

## COMUNICAÇÃO

### ENZIMAS DIGESTIVAS DO BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

Coffee leaf miner's digestive enzymes *Leucoptera coffeella*  
(Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)

Guilherme Duarte Rossi<sup>1</sup>, Custódio Donizete dos Santos<sup>2</sup>, Gislaïne Aparecida Carvalho<sup>3</sup>,  
Angelita Duarte Corrêa<sup>2</sup>, Celeste Maria Patto de Abreu<sup>2</sup>, Geraldo Andrade Carvalho<sup>4</sup>

#### RESUMO

Os insetos possuem diferentes enzimas digestivas que catalisam as reações de hidrólise do alimento consumido e essas se diferenciam entre os insetos de acordo com suas dietas e estado fisiológico. Foram avaliadas as atividades de algumas enzimas digestivas da praga do café - *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) – popularmente conhecida como bicho-mineiro do café, para o entendimento de seu processo digestivo. Lagartas do bicho-mineiro do café foram coletadas em campo e em casa-de-vegetação. O extrato enzimático utilizado foi obtido pela maceração das lagartas em água (4°C). Determinaram-se os pH's ótimos e as atividades das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidases,  $\alpha$ -amilase, aminopeptidase, fosfatase alcalina, sacarase, trealase e tripsina, incubando o extrato enzimático do bicho-mineiro do café com substratos específicos. A análise dos resultados sugere que o processo digestivo e o ambiente intestinal do bicho-mineiro do café sejam similares com o dos demais lepidópteros encontrados na literatura.

**Termos para indexação:** Bicho-mineiro do café; enzimas digestivas.

#### ABSTRACT

Insects are fitted with different digestive enzymes that catalyses the food hydrolysis. Those enzymes differ from one insect to another according to their diets and physiological status. In this work, one intended to verify the activities of some digestive enzymes of the coffee leaf miner - *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) - as a pre-requisite to understand its digest process, since this insect is a major plague in coffee production systems. Coffee leaf miner caterpillars were collected in fields and in greenhouse. The enzyme extract utilized in determining the enzyme activities was obtained through grinding the caterpillars in cold water. The optimum pH and the activities of the enzymes  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidases,  $\alpha$ -amylase, aminopeptidase, alkaline phosphatase, saccharase, trehalase and trypsin were measured by incubating the enzyme extract with specific substrates. The analysis of the optimum pH's indicated that the digestive process and intestinal environment of this insect are similar to another lepidopterans consulted in the literature.

**Index terms:** Coffee leaf miner; digestive enzymes.

(Recebido em 29 de maio de 2007 e aprovado em 23 de setembro de 2008)

O processo digestivo dos insetos, bem como dos demais seres vivos heterotróficos, tem a função de hidrolisar o alimento consumido na forma de macromoléculas complexas e transformá-lo em moléculas mais simples, capazes de serem absorvidas pelo organismo (Lehane e Billingsley, 1996; Nation, 2002). Nos insetos, esse processo de hidrólise ocorre principalmente no intestino médio, local onde as enzimas digestivas são secretadas (Acevedo Jaramillo, 1997) e é

dividido em três etapas: primária, intermediária e final. Na digestão primária, o alimento sofre a ação de despolimerases que reduzem o tamanho do alimento ingerido até tamanhos menores capazes de atravessar os poros da membrana peritrófica. A partir desse momento, os fragmentos reduzidos de alimento são digeridos no espaço ectoperitrófico pela ação das enzimas responsáveis pela digestão intermediária e final (Santos, 1985).

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, Mestre em Agroquímica – Universidade Federal de Lavras/UFLA - Caixa postal 3037 - 37.200-000 Lavras, MG. gdrossi2@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Professores do Departamento de Química /DQI Universidade Federal de Lavras/UFLA - Caixa postal 3037 - 37.200-000 Lavras, MG.

<sup>3</sup>Bióloga, Mestranda em Agroquímica e Agrobioquímica - Universidade Federal de Lavras/UFLA - Caixa postal 3037 - 37.200-000 Lavras, MG. gislaineufla@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Professor do Departamento de Entomologia/DEN Universidade Federal de Lavras/UFLA – Caixa postal 3037 – 37.200-000

Na maior parte dos lepidópteros, o conteúdo do lúmen intestinal (espaço endoperitrófico) apresenta pH alcalino, ao passo que o espaço ectoperitrófico apresenta pH mais próximo da neutralidade (Nation, 2002; Santos, 1985).

