

**BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO: ANÁLISE
DA DIGESTÃO E INIBIÇÃO DE TRIPSINA
POR EXTRATOS DE FOLHAS DE MAMONA**

GUILHERME DUARTE ROSSI

2007

GUILHERME DUARTE ROSSI

**BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO: ANÁLISE DA DIGESTÃO E
INIBIÇÃO DE TRIPSINA POR EXTRATOS DE FOLHAS DE MAMONA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

GUILHERME DUARTE ROSSI

**BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO: ANÁLISE DA DIGESTÃO E
INIBIÇÃO DE TRIPSINA POR EXTRATOS DE FOLHAS DE MAMONA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2007.

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu DQI-UFLA

Dr. Geraldo Andrade de Carvalho DEN-UFLA

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos
DQI - UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rossi, Guilherme Duarte

Bicho-mineiro do cafeeiro: Análise da digestão e inibição de tripsina por extratos de folhas de mamona / Guilherme Duarte Rossi. -- Lavras : UFLA, 2007.
74 p. : il.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Café. 2. Bicho-mineiro. 3. Inibição de tripsina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.739

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Custódio Donizete dos Santos pela orientação e pela bela amizade cultivada durante vários anos.

Ao meu amigo José Renato de Abreu pela longa e bela caminhada na qual sempre estivemos juntos.

Ao Departamento de Química e ao Laboratório de Bioquímica da UFLA, em especial à Xulita, por estar sempre disponível e ser um belo exemplo de dedicação.

Aos meus amigos da República Playboy (todas as gerações), pela convivência, diversão e aprendizado.

Aos meus amigos de todas as outras repúblicas nas quais eu morei ou frequentei, sempre sendo muito bem recebido.

À professora Celeste Maria Patto de Abreu por sempre me guiar ao caminho correto e por sua amizade.

Ao meu amigo Gustavo Akira Habe, uma pessoa extremamente inspiradora.

Aos demais professores, alunos de pós-graduação e funcionários que colaboraram com a elaboração desta dissertação, entre eles: Maria das Graças Cardoso, Angelita Duarte Corrêa, Mário César Guerreiro, Luciano Vilela Paiva, Geraldo Andrade Carvalho, Jair Campos de Moraes, Maraísa, Miriam, Julinho, Anderson e Anderson.

Aos meus pais e irmãos.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO GERAL.....	ii
GENERAL ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Cafeicultura.....	3
2.2 Bicho-mineiro.....	3
2.3 Controle do bicho-mineiro.....	6
2.3.1 Controle biológico.....	6
2.3.1.1 Predadores.....	6
2.3.1.2 Parasitóides.....	7
2.3.1.3 Patógenos.....	8
2.3.2 Controle químico.....	8
2.4 Manejo integrado de pragas (MIP).....	10
2.5 Digestão dos insetos.....	10
2.6 Organização do intestino dos insetos.....	12
2.6.1 Intestino anterior.....	13
2.6.2 Intestino médio.....	14
2.6.3 Intestino posterior.....	14
2.7 Dietas dos insetos.....	15
2.8 Consequências de uma dieta deficiente.....	16
2.9 Enzimas digestivas dos insetos.....	18
2.9.1 Peptidases.....	18
2.9.2 Glicosidases.....	20
2.9.3 Esterases, lipases e fosfolipases.....	22
2.9.4 Outras enzimas digestivas.....	22
2.10 Inibição enzimática.....	23
2.11 Purificação de moléculas.....	23

2.11.1 Purificação de proteínas.....	24
2.11.2 Purificação de moléculas não-protéicas.....	25
2.11.3 Cromatografia de adsorção.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
4 RESULTADOS.....	27
CAPÍTULO I: ENZIMAS DIGESTIVAS DO BICHO-MINEIRO DO CAFEEIRO.....	28
CAPÍTULO II: INIBIÇÃO DA TRIPSINA DO BICHO-MINEIRO DO CAFEEIRO E PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR PRESENTE EM EXTRATOS DE FOLHAS DE MAMONA.....	50
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	69
6 PERSPECTIVAS.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α : Alfa
 β : Beta
 μ : Micro
BapNA: (D-L) Benzoil-arginina-para-nitroanilida
CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
 cm^2 : Centímetro quadrado
g: Aceleração da gravidade
ESALQ: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
g: Grama
HCl: Ácido clorídrico
ITU: Inhibited trypsin unit
kg: Quilograma
L: Litro
LpNA: (L)Leucina-para-nitroanilida
M/z: Massa/carga
mA: Miliamper
mg: Miligrama
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mmol: Milimol
NaOH: Hidróxido de sódio
nm: Nanômetros
P.A.: Puro para análise
p-: Para
pH: Potencial hidrogeniônico
psi: Libras por polegada quadrada (pound per square inch)
rpm: Rotações por minuto
TRIS: Tri-hidroximetilaminometano
U: Micromol de substrato hidrolisado por minuto
UTI: Unidade de tripsina inibida
UV/H₂O₂: Ultra-violeta/Peróxido de hidrogênio

RESUMO

ROSSI, Guilherme Duarte. **Bicho-mineiro do cafeeiro: Análise da digestão e inibição de tripsina por extratos de folhas de mamona.** 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O café é uma cultura de grande importância social e econômica para o Brasil e sua produção é afetada por diversas pragas e doenças. Uma dessas pragas é o bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), que pode provocar grandes perdas na produção. As formas de controle do bicho-mineiro do cafeeiro conhecidas e utilizadas atualmente apresentam diversos inconvenientes, o que motiva a procura por novas formas de controle desse inseto. Um possível ponto de ataque às pragas visando ao seu controle é o uso de agentes inibidores de enzimas digestivas participantes da digestão primária. Os testes de inibição da tripsina foram escolhidos pelo fato de essa enzima participar da digestão primária de proteínas e seu mau funcionamento resultar na redução de aminoácidos disponíveis para o inseto. Utilizaram-se extratos de folhas de mamona, pois estudos preliminares com *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) mostraram a presença de um inibidor de tripsina em folhas de mamona. Objetivou-se com este trabalho estudar as enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro e analisar a inibição de sua tripsina utilizando extratos de folhas de mamona. O experimento foi conduzido em Lavras-MG e analisaram-se as enzimas α -glicosidase ($13,7 \pm 3,4$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0), amilase ($2,2 \pm 0,11$ U/g de inseto; pH ótimo = 10,0), aminopeptidase ($6,8 \pm 0,86$ U/g de inseto; pH ótimo = 8,3), β -glicosidase ($0,38 \pm 0,16$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0), fosfatase ácida ($0,79 \pm 0,19$ U/g de inseto; pH ótimo = 5,5), sacarase ($6,7 \pm 0,78$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,5), trealase ($2,2 \pm 0,43$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0) e tripsina ($0,70 \pm 0,2$ U/g de inseto; pH ótimo = 9,7). Pela análise dos pH's ótimos das enzimas, infere-se que o ambiente digestivo do bicho-mineiro do cafeeiro é muito semelhante ao dos demais lepidópteros. Pelos testes de inibição da atividade de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, verificou-se uma inibição de aproximadamente 2,12 UTI/g de folhas frescas de mamona. Os procedimentos de purificação e os tratamentos de fervura e fervura mais adição de β -mercaptoetanol no extrato de folhas de mamona mostraram que o inibidor é uma molécula não-protéica e termorresistente, que foi purificada por cromatografia de adsorção (sílica gel 60) e analisado por espectrometria de massas.

