLEGRO, G., BELENGHI, B., BALESTRAZZI, A., PICCO, F., LEVINE, A., & CONFALONIERI, M. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. **Molecular Breeding**, 7(1), 35-42, 2001.

DICKE, MARCEL; HILKER, MONIKA. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. **Basic and Applied Ecology**, v. 4, n. 1, p. 3-14, 2003.

DUSSERT, S., CHABRILLANGE, N., MONTILLET, J. L., AGNEL, J. P., ENGELMANN, F., & NOIROT, M. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage?. **Physiologia plantarum**, 119(4), 534-543. 2003.

EMBRAPA-CAFÉ. Notícias café. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8515958/brasil-produz-4324-milhoes-de-sacas-de-60-kg-de-cafe-em-2015>.

Acesso em: 28 Dez. 2015.

ERLANGER, BERNARD F.; KOKOWSKY, NICHOLAS & COHEN, WILLIAM. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

FAN, S.G., WU, G.J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. 46:273-292, 2005.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, 4: 129-134, 1992.

FASTREZ J. & FERSHT A. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. **Biochemistry**, 12: 2025–2034. 1973.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M. IAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro** (fatores que afetam a produtividade). Piracicaba: POTAFOS, p. 88-113, 1986.

FERNANDES, F. L. Efeito de nitrogênio e de potássio na interação entre *Coccus viridis* e *Coffea arabica*. . Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FREDRICK, JOHN M. Some preliminary investigations of the green scale, *Coccus viridis* (Green), in south Florida. **The Florida Entomologist**, v. 26, n. 1, p. 12-15, 1943.

FRITZ, R. S., & SIMMS, E. L. (EDS.). Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics. University of Chicago Press, 1992.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C., BERT FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**, Piracicaba, FEALQ, , 920p, 2002.

GILL I, LOPEZ-FANDIÑO R, JORBA X, VULFSON E. Biologically active peptides 20 and enzymatic to their production. **Enzyme and Microbial Technology**, 18: 162–183, 1996.

GOODMAN, Robert N. et al. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. **American Phytopathological Society (APS)**, 1994.

GORMAN M, ANDREEVA O, PASKEWITZ M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene**, 251: 9-17, 2000.

GOTHILF, SHMUEL; BECK, STANLEY D. Rearing the citrus mealy bug, *Planococcus citri* (Risso), on a defined diet. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 2, p. 489-490, 1966.

GOULD, FRED. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 701-726, 1998.

GRASSÉ, PIERRE-P. Ed. Traite de zoologie. **Anatomie, systématique, biologie. Tome VI. Onychophores, Tardigrados, Arthropodes, Trilobtomorphes, Gbélécérates.**" Ed. Traite de zoologie. **Anatomie,**

**systematique, biologie. Tome VI. Onychophores, Tardigrados, Arthropodes, Trilobtomorphes, Gbélécérates.** (1949).

GUIMARÃES, L. M., PEDROSA, E. M., COELHO, R. S., CHAVES, A., MARANHÃO, S. R. V. L., & MIRANDA, T. L. Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zeae* em cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, 32(1), 50-55, 2008.

HAQ, SOGHRA KHATUN, SHAIKH MUHAMMAD ATIF, AND RIZWAN HASAN KHAN. "Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection." **Archives of Biochemistry and Biophysics** 431.1: 145-159, 2004.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**. 102(12):4501-4523, 2002.

HILDEBRAND, D. F., HAMILTON-KEMP, T. R., LEGG, C. S., & BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. In Current topics in plant biochemistry and physiology: **Proceedings of the Plant Biochemistry and Physiology Symposium** held at the University of Missouri, Columbia (USA), 1988.

HILDEBRAND, DAVID F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v. 76, n. 2, p. 249-253, 1989.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**. 330:160-163, 1987.

HILDER, VAUGHAN A.; BOULTER, DONALD. Genetic engineering of crop plants for insect resistance—a critical review. **Crop protection**, v. 18, n. 3, p. 177-191, 1999.

HOFFMANN, M. P., ZALOM, F. G., WILSON, L. T., SMILANICK, J. M., MALYJ, L. D., KISER, J., & BARNES, W. M.. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, 85(6), 2516-2522, 1992.

HOLLINGSWORTH, R.G. Green scale as a quarantine pest in Hawaii. *Chronica Horticulturae*. **Magazine of the International Society for Horticultural Science**, v.10, n.4, p-15-17, 2000.

HOUSEMAN, JON G.; PHILOGENE, B. J. R.; DOWNE, A. E. R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 4, p. 864-868, 1989.