Trabalhos como os de Santos, Ferreira e Terra (1983) e Santos et al. (1984), mostram que há uma recuperação das despolimerases  $\alpha$ -amilase e tripsina do lúmen e propõem um fluxo de fluído que carrega essas despolimerases da região posterior para a anterior, local em que entram novamente no lúmen na parte anterior do intestino médio, elucidando a circulação endo/ectoperitrófica dessas enzimas. Uma das funções da circulação em contracorrente no espaço ectoperitrófico é recuperar as enzimas do espaço endoperitrófico que seriam excretadas juntamente com as fezes.

Como o bicho-mineiro do cafeeiro - *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) - é uma praga de grande importância na cafeicultura, objetivou-se realizar um estudo comparativo da sua digestão com a digestão de outros lepidópteros descritos mais detalhadamente na literatura, analisando o pH ótimo, as atividades das enzimas digestivas  $\alpha$ -glicosidase,  $\alpha$ -amilase, aminopeptidase,  $\beta$ -glicosidase, fosfatase, sacarase, trealase e tripsina e a atividade de  $\alpha$ -amilase e tripsina nas metades anterior e posterior do inseto. Informações a respeito do processo digestivo do bicho-mineiro do cafeeiro podem servir como subsídios para exploração de seu processo digestivo como alvo de táticas de controle da praga.

As lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro foram coletadas a partir de folhas infestadas de um cafezal e de uma casa-de-vegetação no *Campus* da Universidade Federal de Lavras-MG. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e transportadas até o laboratório, onde foram retiradas das minas com o auxílio de um estilete e uma pinça. Depois de retiradas das minas, 12 lagartas foram colocadas em Eppendorfs, pesadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até sua utilização nos ensaios enzimáticos de determinação de pH ótimo e atividade enzimática.

Em razão do tamanho diminuto das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro, a retirada do intestino médio não foi realizada, homogeneizando a lagarta inteira. Cada conjunto de 12 lagartas (ou 24 metades) foi pesado e previamente macerado em um Eppendorf com o auxílio de um bastão de vidro, devidamente torneado para esmagar eficientemente as lagartas, juntamente com 0,1 mL de água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$  para facilitar a maceração. Após essa pré-maceração, transferiu-se a solução para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, onde se realizou a

homogeneização em um volume igual a 1 mL de água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após a homogeneização final, filtrou-se a solução obtida em uma tela de nylon com poros de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e completou-se o volume final para 1 mL de água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esse homogeneizado foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas. Cada conjunto de 12 lagartas (ou 24 metades) constituiu uma repetição.

Para a análise da atividade da  $\alpha$ -amilase e tripsina nas metades anteriores e posteriores dos insetos, lagartas de bicho-mineiro do cafeeiro foram coletadas da mesma maneira mencionada acima e cortadas ao meio com o auxílio de uma lupa e um estilete separando as metades anterior e posterior de cada inseto. Cada conjunto de 24 metades (anteriores e posteriores) foi pesado e homogeneizado da mesma forma acima mencionada.

Os ensaios enzimáticos foram realizados a  $30^{\circ}\text{C}$  e a determinação dos pH's ótimos das enzimas foi realizada de acordo com o monitoramento da hidrólise de substratos específicos incubados com o extrato enzimático em diferentes pH's, conforme Tabela 1. Ensaios-controle sem enzima e sem substrato foram realizados, a fim de se evitar a quantificação de atividade por hidrólise do substrato na presença do tampão e por formação de cor a partir do extrato enzimático.

Os tampões utilizados (0,1 M) foram: citrato-fosfato (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 6,5; 7,0), citrato (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), fosfato (7,0; 7,5; 8,3), TRIS-HCl (7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0), TRIS-maleato (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,3) e glicina-NaOH (8,3; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0).<sup>1</sup> – Segundo Noelting e Bernfeld (1948)<sup>2</sup> – Segundo Santos (1985)<sup>3</sup> – Segundo Erlanger, Cohen e Kokowsky (1961).

As atividades das enzimas digestivas foram quantificadas da mesma forma que a Tabela 1, porém, em seus respectivos pH's ótimos. Incubou-se o extrato enzimático obtido a partir de conjuntos de 12 lagartas inteiras ou 24 metades (anteriores e posteriores) por mL de água juntamente com o substrato específico de cada enzima durante pelo menos 4 diferentes períodos de tempo com 3 repetições para cada enzima analisada. Branco de substrato (sem enzima) e branco de enzima (sem substrato) foram determinados da mesma maneira que os tubos experimentados. As atividades foram expressas em unidades por grama de inseto (U/g). Uma unidade de atividade corresponde a 1 micromol de produto formado ou substrato hidrolisado por minuto de reação nas condições do ensaio.