Comitê Orientador: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Orientador),
Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA e Dra. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

ABSTRACT

ROSSI, Guilherme Duarte. **Coffee leaf miner: Digestion and trypsin inhibition using castor bean leaves extracts.** 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Coffee is a crop of great social and economic importance to Brazil and its production is affected by a number of pests and diseases. One of those pests is the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) which can cause great losses in production. The forms of controlling the coffee leaf miner known and utilized at present show several troubles, which motivates the search for new forms of control of this insect. A possible point of attack to the pests aiming at their control is the use of digestive enzyme-inhibiting agents which take part in the primary digestion. The tests of inhibiting trypsin were chosen by this enzyme taking part in the primary digestion of proteins and their poor functioning resulting into the reduction of aminoacids available to the insect. Castor bean leaf extracts were utilized, since previous studies on cassava hornworm - *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) – showed the presence of a trypsin inhibitor in castor bean leaves. The objective of this work was to study the digestive enzymes of the coffee leaf miner and investigate the inhibition of its trypsin by utilizing castor bean leaf extracts. The experiment was conducted in Lavras-MG and the enzymes α -glucosidase (13.7 ± 3.4 U/g of insect; optimum pH = 6.0), amylase (2.2 ± 0.11 U/g of insect; optimum pH = 10.0), aminopeptidase (6.8 ± 0.86 U/g of insect; optimum pH = 8.3), β -glucosidase (0.38 ± 0.16 U/g of insect; optimum pH = 6.0), acidic phosphatase (0.79 ± 0.19 U/g of insect; optimum pH = 5.5), saccharase (6.7 ± 0.78 U/g of insect; optimum pH = 6.5), trehalase (2.2 ± 0.43 U/g of insect; optimum pH = 6.0) and trypsin (0.70 ± 0.2 U/g of insect; optimum pH = 9.7). The analysis of the optimum pH's of enzymes could suggest that the digestive environment of the coffee leaf miner is highly similar to the one of the other lepidopterans. The tests of inhibition of the coffee leaf miner trypsin activity indicated an inhibition of about 2.12 UTI/g of fresh castor bean leaves. The purification procedures and the treatments of boiling and boiling plus addition of β -mercaptoethanol in the castor bean leaf extract showed that the inhibitor is a non-protein molecule and heat-resistant which was purified by adsorption chromatography (silica gel 60) and analyzed by mass spectrometry.

Guidance Committee: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Adviser), Dr. Maria das Graças Cardoso - UFLA and Dr. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cafeicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica para o Brasil. Porém, adversidades como pragas e doenças constantemente assolam o produtor rural, que, de alguma forma, deve recorrer a soluções oferecidas por profissionais competentes. No caso da cafeicultura, observa-se a incidência do bicho-mineiro do cafeeiro (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), praga-chave dessa cultura, que implica em perdas na produtividade e no aumento do custo de produção, para que seu controle seja realizado.

Para que as perdas causadas pelo bicho-mineiro do cafeeiro sejam reduzidas, o produtor deve recorrer às formas de controle disponíveis, utilizando-se de técnicas de controle cultural, de controle biológico e de controle químico. Porém, entre as modalidades de controle, nem sempre se observa disponibilidade de recursos, como cultivares resistentes, eficiência do controle biológico ou segurança no uso do controle químico.

Dessa forma, métodos de controle alternativos que visem à segurança ambiental e alta eficácia contra as pragas devem ser continuamente pesquisados, para que se possa desenvolver uma atividade agrícola economicamente viável e ambientalmente segura.

Uma forma de controle adotada visando ao controle de pragas consiste na incorporação de inibidores de enzimas digestivas participantes da digestão primária (despolimerases), entre os quais se destacam atualmente os inibidores de amilase e tripsina. Esses inibidores são ingeridos juntamente com o alimento e, quando em contato com as enzimas digestivas do inseto-praga, evitam que as enzimas em questão atuem corretamente na hidrólise do substrato (alimento ingerido). O alimento, dessa forma, não é devidamente processado e torna-se indisponível para o metabolismo do inseto.

Com o uso de inibidores de proteases, a redução do nível populacional da praga em campo pode ser observada mediante o atraso da realização de seu ciclo de vida ou diretamente pela morte do inseto (Lee et al., 1999, Mcmanus, 1999 e Xu et al., 1996).

Diante do exposto, objetivou-se estudar a digestão do bicho-mineiro do cafeeiro e, posteriormente, analisar a inibição de sua tripsina utilizando-se extratos de folhas de mamona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeicultura

No contexto do mundo globalizado, a cafeicultura moderna contribuiu com o Brasil na geração de divisas, ocupando posição de destaque na agricultura brasileira (Alves, 1991). O café é cultivado praticamente em todo o território nacional, constituindo-se numa grande fonte de empregos diretos e indiretos.

Segundo o Agrianual (2006), a produção anual de café no Brasil foi de 36.642.750 de sacas (60 kg) (média dos anos de 2003 a 2006). Considerando o preço da saca em torno de R\$ 252,03 (média dos anos de 2003 a 2005), o café gerou, em média, R\$ 9.235.072.282,00/ano, com sua comercialização (indicador CEPEA/ESALQ).

Evidenciada a importância social e econômica dessa cultura para o Brasil, vale salientar que sua produção é limitada por alguns problemas fitossanitários, como a ferrugem-do-cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) e o bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Fragoso, 2000).