INFORME AGROPECUÁRIO. **Pragas do cafeeiro: bioecologia e manejo integrado**, Belo Horizonte, v. 35, n 280, p.55-66, maio/jun. 2014

JOANITTI, G.A., FREITAS, S.M., SILVA, L.P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**. 2(3):199-217, 2006.

JONGSMA, M. A., & BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, 43(10), 885-895, 1997.

KAKADE, M. L., RACKIS, J. J., MCGHEE, J. E., & PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, 1974.

KANOST, M.R., CLARKE, T.E. Proteases. In: GILBERT, L.I., IATROU, K., GILL, S.S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, vol. 4. Pergamon, New York, 247–265, 2005.

KANT, MERIJN R.; BALDWIN, IAN T. The ecogenetics and ecogenomics of plant–herbivore interactions: rapid progress on a slippery road. **Current opinion in genetics & development**, v. 17, n. 6, p. 519-524, 2007.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. Induced responses to herbivory. Chicago: Univ. 317p. 1997.

KESSLER, ANDRE; HALITSCHKE, RAYKO. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 4, p. 409-414, 2007.

KÖHLER, GÜNTER. Zur Morphologie, biologie und Oekologie der Gruenen Kaffeeshildlaus, *Coccus viridis* (GREEN) in Kaffeeanlagen der Republik Kuba, **Einschliesslich einiger Bemerkungen zu ihrer Bekämpfung**. Koehler, 1978.

KOIWA, H., SHADE, R. E., ZHU-SALZMAN, K., SUBRAMANIAN, L., MURDOCK, L. L., NIELSEN, S. S., & HASEGAWA, P. M. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **The Plant Journal**, 14(3), 371-379, 1998.

KONO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal** 37, 370–378, 2004.

KUNAKBAEVA Z, CARRASCO R, ROZAS I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure**, 626: 209–216, 2003.

KURODA, M., ISHIMOTO, M., SUZUKI, K., KONDO, H., ABE, K., KITAMURA, K., & ARAI, S. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on

different species of bean insect pests, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 60(2), 209-212, 1996.

LAM, WINNIE; COAST, GEOFFREY M.; RAYNE, RICHARD C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 1, p. 85-94, 2000.

LASKOWSKI, M.J.R., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v.49: p. 685-693,1980.

LAWRENCE, P.K., KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**. 5: 93-109, 2002.

LEUNG-TOUNG; LI, W., TAM, T. F., KARIMIAN, K. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. **Current Medicinal Chemistry**. 9(9):979-1002, 2002.

LEPELLEY, R. H. *Coccus viridis* (Green)-The green scale. **Pests of coffee. London: Longmans, Green**, 590p, p. 353-355, 1968.

MACEDO, LUCIANO PACELLI MEDEIROS & JOSÉ DJAIR VENDRAMIM. "Gossipol: Fator de resistência a insetos-Praga." **Campo Digital 2.1** (2007).

MAFFEI, MASSIMO E.; MITHÖFER, AXEL; BOLAND, WILHELM. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2946-2959, 2007.

MAHESWARAN, G., PRIDMORE, L., FRANZ, P., & ANDERSON, M. A. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. **Plant cell reports**, 26(6), 773-782, 2007.

MALAVOLTA, Eurípedes. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MALONE, L. A., BURGESS, E. P., CHRISTELLER, J. T., & GATEHOUSE, H. S. In vivo responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. **Journal of insect physiology**, 44(2), 141-147, 1998.

MARES-GUIA, M., ROGANA, E., AMORIM, A. F., & MAGALHAES-ROCHA, N. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. **Journal of Biological Chemistry**, 256(4), 1661-1668, 1981.

MARICONI, F.A.M. A cochonilha verde do cafeeiro. *Born. Suphia. Sem. Café*. São Paulo, v.30, p.36-37, 1955.

MARINHO J.S.; OLIVEIRA M.G.A.; GUEDES R.N.C.; PALLINI A.; DE OLIVEIRA J.A., Resposta bioquímica de lagartas de *thyrinteina leucoceraea*

(Lepidoptera: Geometridae), submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

MARINHO, J. S., OLIVEIRA, M. D. A., GUEDES, R. D. C., PALLINI, A., & DE OLIVEIRA, J. A. Biochemical response of *Thyrinteina leucoceraea* to proteases inhibitor in guava plants. *Idesia*, 28(3), 101-109, 2010.

MARINHO, J. S. Resposta bioquímica de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina, 2006.