A análise dos pH's ótimos das enzimas avaliadas demonstrou que as despolimerases  $\alpha$ -amilase e tripsina

apresentaram pH's ótimos alcalinos (Tabela 2) e, esperando-se que o pH ótimo de uma enzima combine com o pH de seu local de ação, sugere-se que estas enzimas atuem no lúmen do intestino médio do bicho-mineiro do cafeeiro e que esse seja alcalino. Esta sugestão pode ser feita a partir de comparações com os estudos do lepidóptero *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) realizados por Santos, Ferreira e Terra (1983) que mostraram através de medições de pH que o conteúdo do intestino médio desse lepidóptero é alcalino, da mesma forma que os pH's ótimos das despolimerases  $\alpha$ -amilase e tripsina, majoritariamente localizadas nesse local.

Os valores de pH's ótimos, levemente ácidos, das enzimas responsáveis pelo processo de digestão intermediária e final de carboidratos analisadas no bicho-mineiro do cafeeiro ( $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidases, sacarase e trealase, conforme Tabela 2) sugerem que essas enzimas não devam estar presentes no espaço endoperitrófico. Santos (1985) afirma em seu estudo baseado no lepidóptero *E. ello* que o pH da região mais próxima ao tecido epitelial (espaço ectoperitrófico) é menos alcalino que o pH do conteúdo endoperitrófico e que enzimas como ( $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidases, sacarase e trealase estão presas ao glicocálice ou ligadas às membranas das microvilosidades.

Tabela 1 – Condições padrões e métodos de determinação de atividade das enzimas avaliadas.

Enzima	EC	Substrato	Concentração	pH	Determinação
$\alpha$ -glicosidase	3.2.1.20	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo	10 mM	3,0-7,0	p-nitrofenol <sup>2</sup>
$\alpha$ -amilase	3.2.1.1	Amido	0,5%	7,0-11,0	Açúcares redutores <sup>1</sup>
Aminopectidase	3.4.11.1	LpNA	1 mM	7,0-10,5	p-nitroanilina <sup>3</sup>
$\beta$ -glicosidase	3.2.1.21	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	10 mM	3,0-7,0	p-nitrofenol <sup>2</sup>
Fosfatase	3.1.3.2	p-nitrofenilfosfato	10 mM	3,0-11,0	p-nitrofenol <sup>2</sup>
Sacarase	3.2.1.48	Sacarose	10 mM	5,0-7,5	Açúcares redutores <sup>1</sup>
Trealase	3.2.1.28	Trealose	10 mM	4,0-7,5	Açúcares redutores <sup>1</sup>
Tripsina	3.4.21.4	BapNA	0,87 mM	7,0-10,5	p-nitroanilina <sup>3</sup>

Tabela 2 – pH's ótimos das enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro analisadas e de outros lepidópteros encontrados na literatura.

Enzima	pH ótimo Bicho-mineiro	Lepidóptero	pH ótimo Lepidóptero	Autor
$\alpha$ -glicosidase	6,0	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	6,0	Pratviel-Sosa et al. (1986)*
$\alpha$ -amilase	10,5	<i>Antheraea mylitta</i>	9,5	Nagaraju e Abraham (1995)
Aminopectidase	8,3	<i>Spodoptera littoralis</i>	7,5 a 8,5	Lee e Anstee (1995)
$\beta$ -glicosidase	6,0	<i>Erinnyis ello</i>	6,0	Santos e Terra (1986)
Fosfatases	5,5 e 9,5	<i>Helicoverpa armigera</i>	10,5	Srinivas et al. (2006)
Sacarase	6,5	<i>Sesamia inferens</i>	6,2	Agarwal (1987)
Trealase	6,0	<i>Bombix mori</i>	6,0	Sumida (1977)
Tripsina	9,7	<i>Choristoneura fumiferana</i>	9,5	Milne e Kaplan (1993)*

\* citados por Terra et al., 1996

Outro estudo que reforça as conclusões tomadas para o bicho-mineiro do cafeeiro é o de Nakonieczny, Michalczyk e Kedziorski (2006), que relatam valores superiores das atividades das enzimas envolvidas na digestão intermediária e final (maltase, celobiase, trealase, sacarase e  $\alpha$ -glicosidase) no tecido epitelial do intestino médio (local com pH levemente ácido) de *Parnassius apollo* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Papilionidae) em relação à atividade dessas enzimas no conteúdo do intestino médio (local mais alcalino). Já no conteúdo do intestino médio, esses autores encontraram maior atividade de  $\alpha$ -amilase (envolvida na digestão primária) em relação à atividade dessa enzima determinada no tecido epitelial do intestino médio.