O foco deste estudo foi o bicho-mineiro do cafeeiro, considerando principalmente que, em pesquisas conduzidas na região Sul de Minas Gerais demonstrou-se que o ataque dessa praga na época de floração do cafeeiro pode causar redução de mais de 50% na produção, devido ao desfolhamento (Moraes, 1997).

2.2 Bicho-mineiro do cafeeiro

O bicho-mineiro do cafeeiro é uma praga exótica e sua primeira ocorrência no Brasil foi constatada em 1851, provavelmente introduzido pelas mudas advindas das Antilhas e da Ilha Bourbon. As primeiras referências de

bicho-mineiro do cafeeiro como praga no Brasil datam de 1860-61, época da explosão populacional dessa praga nos cafezais do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Mann, 1872; Fonseca, 1944 e Green, 1984 citados por Fragoso, 2000).

Desde 1970, o bicho-mineiro do cafeeiro apresenta-se por meio de ataques intensos e severos, constituindo-se até hoje como umas das pragas mais sérias para a cultura do café nas principais regiões produtoras do país (Speer, 1949; Souza et al., 1981; Instituto Brasileiro do Café, 1986; Souza et al., 1998 citados por Fragoso, 2000). É uma praga monófaga e, por isso, só ataca o cafeeiro (Souza et al., 1998).

O adulto do bicho-mineiro do cafeeiro é uma mariposa de 6,5 mm de envergadura, com as asas brancas que apresentam uma mancha escura em cada ponta. A micromariposa abriga-se durante o dia na superfície abaxial das folhas do cafeeiro e, ao anoitecer, abandona o esconderijo, iniciando a oviposição. Os ovos são colocados na superfície adaxial das folhas, numa média de sete a oito ovos/noite, em pontos isolados da mesma folha ou em diferentes folhas. São achatados, brancos, com cerca de 0,3 mm de comprimento, sendo a sua casca (córior) de aspecto transparente e permanece aderida à folha. Uma fêmea, durante sua vida, é capaz de colocar mais de 50 ovos, com um período embrionário que varia de 5 a 21 dias, dependendo das condições de temperatura e umidade (Moraes, 1997).

Logo após a eclosão, as lagartas penetram no interior da folha, permanecendo entre as duas epidermes e alimentando-se do parênquima foliar. As áreas atacadas vão secando e aumentando de tamanho à medida que as lagartas vão se desenvolvendo. A película superior do tecido seco é facilmente destacável e essa injúria é conhecida como mina (Moraes, 1997).

Em alguns casos, pode-se encontrar mais de uma lagarta por mina. A presença de mais de uma lagarta em uma mesma lesão deve-se à coalescência de lesões (Souza et al., 1998).

A duração da fase jovem oscila entre 9 e 40 dias. Quando as lagartas estão completamente desenvolvidas (com cerca de 6 mm de comprimento), abandonam a folha pela superfície adaxial da mina, tecem um fio de seda e descem até as folhas próximas da saia do cafeeiro. Geralmente, na superfície abaxial da folha, as lagartas tecem um casulo de coloração branca e com formato característico de “X”, onde passam para a fase de pupa com duração de 5 a 26 dias. Após esse período, emergem as micromariposas na proporção de 1 macho: 1 fêmea, cuja longevidade média é de 15 dias.

O ciclo evolutivo varia de 19 a 87 dias, principalmente em função de temperatura e, em condições normais, podem ocorrer 8 a 12 gerações/ano.

Clima seco e/ou manipulação ambiental, que proporcionem condições microclimáticas de baixa umidade relativa no cafezal, favorece a ocorrência desse inseto-praga. Já se constataram infestações significativamente maiores desse inseto em plantas de café cultivadas sob severo déficit hídrico, estando de acordo com a afirmação de que o bicho-mineiro do cafeeiro tem sua atuação favorecida pelo período seco. Dessa forma, a abertura de novas fronteiras em áreas de cerrado para o cultivo do cafeeiro, a partir de meados de 1970, favoreceu a ocorrência contínua desse inseto, mesmo durante a época das chuvas (Moraes, 1997).

O bicho-mineiro do cafeeiro afeta a produtividade e longevidade do cafeeiro, devido ao consumo do parênquima paliçádico, causando necrose foliar, redução da área fotossintética e desfolhamento (Souza et al., 1998). Os sintomas são mais visíveis na parte superior da planta, ocorrendo intenso desfolhamento quando a infestação é grave. A desfolha acentuada próxima ao período de floração é muito prejudicial à produção, em razão do baixo vingamento de frutos

e do baixo rendimento (frutos grandes, porém, com maior volume de casca) (Moraes, 1997).

2.3 Controle do bicho-mineiro do cafeeiro

A seguir, são apresentadas algumas formas de controle do bicho-mineiro do cafeeiro. Todas as formas apresentadas possuem vantagens e desvantagens, o que justifica novos estudos que visem à obtenção de uma planta resistente à praga ou outras formas de controle alternativas.

2.3.1 Controle biológico

Após a constatação cada vez maior da praga, muitos trabalhos de controle foram realizados, principalmente com produtos químicos. Entretanto, durante a realização desses trabalhos, observações paralelas foram realizadas, verificando-se a ocorrência de controle biológico natural utilizando predadores, parasitóides e patógenos (Reis & Souza, 1986).

2.3.1.1 Predadores

Entre os agentes que promovem o controle biológico, os predadores podem ser considerados os mais eficientes, pois necessitam predaar mais de um indivíduo para sua sobrevivência e tornam-se, assim, grandes inimigos naturais.

Para o bicho-mineiro, já foram identificados diversos predadores, todos da ordem Hymenoptera e da família Vespidae - *Brachygastra augusti* (Epiponini) (Hymenoptera: Vespidae), *Protonectarina sylveirae* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae), *Brachygastra lecheguana* (Latreille, 1824) (Hymenoptera: Vespidae), *Polybia scutellaris* (Write, 1841) (Hymenoptera: Vespidae), *Synoeca surinama cyanea* (Linnaeus) (Hymenoptera: Vespidae) e *Eumenes* sp).

As vespas predadoras do bicho-mineiro predam também as lagartas de outros insetos e a época de ocorrência depende da abundância de presas, sendo esse um dos motivos pelos quais não se recomenda o uso indiscriminado de defensivos, principalmente no verão, que é a época de maior atividade dos insetos. A preservação de ninhos de vespas em vegetação próxima aos cafezais é muito importante para o sucesso do controle biológico do bicho-mineiro (Reis & Souza, 1986).