MATIELLO, J. B. Café conilon (como plantar, tratar, colher, preparar e vender). Rio de Janeiro: MAA/SDR/PROCAFÉ, 162 p, 1998.

MATSUBAYASHI, YOSHIKATSU; SAKAGAMI, YOUJI. Peptide hormones in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 57, p. 649-674, 2006.

MAU, R.F.L.; KESSING, J.L.M. *Coccus viridis* (Green). CTAHR; University of Hawaii at Hilo; Beaumont Research Center. 1992. Disponível em: [http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/c\\_viridi.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/c_viridi.htm). Acesso em 15 Maio 2015.

MCKERROW, JAMES H.; ENGEL, JUAN C.; CAFFREY, CONOR R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 7, n. 4, p. 639-644, 1999.

MCKEY, DOYLE. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*, p. 305-320, 1974.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. Cafeicultura empresarial (produtividade e qualidade-genética e melhoramento do cafeeiro). Lavras: UFLA/FAEPE, 99 p, 1996.

MENDONÇA, E.G.; GUEDES R.N.C.; OLIVEIRA M.G.A. Universidade Federal de Viçosa. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja, p.68, 2008.

MENDONÇA, E. G. D. (2008). Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja.

MERIÑO CABRERA, YAREMIS BEATRIZ. "Resposta de plantas de *Coffea arabica* (Rubiaceae) às injúrias de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) através das vias das lipoxigenases e atividade de polifenoloxidasas." 2015.

MERRIL, G. B. Scale insects of Florida. *State Plant Board of Florida Bulletin*, v.1, p.93-94. 1953.

MONTESDEOCA, M., LOBO, M. G., CASAÑAS, N., CARNERO, A., CASTAÑERA, P., & ORTEGO, F. Partial characterization of the proteolytic enzymes in the gut of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on larval performance. **Entomologia experimentalis et applicata**, 116(3), 227-236, 2005.

MOREIRA, LÍLIAN FERNANDES. "Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)." 2007.

MOREIRA, M. D.; FERNANDES, F. L.; PIKANÇO, M. C.; FERNANDES, M. E. S.; BACCI, L.; MARTINS, J. C.; COUTINHO, D. C. Características rastreáveis do manejo integrado das pragas do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV-DFT, p.450, 2007.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 227-246, 2005.

NANDEESHA, P.; PRASAD, D. Theertha. Characterization of serine proteinase inhibitor from subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) seeds. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 75-78, 2001.

NOVILLO, CONCEPCIÓN; CASTAÑERA, PEDRO; ORTEGO, FÉLIX. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 2, p. 177-184, 1999.

OLIVEIRA, A. S., MIGLIOLO, L., AQUINO, R. O., RIBEIRO, J. K., MACEDO, L. L., ANDRADE, L. B., & MAURÍCIO, P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45(10), 858-865, 2007.

OLIVEIRA, M. G. A., DE SIMONE, S. G., XAVIER, L. P., & GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 140(3), 369-380, 2005.

OLIVEIRA, M. G., ROGANA, E., ROSA, J. C., REINHOLD, B. B., ANDRADE, M. H., GREENE, L. J., & MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidino and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, 268(36), 26893-26903, 1993.

PAGE, M.J., & DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65:1220-1236, 2008.

PAIXÃO, G. P., LOURENÇÃO, A. L., SILVA, C. R., MENDONÇA, E. G., SILVA, P. L., OLIVEIRA, J. A. & OLIVEIRA, M. G. A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61(34), 8034-8038, 2013.

PATUI, S., PERESSON, C., BRAIDOT, E., TUBARO, F., COLUSSI, A., BONNLÄNDER, B., & VIANELLO, A. Lipoxygenase distribution in coffee (*Coffea arabica* L.) berries. **Journal of agricultural and food chemistry**, 55(20), 8223-8230, 2007.

PEDIGO, L.P. & M.E. RICE, **Entomology and Pest Management**, 5th Ed. New Jersey, Prentice Hall, 784 p, 2005.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta tropica**, v. 54, n. 3, p. 185-203, 1993.

PEREIRA, R. B., ALVES, E., JÚNIOR, P. M. R., DE RESENDE, M. L. V., LUCAS, G. C., & FERREIRA, J. B.. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(10), 1287-1296, 2008.

PERONA J. & CRAIK C. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, 4: 337–360. 1995.

PESSON, PAUL. Contribution à l'étude morphologique et fonctionnelle de la tête, de l'appareil buccal et du tube digestif des femelles de coccides. 1944.

PICCHI, D. G., ALTEI, W. F., SAITO, M. S., BOLZANI, V. D. S., & CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, 1262-1277, 2009.