As atividades das enzimas  $\alpha$ -amilase e tripsina atuantes na metade anterior do bicho-mineiro do cafeeiro foi maior que na metade posterior para as duas despolimerases e correspondem respectivamente a  $58\% \pm 3$  e  $65\% \pm 2$  da atividade total (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividades da  $\alpha$ -amilase e tripsina em lagartas de *Leucoptera coffeella*.

Enzimas	Região anterior	Região posterior	Lagarta inteira
$\alpha$ -amilase	1,71 $\pm$ 0,074	1,22 $\pm$ 0,066	2,92 $\pm$ 0,13
Tripsina	0,401 $\pm$ 0,051	0,209 $\pm$ 0,058	0,61 $\pm$ 0,11

Resultados obtidos a partir da média de três preparações diferentes  $\pm$  desvio padrão, expressos em U/g de inseto.

Esse comportamento de distribuição dessas despolimerases no bicho-mineiro do cafeeiro é semelhante ao encontrado em lagartas de *E. ello* (Santos, Ferreira e Terra, 1983; Santos et al., 1984), no qual a  $\alpha$ -amilase e a tripsina apresentaram na região anterior do conteúdo da membrana peritrófica, respectivamente,  $60\% \pm 1$  e  $61\% \pm 3$  da atividade total.

Os resultados de pH's ótimos obtidos separam as enzimas em dois grupos (um alcalino e outro levemente ácido) e sugerem a compartimentalização do processo digestivo. Os valores das atividades das enzimas  $\alpha$ -amilase e tripsina nas metades anterior e posterior do bicho-mineiro do cafeeiro sugerem a reciclagem das enzimas  $\alpha$ -amilase e tripsina através de uma circulação em contracorrente no espaço ectoperitrófico, da mesma forma que os resultados obtidos por Santos, Ferreira e Terra (1983) e Santos et al. (1984).

Apesar das atividades de  $\alpha$ -amilase e tripsina nas lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro terem sido realizadas nas metades anterior e posterior de lagartas inteiras, que inclui o epitélio do ventrículo, local onde, possivelmente, exista atividade de  $\alpha$ -amilase e tripsina, os resultados da presente análise se assemelham muito com os resultados obtidos por Santos, Ferreira e Terra (1983) e Santos et al. (1984), trabalhos que detalhadamente caracterizaram o fluxo em contracorrente no espaço ectoperitrófico em lepidópteros (Lehane e Billingsley, 1996).

A comparação das atividades das enzimas do bicho-mineiro do cafeeiro em seus respectivos pH's ótimos com os resultados obtidos por Santos, Ferreira e Terra (1983) (Tabela 4), mostra que as atividades de todas as enzimas do bicho-mineiro do cafeeiro comparadas apresentaram valores superiores, com exceção da  $\alpha$ -amilase, cujo valor de atividade é maior em *E. ello*. As  $\alpha$ -glicosidades não puderam ser comparadas, pois no trabalho de Santos, Ferreira e Terra (1983) utilizou-se a maltose como substrato. As enzimas comparadas foram determinadas com os mesmos substratos específicos nas mesmas concentrações.

As diferenças nas atividades podem estar relacionadas com o teor de nutrientes da fonte de alimento, em razão das necessidades fisiológicas das lagartas ou, ainda, por ocorrer atividade das enzimas estudadas em outras partes do bicho-mineiro do cafeeiro que não o tubo digestivo.

Mesmo utilizando-se insetos inteiros na obtenção do extrato enzimático, os resultados obtidos nesse estudo do bicho-mineiro do cafeeiro se assemelharam muito com outros estudos nos quais o intestino médio foi separado. Os valores de pH's ótimos das enzimas e a análise das atividades de  $\alpha$ -amilase e tripsina nas regiões anterior e posterior da lagarta se assemelharam muito com os resultados demonstrados na Tabela 2 e obtidos por Santos, Ferreira e Terra (1983) e sugerem a presença da membrana peritrófica e a compartimentalização da digestão nos espaços endo e ectoperitróficos, com um fluxo de fluídos em contracorrente no espaço ectoperitrófico, reciclando as enzimas tripsina e  $\alpha$ -amilase, evitando, dessa forma a excreção dessas enzimas junto com as fezes.