A eficiência dos predadores no controle do bicho-mineiro é de cerca de 69% (Souza, 1979; Souza et al., 1980 citados por Reis & Souza, 1986), e a constatação desse fato pode ser feita observando-se folhas minadas que, após haver a predação, têm a epiderme superior e/ou inferior, correspondente à área da lesão, totalmente dilacerada. Essas dilacerações são realizadas pela vespa para retirar a lagarta que lhe serve de alimento.

O controle por meio de predadores ainda é obtido somente em condições naturais, porém já se conseguiu, por meio de trabalhos experimentais, transferir ninhos de vespas para locais próximos a cafezais com pleno sucesso, o que garante a instalação dessa modalidade mesmo em locais onde que não existem vespas em condições naturais (Reis & Souza, 1986).

2.3.1.2 Parasitóides

Apesar de os parasitóides serem ótimos aliados do homem no controle do bicho-mineiro, a eficiência deles é bem menor que a dos predadores, tendo sido já constatado cerca de 16% a 30% de parasitismo sobre essa praga (Gallo et al., 2002).

O bicho-mineiro é parasitado na fase de lagarta, sendo que as fêmeas dos parasitóides detectam com suas antenas as lagartas dentro da lesão para efetuarem a postura.

Os parasitóides do bicho-mineiro do cafeeiro são microhimenópteros, pertencentes a várias famílias que, devido ao seu diminuto tamanho, passam despercebidos pelos cafeicultores (Reis & Souza, 1986).

Da mesma forma que os predadores, o controle feito utilizando parasitóides em condições naturais também não é isoladamente suficiente e devem-se utilizar outros recursos para efetuar o controle da praga, principalmente na época de pico populacional.

2.3.1.3 Patógenos

Dos agentes de controle biológico do bicho-mineiro, os patógenos ou microorganismos entomopatogênicos são os menos conhecidos e menos empregados no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. Sabe-se, entretanto, de sua existência e do potencial que possuem para o controle da praga (Reis & Souza, 1986).

Citados por Reis & Souza (1986), Robbs et al. (1976) relataram a presença de bactérias e fungos em lagartas mortas do bicho-mineiro do cafeeiro. As bactérias *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas aeruginosa* são apontadas como os microrganismos mais eficientes no controle de lagartas do bicho-mineiro.

2.3.2 Controle Químico

O nível de controle do bicho-mineiro do cafeeiro para utilização de inseticidas em pulverização (carbamatos, fosforados e piretróides) varia de acordo com a época de ocorrência. Assim, em locais onde o ataque ocorrer no período seco (julho a agosto), o controle deverá ser iniciado quando forem encontradas 40 folhas com lagartas vivas, num total de 100 folhas amostradas. Nas regiões em que o ataque ocorrer no período chuvoso (dezembro, janeiro e fevereiro), esse nível será de 20% (Gallo et al., 2002).

Não deve ser feita aplicação indiscriminada de inseticidas em pulverização, pois poderão ocorrer desequilíbrios biológicos devido à eliminação de inimigos naturais, causando explosões populacionais da praga ou surtos indesejáveis de lagartas que, normalmente, são controladas biologicamente por parasitóides encontrados em abundância nas lavouras. Quando se usam constantemente inseticidas em pulverização, principalmente piretróides, além de eliminar os parasitóides, esse grupo de inseticidas pode causar desequilíbrios populacionais em favor do ácaro vermelho. O controle químico deve ser feito somente nos talhões ou parte dos talhões mais infestados, a fim de auxiliar na preservação dos inimigos naturais (Reis & Souza, 1986). As aplicações devem ser repetidas a cada 5/6 meses e deve ser respeitado um período de carência de 90 dias, evitando-se culturas intercalares (Gallo et al., 2002).

O uso de granulados sistêmicos é feito de maneira preventiva e é recomendado em regiões cujo clima seja favorável ao bicho-mineiro. Os inseticidas sistêmicos granulados devem ser aplicados no período chuvoso (no início ou final), pois esses dependem da umidade do solo para atuar (Gallo et al., 2002) e apresentam período residual de 110 a 160 dias, dependendo da natureza dos produtos recomendados (Souza et al., 1998). Esses inseticidas devem ser aplicados no solo com incorporação, evitando-se, assim, qualquer contaminação de águas pela erosão laminar, além da morte de aves e de outros animais, inclusive o homem (Souza et al., 1998).

O controle químico é a forma de controle do bicho-mineiro mais usada, porém, sua utilização indiscriminada traz como conseqüências a seleção de pragas resistentes, desequilíbrios ecológicos e a contaminação do meio ambiente e do aplicador.

2.4 Manejo integrado de pragas (MIP)

O manejo integrado de pragas, mais comumente chamado de MIP, é uma técnica que, por sua definição, compreende a utilização dos mais variados métodos de manejo, a fim de se controlar as pragas em agroecossistemas (Panizzi & Parra, 1991).

Luckman & Metcalf (1982), citados por Panizzi & Parra (1991), destacaram que, para a implementação efetiva do MIP, é necessário que se entenda e se planeje a implantação e condução da lavoura em questão, que se analise a questão custo/benefício da implementação do MIP, que se conheça a tolerância da cultura aos danos das pragas, que se determine a época correta da utilização dos inseticidas e, finalmente, que se eduquem as pessoas para entenderem e aceitarem o MIP. Esses autores referiram-se ainda a sete grandes categorias de métodos de controle, com cerca de trinta técnicas viáveis de serem aplicadas em programas de MIP.

Para a implantação de um programa de MIP, deve-se atentar para a necessidade da integração das diferentes técnicas disponíveis ao usuário de forma harmônica e que rendam os melhores resultados tanto em nível econômico como nos níveis ecológico e social (Panizzi & Parra, 1991).

2.5 Digestão dos insetos

Os insetos, como todos os seres vivos heterotróficos, demandam energia para crescer e manter seu metabolismo mediante a oxidação (respiração celular) de moléculas orgânicas. Tais moléculas orgânicas são obtidas de diversas fontes de alimentos, o que classifica os insetos em fitófagos (alimentam-se de toda a planta ou de partes dela, tais como folhas, raízes, flores, frutos, sementes, pólen, etc), carnívoros (alimentam-se de animais inteiros ou parte deles, como sangue, pêlo ou penas) ou saprófagos, que se alimentam de material vegetal ou animal em decomposição ou esterco. Quanto ao número de fontes de alimentos, os

insetos são classificados em monófagos (cuja dieta é restrita a apenas uma fonte), oligófagos (dieta restrita a fontes de uma mesma família) ou polífagos (dieta composta por fontes de alimento de várias famílias) (Horn, 1978).