PILON, A.M., OLIVEIRA, M.G.A., PILON, F.M., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, J.A., Fazollo, A. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidóptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**. 56(6):744-748. 2009.

PILON, ANDERSON M.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A.; GUEDES, RAUL NARCISO C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 1, p. 23-29, 2006.

PILON, A. M., OLIVEIRA, M. G. A., PILON, F. M., GUEDES, R. N. C., OLIVEIRA, J. A., & FAZOLLO, A. Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Ceres**, 56(6), 2015.

PILON, ANDERSON MARTINS. Resposta bioquímica da lagarta da soja ao inibidor de protease benzamidina e seus efeitos no desenvolvimento pós-embrionário. 2004. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

PILON, ANDERSON MARTINS. Respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja) ao inibidor de serino proteases benzamidina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

PIUBELLI, Giorla Carla et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.

POMPE-NOVAK, M.; POLSAK-PRIJATELJ, M.; POPOVIC, T.; STRUKELJ, B.; RAVNIKAR, M. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.60. p.71-78, 2002.

POMPERMAYER, P. Estudo in vivo e in vitro da ação de inibidores de proteinase de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (Fabr., 1794). 2000.

POMPERMAYER, P., LOPES, A. R., TERRA, W. R., PARRA, J. R. P., FALCO, M. C., & SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, 99(1), 79-85, 2001.

POMPERMAYER, P., FALCO, M. C., PARRA, J. R. P., & SILVA-FILHO, M. C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia experimentalis et applicata**, 109(3), 217-224, 2003.

RAETHER, W.; LOEWE, H.; SEIDENATH, H. Trypanozider Effekt der in saurer Lösung entstehenden Spaltprodukte von Berenil und ihre mögliche in vivo-Rückkupplung in NMRI-Mäusen. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 25, p. 273-282, 1974.

RAHBÉ, Y., DELOBEL, B., CALATAYUD, P. A., & FEBVAY, G. Phloem sap composition of lupine analyzed by aphid stylectomy: methodology, variations in major constituents and detection of minor solutes. **Miscellaneous publication-Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University (USA)**, 1991.

RAHBÉ, Y., SAUVION, N., FEBVAY, G., PEUMANS, W. J., & GATEHOUSE, A. M. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 76(2), 143-155, 1995.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S., & DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. ***Microbiology and molecular biology reviews***, 62(3), 597-635,1998.

Richardson, M. "Seed storage proteins: the enzyme inhibitors." ***Methods in plant biochemistry*** 5 (1991): 259-305.

ROBINSON, RAOUL A.; COWLING, WALLACE. Return to resistance: breeding crops to reduce pesticide dependence. ***Australasian Plant Pathology***, v. 25, n. 3, p. 216-217, 1996.

ROJAS, M. L.; DE GÓMEZ, V. MONTES; OCAMPO, C. A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. ***Physiological and molecular plant pathology***, v. 43, n. 3, p. 209-219, 1993.

ROMERO F, GARCIA L, SALAS J, DIAZ M, QUIROS L. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. ***Process of Biochemistry***, 36: 507–515. 2001.

ROSADO, J. F., PIKANÇO, M. C., COUTINHO, D. C., TOMÉ, H. V., MARTINS, J. C., & FREIRE, M. Fatores de controle natural da cochonilha verde do café no ano de 2006, (2007).

RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. ***Annu. Rev. Phytopathol.*** 28:245-449, 1990.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoramento de café arábica. In: BORÉM, A. (Ed.). ***Melhoramento de espécies cultivadas***. Viçosa: UFV, p. 189-204, 1999.

SCOTT I, THALER J, SCOTT J. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to 3 jasmonate-mediated induced defense in tomato. ***Journal of chemical ecology***, 36: 490–499, 2010.

SHIVAJI, Renuka et al. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. ***Journal of chemical ecology***, v. 36, n. 2, p. 179-191, 2010.

SHUKLE, R. H.; MURDOCK, L. L. Lipoxygenase trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). ***Environmental Entomology***, v. 12, n. 3, p. 787-791, 1983.

SIEDOW, JAMES N. Plant lipoxygenase: structure and function. ***Annual review of plant biology***, v. 42, n. 1, p. 145-188, 1991.

SILVA, C. G. Biologia e danos de *Coccus viridis* (Green, 1889) (Homoptera-Coccidae) em mudas de café (*Coffea arabica*). Mestrado em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1977. 58 p.