Sugere-se que o sistema digestivo do bicho-mineiro do cafeeiro seja organizado de maneira muito semelhante ao de outros lepidópteros como *E. ello* (Santos, Ferreira e Terra, 1983), *P. apollo* (Nakonieczny et al., 2006) e *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827) (Lepidoptera: Noctuidae) (Ortego, Novilo e Castañera, 1996), dividindo o processo digestivo em digestão primária (ocorrida pela ação de despolimerases de pH ótimo alcalino no espaço endoperitrófico) e digestão intermediária e final (ocorridas

Tabela 4 – Atividades das enzimas analisadas do bicho-mineiro do cafeeiro e atividades das enzimas de *Erinnyis ello* (Santos, Ferreira e Terra, 1983).

Enzima	EC	Atividade (U/g de bicho-mineiro)	Atividade (U/g de <i>E. ello</i> ) Santos, Ferreira e Terra (1983)*
$\alpha$ -glicosidase	3.2.1.20	13,67 $\pm$ 3,43	0,95
$\alpha$ -amilase	3.2.1.1	2,21 $\pm$ 0,12	5,76
Aminopectidase	3.4.11.1	6,81 $\pm$ 0,86	1,79
$\beta$ -glicosidase	3.2.1.21	0,38 $\pm$ 0,16	0,25
Fosfatase ácida	3.1.3.2	0,79 $\pm$ 0,19	-
Sacarase	3.2.1.48	6,76 $\pm$ 0,78	-
Trealase	3.2.1.28	2,21 $\pm$ 0,44	0,33
Tripsina	3.4.21.4	0,70 $\pm$ 0,099	0,0606

\* a conversão da atividade de U/animal disponível em Santos, Ferreira e Terra (1983) para U/g de inseto pode ser feita considerando o peso médio de uma lagarta de *E. ello* igual a 5g (Terra, Ferreira e Santos, 1982).

pela ação de enzimas com pH's ótimos levemente ácidos situadas no espaço ectoperitrófico).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO JARAMILLO, E. **Aspectos básicos sobre morfologia y fisiologia de insectos**. Manizales, Caldas: Universidad de Caldas, 1997. 293 p.

AGARWAL, A. K. Effect of various factors on the activities of sucrase from the larvae of *Sesamia inferens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 19-30, 1987.

ERLANGER, B. F.; COHEN, W.; KOKOWSKY, N. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Characterization of midgut exopeptidase activity from larval *Spodoptera littoralis*. **Insect biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 63-71, 1995.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. **Biology of the Insect Midgut**. 1 ed. Londres: Chapman & Hall, 1996. 504 p.

NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Purification and characterization of a digestive amylase from the tasar silkworm *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 201-209, 1995.

NAKONIECZNY, M.; MICHALCZYK, K.; KEDZIORSKI, A. Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *Frankenbergeri*. **Compters Rendus Biologies**, Paris, v. 329, n. 10, p. 765-774, 2006.

NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 485 p.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La  $\beta$ -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

ORTEGO, F.; NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Madrid, v. 33, n. 2, p. 163-180, 1996.

SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. Midgut  $\alpha$ -glucosidase e  $\beta$ -frutósídadase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 819-824, 1986.

SANTOS, C. D.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 707-714, 1983.

- SANTOS, C. D., RIBEIRO, A. F., FERREIRA, C. , TERRA, W. R. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cells and Tissue Research**. v. 237, p. 565-574, 1984.
- SANTOS, C. D. **Fisiologia e bioquímica da digestão em *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae)**. 1985. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- SRINIVAS, R.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMUHU, K.; SHERMAN, N. E. ; RAO, J. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolyses of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 1760, n. 3, p. 310-317, Mar. 2006.
- SUMIDA, M. Trehalase transformation in silkworm midgut during metamorphosis. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology**, New York, v. 115, n. 2, p. 241-253, 1977.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; SANTOS, C. D. The haemolymph of the Sphingidae moth *Erinnyis ello*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 73a, n.3, p. 373-377, 1982.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C., JORDAO, B. P., DILLON, R. J. **Digestive enzymes**. In: LEHANE, M. J; BILLINGSLEY, P. (Ed.). London: Chapman and Hall, 1996. p.153-194.