Os insetos utilizam seu sistema digestivo para extrair nutrientes e outras substâncias do alimento por eles consumido. A maior parte do alimento é ingerida na forma de macromoléculas e outras substâncias complexas (como proteínas, polissacarídeos, gorduras, ácidos nucleicos, etc.), as quais precisam ser quebradas por meio de reações hidrolíticas em moléculas menores (como aminoácidos, açúcares simples, etc.) antes de serem usadas pelas células do corpo para obtenção de energia, crescimento ou reprodução. Esse processo de “quebra” é denominado digestão (Meyer, 2006).

A digestão entre os animais superiores ocorre usualmente em alguma cavidade do corpo sob a ação de enzimas secretadas (digestão luminal ou cavital) e/ou sob ação de enzimas ligadas à membrana de células que recobrem a superfície luminal do órgão onde se verifica a digestão (digestão em membrana).

A digestão de polímeros, tais como polissacarídeos e proteínas, que correspondem a maior massa do alimento usualmente consumido pelos animais pode ser dividida em três fases distintas: digestão primária, digestão intermediária e digestão final. A digestão primária consiste no ataque às ligações internas dos polímeros por enzimas conhecidas como despolimerases (amilases e tripsinas por exemplo) normalmente secretadas, resultando em oligômeros. Na digestão intermediária, os oligômeros provenientes da digestão primária são hidrolisados até oligômeros de menor peso molecular pelas mesmas enzimas responsáveis pela digestão primária e/ou por enzimas diferentes, geralmente também secretadas. Na digestão final, os oligômeros resultantes (mais freqüentemente dímeros e trímeros) são hidrolisados até monômeros. Esse processo geralmente é mediado por enzimas ligadas nas microvilosidades das células ou presas ao glicocálice, podendo agir também no lúmen do intestino

médio. Esse processo resulta em monômeros, que são prontamente disponíveis para serem absorvidos e utilizados no metabolismo celular (Santos, 1985).

As enzimas hidrolíticas envolvidas na digestão primária e intermediária são usualmente secretadas por células presentes na parede do trato digestivo ou glândulas. A saliva em alguns animais tem a função de apenas lubrificar o alimento, ao passo que em outros ela contém enzimas importantes na digestão (Santos, 1985).

2.6 Organização do intestino dos insetos

Todos os insetos possuem um sistema digestivo complexo. Isso significa que o processamento do alimento ocorre por um tipo de tubo fechado, o canal alimentar, que atravessa o corpo do inseto longitudinalmente, a partir da boca até o ânus. Os alimentos ingeridos normalmente atravessam o corpo em apenas uma direção (Meyer, 2006).

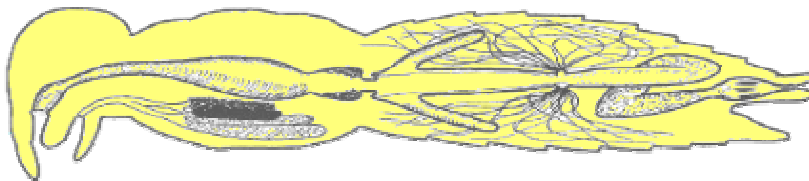


FIGURA 1. Esquema do canal alimentar dos insetos (Meyer, 2006).

Esse arranjo difere de um sistema incompleto de digestão (encontrado em certos invertebrados inferiores, como a hidra e a estrela-do-mar) em que se tem uma única abertura que funciona como boca e ânus e se liga a uma cavidade semelhante a uma bolsa. Muitos biólogos consideram o sistema digestivo completo como uma evolução sobre o sistema digestivo incompleto, já que aquele apresenta a especialização funcional (Meyer, 2006).

A especialização funcional do sistema digestivo permite que diferentes partes desse sistema possam estar especialmente adaptadas para realizar várias funções, como digestão do alimento, absorção de nutrientes e excreção. Na maioria dos insetos, o canal alimentar é subdividido em três regiões funcionais: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Nation, 2002).

2.6.1 Intestino anterior

A boca de um inseto, localizada centralmente entre a base das peças bucais, é uma válvula muscular que indica a frente do pré-intestino. Na cavidade bucal, o alimento é sugado da abertura bucal até a faringe mediante a contração dos músculos cibariais. Esses músculos, localizados entre a cabeça e a parede anterior da faringe, fazem a sucção aumentando o volume da faringe. Esse mecanismo de sucção é chamado de bomba cibarial. Esse sistema é mais desenvolvido em insetos com aparelho bucal picador/sugador.

Da faringe, a comida passa pelo esôfago através de peristaltismo (contração muscular rítmica da parede do intestino). O esôfago é apenas um tubo que conecta a faringe ao papo, sendo esse um órgão de armazenamento de comida.

A comida permanece no papo até que esta possa ser processada através das seções restantes do canal alimentar. No papo, alguma digestão pode ocorrer como resultado de enzimas salivares aderidas na cavidade bucal e/ou de outras enzimas regurgitadas do intestino médio.

Em alguns insetos, o papo se abre posteriormente em um proventrículo que contém denticulos que moem e pulverizam as partículas de comida. O proventrículo executa as mesmas funções da moela nas aves. A válvula estomodeal, um músculo localizado logo atrás do proventrículo, regula o fluxo de comida do intestino anterior até o intestino médio (Meyer, 2006).

2.6.2 Intestino médio

O intestino médio inicia-se logo após a válvula estomodeal. Perto do seu final, projeções no formato de dedos (normalmente de 2 a 10) divergem das paredes do intestino médio. Essas estruturas, os cecos gástricos, proporcionam superfície de contato extra para secreção de enzimas ou para a absorção de água e outras substâncias do canal alimentar. O restante do intestino médio é chamado de ventrículo – local onde inicialmente ocorre a digestão enzimática da comida e absorção de nutrientes. Células digestivas que revestem as paredes do ventrículo possuem projeções microscópicas (microvilosidades) que aumentam a superfície de contato para absorção de nutrientes (Meyer, 2006).

No intestino médio, ocorre a síntese das enzimas digestivas (Acevedo Jaramillo, 1997) e é o local onde efetivamente ocorre a hidrólise das macromoléculas.