SILVA, F. B., OLIVEIRA, M. D. A., BATISTA, R. B., PIRES, C. V., XAVIER, L. P., PIOVESAN, N. D., & MOREIRA, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Arquivo do Instituto Biológico**, 69(1), 67-74, 2002.

SILVA, R. S., RIBEIRO, F. R., QUEIROZ, O. S., SANTOS, I. B., OLIVEIRA, M. G., PEREIRA, R. R., & PIKANÇO, M. C. Trypsin protease inhibitor activity is not a good proxy for defence against *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae) in *Coffea canephora* (Gentianales: Rubiaceae). **International Journal of Acarology**, 41(3), 189-194, 2015.

SILVA-FILHO, MARCIO CASTRO; FALCO, MARIA CRISTINA. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-42, 2000.

SRINIVASAN, A., GIRI, A. P., HARSULKAR, A. M., GATEHOUSE, J. A., & GUPTA, V. S. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **Plant molecular biology**, 57(3), 359-374, 2005.

SRIVASTAVA P. N., 1987 – Nutritional physiology. In: Aphids: Their biology, natural enemies and control, vol. 2A, Minks A. K. & P. Harrewijn (eds) **Elsevier, Amsterdam**, The Netherlands, p. 99-121.

STEIMAN S. 2008. Coffee as a crop with emphasis on Hawaii. Disponível em: <http://www.grayskies.net/honeybear/crop.html> p. 2000. Acesso em: 28 de Maio de 2015.

STEIMAN, S. Coffee as a crop with emphasis on Hawaii. 2008: Disponível em: <http://www.grayskies.net/honeybear/crop.html>. Acesso: Novembro 2015.

STEPPUHN, ANKE; BALDWIN, IAN T. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. **Ecology Letters**, v. 10, n. 6, p. 499-511, 2007.

TAMHANE, V. A., CHOUGULE, N. P., GIRI, A. P., DIXIT, A. R., SAINANI, M. N., & GUPTA, V. S. In vivo and in vitro effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1722(2), 156-167, 2005.

TELANG, M. A., GIRI, A. P., PYATI, P. S., GUPTA, V. S., TEGEDER, M., & FRANCESCHI, V. R. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. **Gene**, 431(1), 80-85, 2009.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. As pragas também morrem pela boca. **Pesquisa Fapesp**. 54:20-27, 2000.

TSCHARNTKE, T., THIESSEN, S., DOLCH, R., & BOLAND, W. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. ***Biochemical Systematics and Ecology***, 29(10), 1025-1047, 2001.

VALUEVA T.A., MOSOLOV V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. ***Biochemistry***. 69(11): 1305-1309, 2004.

VAN LENTEREN, J. C., BALE, J., BIGLER, F., HOKKANEN, H. M. T., & LOOMANS, A. J. M. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. ***Annu. Rev. Entomol.***, 51, 609-634, 2006.

VILA, L., QUILIS, J., MEYNARD, D., BREITLER, J. C., MARFÀ, V., MURILLO, I., & SAN SEGUNDO, B. Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. ***Plant Biotechnology Journal***, 3(2), 187-202, 2005.

WALLER, J. M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R. J. Coffee pests, diseases and their management. Reading: Columns Design Ltd. 2007.

WANG, C., ZIEN, C.A., AFITLHILE, M., WELTI, R., HILDEBRAND, D.F. WANG, X. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. ***The Plant Cell***. 12: 2237-2246, 2000.

WOLFSON, JANE L.; MURDOCK, LARRY L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 16, n. 4, p. 1089-1102, 1990.

XAVIER FILHO, J., Biológicos, p., dos inibidores, d. p., cisteínicas, s. e., & plantas, e. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants, 1992.

XAVIER, L. P., OLIVEIRA, M. G. A., GUEDES, R. N. C., SANTOS, A. V., & DE SIMONE, S. G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). ***European Journal of Entomology***, 102(2), 147, 2005.

YAVADA R. L. & B. S. CHANDEL, The filter chamber of the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (Homoptera: Pseudococcidae). ***Zoologischer Anzeiger***. 182: 361-369. 1969.

ZHU, YU-CHENG; BAKER, JAMES E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). ***Insect biochemistry and molecular biology***, v. 29, n. 12, p. 1053-1063, 1999

ZHU-SALZMAN, K., ZENG, R.S. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: ***Lessons learned from a Bruchid beetle Keyan Insect Science***. 15 (6): 477- 481, 2008.

ZIEGLER, H. Nature of transported substances. In: Transport in Plants I. **Springer Berlin Heidelberg**, 1975. p. 59-100.