A parte posterior do intestino médio é marcada por outro músculo, a válvula pilórica. Essa regula o fluxo de material do intestino médio até o intestino posterior (Meyer, 2006).

2.6.3 Intestino posterior

Próximos à válvula pilórica estão presentes centenas de túbulos de Malpighi. Essas longas estruturas em formato de túbulos finos se estendem por quase toda cavidade abdominal e servem como órgãos excretores, removendo resíduos nitrogenados (principalmente íons amônio) da hemolinfa.

O íon amônio tóxico é rapidamente convertido em uréia e depois em ácido úrico mediante diversas reações ocorridas nos túbulos de Malpighi. O ácido úrico (semi-sólido) é acumulado dentro de cada túbulo, que é eventualmente esvaziado através do intestino posterior para eliminação do ácido úrico como parte do bolo fecal.

O resto do intestino posterior funciona em maior parte em homeostase, pela regulação da absorção de água e sais. Em alguns insetos, o intestino posterior é visivelmente subdividido em íleo, colo e reto. A eficiente recuperação de água é facilitada por seis estruturas retais que estão incrustadas nas paredes do reto. Esses órgãos removem mais de 90% da água do bolo fecal antes que esse abandone o corpo através do ânus (Meyer, 2006).

2.7 Dietas dos insetos

Estima-se que aproximadamente dois terços das espécies do mundo sejam insetos (Wigglesworth, 1974). Uma possível explicação para essa hegemonia é a grande capacidade de os insetos explorarem diversas fontes de alimento.

A capacidade digestiva dos insetos depende das enzimas presentes no trato digestivo e como elas estão compartimentalizadas em seu intestino. Além da capacidade de digerir materiais tratados, os insetos têm explorado diversas fontes de comida não disponíveis para outros animais devido à toxicidade dessas fontes. Algumas espécies fitófagas têm driblado os efeitos de inibidores de proteases e compostos secundários das plantas, os quais se tornam tóxicos após a ação enzimática (Harbone, 1993 citado por Terra et al., 1996). Dessa maneira, os insetos têm se desenvolvido em nichos ecológicos inexploráveis por outros seres vivos, constituindo um desafio sem igual para enzimologistas estudarem a fisiologia digestiva desses organismos, que possuem dieta extremamente diversificada (Terra et al., 1996).

A dieta dos insetos define o grupo de enzimas de maior atividade na digestão. As baratas, por exemplo, possuem um grande número de enzimas digestivas capazes de digerir diferentes tipos de fontes de alimento. Insetos hematófagos, cuja dieta é baseada em proteínas, possuem poucas enzimas digestivas, sendo que as presentes são do tipo proteases. Quando um inseto se

alimenta apenas de néctar, como os adultos da ordem Lepidoptera, apenas a sacarase está presente; já as lagartas fitófagas dessa ordem possuem proteases, lipases, amilases, maltases e sacarases (Wigglesworth, 1974). Os cupins, que possuem um regime alimentar à base de celulose, necessitam da presença de certos microrganismos simbióticos para que o processo digestivo se complete (Acevedo Jaramillo, 1997).

A habilidade de os insetos utilizarem diferentes materiais como fonte de alimento inevitavelmente conduziu alguns deles a serem classificados como pragas em diferentes setores, tais como na produção agrícola de campo, no armazenamento de alimentos e na saúde humana. Tal consideração mostra a necessidade do conhecimento da digestão dos insetos como um pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de controle (Terra et al., 1996), como por exemplo, a utilização da inibição da digestão por meio de inibidores de enzimas digestivas importantes como ferramenta para controlar a infestação de insetos importantes na agricultura.

2.8 Consequências de uma dieta deficiente

Apesar da grande diversidade da dieta entre os insetos, existem algumas necessidades básicas para que esses cresçam e se desenvolvam. Dessa maneira, todos os insetos necessitam de fontes de energia química, geralmente carboidratos, além de proteínas e lipídeos (Horn, 1978).

Durante a digestão, as proteínas são hidrolisadas, gerando os aminoácidos, estruturas básicas para o crescimento estrutural e síntese de enzimas.

Os insetos podem sintetizar aminoácidos, porém, os considerados essenciais devem ser ingeridos na dieta. Srivastava & Auclair (1974) citados por Horn (1978), demonstraram a importância dos aminoácidos na sobrevivência e crescimento de pulgões, conforme TABELA 1.

TABELA 1. Efeito dos aminoácidos na sobrevivência e crescimento de pulgões (*Acyrtosiphon pisum*)

% de aminoácidos na dieta	Ganho de peso após 12 dias	Taxa de sobrevivência após 12 dias (%)	Dias até o estágio adulto
0	0,09 mg	3	Sem adultos
1	0,42 mg	56	12-15
2	0,83 mg	74	8-10
4	1,19 mg	62	10

As quantidades e proporções de vários elementos da dieta de um inseto podem resultar em importantes conseqüências, além dos efeitos óbvios de deficiência ou excesso dos mesmos (insetos bem alimentados geralmente têm maior tamanho) (Horn, 1978).

Por exemplo, a produção de ovos em parasitóides das ordens Diptera e Himenoptera aumenta quando mais flores estão disponíveis, para que os parasitóides possam aumentar sua alimentação com néctar (carboidrato) e pólen (proteína) (Leius, 1967, citado por Horn, 1978). A adição de “geléia real” na rotina alimentar de larvas de abelhas implica na formação de uma taxa maior de rainhas reprodutivas férteis em relação a trabalhadores estéreis. Citado por Horn (1978), Mitsuhashi & Koiama (1974) perceberam que pulgões desenvolviam asas mais curtas quando ácido fólico (uma vitamina B) estava numa concentração entre 0,5 e 0,7 mg/L de dieta. Em concentrações maiores, as asas cresciam totalmente.

A necessidade de aminoácidos para insetos adultos está longe de ser tão bem conhecida como as necessidades para crescimento e metamorfose. Por exemplo, insetos machos adultos geralmente não requerem aminoácidos, pois a espermatogênese ocorre em estádios imaturos e os adultos podem ter reservas

suficientes armazenadas para suas necessidades metabólicas e para síntese de proteínas (Blum, 1985).

2.9 Enzimas digestivas dos insetos

Vários estudos a respeito de diferentes enzimas digestivas presentes em insetos foram realizados e pode-se agrupar as principais enzimas envolvidas com o processo digestivo de acordo com sua função em peptidases, glicosidases, lipases, fosfolipases, esterases e outras enzimas digestivas (Terra et al., 1996).

2.9.1 Peptidases

As peptidases são enzimas atuantes no processo digestivo dos insetos e têm a função de hidrolisar ligações peptídicas, promovendo a digestão de proteínas. As principais enzimas com função de hidrólise protéica em insetos são divididas em tripsinas, quimotripsinas, cisteína proteinases, ácido aspártico proteinases, aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases (Terra et al., 1996). A classificação das peptidases se dá de acordo com a posição de clivagem das proteínas, das características do seu sítio ativo e local onde essa enzima realiza a hidrólise (Rawlings & Barrett, 1999).

As tripsinas são endopeptidases (Jany et al., 1978) com o aminoácido serina em seu sítio ativo que, preferencialmente, clivam ligações peptídicas do lado da carboxila de L-aminoácidos arginina ou lisina (Olsen et al., 2004).

A atividade digestiva de tripsinas tem sido encontrada em quase todas as espécies de insetos, mas existem exceções, como espécies da ordem Hemiptera e espécies pertencentes à ordem Cucujiformia da ordem Coleoptera (Terra et al., 1996).

Da mesma forma que as tripsinas, as quimotripsinas são endopeptidases (Broadway, 1989) com o grupo serina no sítio ativo, mas diferem das tripsinas por clivar ligações peptídicas do lado da carboxila de aminoácidos aromáticos

(fenilalanina, tirosina e triptofano) (Lehninger et al., 1995). Algumas propriedades das quimotripsinas dos insetos contrastam com as quimotripsinas dos vertebrados, como sua instabilidade em pH's ácidos e sua forte inibição pelo inibidor encontrado na soja (Terra et al., 1996).

As cisteína proteinases são endopeptidases com um resíduo de aminoácido cisteína envolvido na catálise em seu sítio ativo (Merck & Co., 2006) e são enzimas comuns em espécies de coleópteras (Murdok et al., 1997 e Campos, 1989, citados por Oliveira Neto et al., 2004).

Outro tipo de endopeptidase são as ácido aspártico proteinases, cuja catálise ocorre na hidrólise de ligações peptídicas internas de proteínas. Essas enzimas apresentam um resíduo de ácido aspártico em seu sítio ativo, são ativas em pH ácido e encontradas em insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera e Diptera (Terra et al., 1996).

As aminopeptidases são exopeptidases que atuam ligadas em membrana ou livres no lúmen (Nation, 2002) e hidrolisam aminoácidos da extremidade amino-terminal de cadeias polipeptídicas. As aminopeptidases encontradas em insetos possuem pH ótimo alcalino (Terra et al., 1996).

As carboxipeptidases são exopeptidases que removem aminoácidos da extremidade carboxila-terminal de cadeias polipeptídicas. Esse tipo de enzima foi diagnosticado em insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (Bown & Gatehouse, 2004).

As dipeptidases hidrolisam aminoácidos isolados a partir de pequenos peptídeos e são classificadas de acordo com sua especificidade por substrato. Essas enzimas foram encontradas em espécies das ordens Diptera, Himenoptera e outras (Del Lama & Ferreira, 2003).

2.9.2 Glicosidases

As glicosidases são enzimas que clivam as ligações glicosídicas formadas entre dois açúcares (Marana et al., 2001), a fim de reduzir o tamanho do alimento ingerido até moléculas passíveis de absorção pelo organismo. A hidrólise dos polímeros grandes de açúcares (amido e celulose) ingeridos na alimentação ocorre durante a digestão primária, através da ação de enzimas que atuam ao longo das cadeias α -1,4 e β -1,4 de glicose (Santos et al., 1983).

As α -amilases são altamente difundidas entre insetos de diversas ordens (Terra et al., 1996). Já as enzimas atuantes nas cadeias β -1,4 de glicose, como a celulase, por exemplo, são encontradas em insetos e podem ser de origem endógena ou de microrganismos simbiotes encontrados no intestino médio (Watanabe et al., 1997).

A xilanase mais comumente encontrada é a endo- β -1,4-xilanase que atua nas cadeias de xilana (Brennan et al., 2004), é secretada por microrganismos simbiotes presentes no intestino dos insetos e foi observada em Orthoptera, Plecoptera, Trichoptera e Isoptera (Vonk & Western, 1984 e Rouland et al., 1988b, citados por Terra et al., 1996).

As quitinases são encontradas no intestino médio de diversos insetos (Vonk & Western, 1984, citados por Terra et al., 1996) e essas hidrolisam a quitina, em suas ligações β -1,4 entre os monômeros de N-acetilglucosamina (Merzendorfer, 2006) em oligossacarídeos solúveis e insolúveis de baixo peso molecular (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Entre as quitinases, pode-se observar em insetos também a β -N-acetilglucosaminidase, que libera N-acetilglucosamina da extremidade terminal não-redutora de oligossacarídeos (Terra et al., 1996).

A lisozima catalisa a hidrólise do glicosídeo β -1,4, ligado entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina do peptídeoglicano presente na parede celular de bactérias. As lisozimas estão espalhadas pela natureza como

parte de um sistema defensivo contra bactérias e foram encontradas em insetos, tanto no trato digestivo como na hemolinfa (Ursic Bedoya et al., 2005).

As α e β glicosidases catalisam respectivamente a hidrólise de resíduos de α -1,4 glicose e β -1,4 glicose da extremidade não redutora de dissacarídeos ou oligossacarídeos com variada eficiência. Maiores atividades de α -glicosidases foram encontradas em Diptera (Terra et al., 1996), e β -glicosidases também foram diagnosticadas em insetos (Santos & Terra, 1986).

Pode-se observar uma complementaridade da ação das α e β glicosidases. Como, por exemplo, a hidrólise da sacarose é catalisada por enzimas específicas para a ligação α -glicosil ou pela ligação β -frutosil. No intestino médio dos insetos, geralmente ocorre a ação de α -glicosidases, provavelmente devido ao fato de que a β -frutosidase em insetos é relativamente incomum, sendo observada em apenas um pequeno número de casos nos quais a caracterização foi realizada (Santos & Terra, 1986). O papel fisiológico da β -frutosidase no intestino médio de *Eriniys. ello* é hidrolisar a sacarose das folhas (fase larval) ou a sacarose do néctar (fase de adulto). A sacarose que não é eficientemente digerida pelas α -glicosidases no intestino médio de *E. ello* é hidrolisada pelas β -frutosidases (Terra et al., 1987).

As trealases hidrolisam a trealose em duas moléculas de glicose e é uma das mais difundidas hidrolases de carboidratos entre os insetos (Terra et al., 1996). A trealase é uma enzima ligada à membrana encontrada no trato digestivo e no músculo relacionado com o vôo de *Locusta migratoria* (Wegener et al., 2003). O consumo de trealose é aumentado em até 10 vezes, quando o vôo é realizado (Van Der Horst et al., 1978, citados por Wegener et al., 2003), aumentando, dessa maneira, a atividade da trealase.

Outras enzimas que atuam sobre glicosídeos podem estar presentes em insetos de acordo com a fonte de alimentação e são classificadas observando-se seu mecanismo de reação e o substrato em que atuam.

2.9.3 Esterases, lípases e fosfolípases

As esterases são enzimas relacionadas com a hidrólise de ligações do tipo éster e são amplamente encontradas no sistema digestivo de insetos na forma de lipases, fosfatases, entre outras.

Os lipídeos ingeridos na dieta dos insetos na forma armazenada de óleos e gorduras ou em membranas lipídicas precisam ser hidrolisados para liberação dos ácidos graxos mediante hidrólise da ligação éster.

As triacilglicerol lipases são enzimas primariamente envolvidas na mobilização de lipídeos do corpo gorduroso dos insetos (Arrese & Wells, 1997) e preferencialmente hidrolisam as ligações éster mais afastadas dos triacilgliceróis e atuam apenas na interface água-lipídeo (Terra et al., 1996).

As fosfolípases A₁ e A₂ removem os ácidos graxos anexados nas posições 1 e 2 dos fosfolipídeos (Uscian et al., 2005). A fosfolipase A já foi encontrada no intestino médio de várias espécies de lepidópteros (Sommerville & Pockett, 1976 e Turunen & Kastari, 1979, citados por Terra et al., 1996 e Uscian et al., 2005) e é provavelmente muito comum entre os insetos.

2.9.4 Outras enzimas digestivas

Os grupos fosfato devem ser removidos dos compostos fosforilados para que sua absorção ocorra. Essas reações são catalisadas por fosfatases não específicas, que são ativas em meio alcalino ou ácido. As fosfatases alcalinas estão normalmente nas membranas das microvilosidades em espécies das ordens Diptera e Lepidoptera, mas podem também ocorrer nas membranas basolaterais do intestino médio ou como enzimas secretadas (Terra et al., 1996). As

fosfatases ácidas também se encontram presentes no processo digestivo de insetos e estão localizadas principalmente no citosol das células do intestino de insetos da ordem Lepidoptera (Santos & Terra, 1984 citados por Terra et al., 2005).

2.10 Inibição enzimática

As enzimas promovem a catálise de praticamente todos os processos que ocorrem nas células e não é surpreendente que os inibidores enzimáticos estejam entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos (Lehninger et al., 1995).

Quando uma enzima não funciona corretamente em um organismo, esse fatalmente sofrerá danos devido à má funcionalidade do catalisador de reações. Esse mau funcionamento pode ser atribuído a diversos fatores, sendo um destes a presença de inibidores enzimáticos no sistema de reação. Os inibidores são classificados em irreversíveis e reversíveis. Entre os reversíveis, outras classificações são feitas de acordo com a maneira que interagem com a enzima ou substrato e são classificados em inibidores reversíveis competitivos, incompetitivos ou incompetitivos (Lehninger et al., 1995 e Voet et al., 2000).

2.11 Purificação de moléculas

Após se diagnosticar a presença de uma molécula de interesse em uma mistura, é de grande importância purificá-la e caracterizá-la, a fim de explorar suas propriedades.

Durante o processo de purificação de uma molécula, experimentam-se vários métodos de separação e a eficiência de cada um é avaliada pelo ensaio de uma propriedade que distinga a molécula de interesse (Stryer, 1996), como, por exemplo, a ação inibitória da molécula purificada sobre uma determinada enzima.

Na maioria dos casos, muitos métodos diferentes de purificação precisam ser empregados em seqüência para se purificar completamente uma molécula (Lehninger et al., 1995).

As moléculas apresentam inúmeras diferenças entre si, como, por exemplo, tamanho, forma, carga, hidrofobicidade, afinidade por outras moléculas, entre outras. Todas essas propriedades podem ser exploradas para separar uma molécula de interesse das outras, permitindo que se possa estudá-la individualmente (Alberts, 2002).

Durante o processo de purificação, a escolha de um método é de certa forma empírica, e muitos protocolos são testados antes que seja determinado qual é o mais efetivo. Esse jogo de tentativa e erro pode geralmente ser minimizado pelo uso de guias de procedimentos de purificação desenvolvidos para moléculas similares (Lehninger et al., 1995), quando informações a respeito da molécula de interesse estão disponíveis.

O censo comum diz que procedimentos baratos devem ser utilizados primeiro, quando o volume total da solução do extrato bruto e o número de contaminantes é maior. Alguns métodos cromatográficos são, em geral, impraticáveis nos primeiros estágios de purificação, pelo fato de a quantidade do meio cromatográfico necessário aumentar de acordo com a amostra. À medida que cada passo de purificação é completado, o tamanho da amostra torna-se menor e podem ser aplicados métodos cromatográficos mais sofisticados e, também, mais caros (Lehninger et al., 1995).

2.11.1 Purificação de proteínas

Antes de se proceder a purificação de uma proteína, técnicas massais de purificação, também conhecidas como técnicas de pré-purificação, são adotadas. Tais técnicas consistem em separar as proteínas das demais moléculas presentes em um composto.

Entre as formas de pré-purificação, uma muito utilizada baseia-se na precipitação das proteínas mediante a adição de sulfato de amônio saturado a 4°C em uma solução que contenha proteínas. Este método utiliza-se do princípio de “salting-out”, no qual a camada de solvatação das proteínas é retirada. Tal procedimento resulta na redução da solubilidade e precipitação das proteínas (Seidman & Mowery, 2006).

Outro método de precipitação de proteínas consiste no uso de acetona a -20°C. A presença desse solvente reduz a constante dielétrica da água e as proteínas em solução precipitam (Wang, 2006).

Ao se diagnosticar a presença da molécula de interesse na fração protéica, técnicas mais refinadas de separação de proteínas devem ser utilizadas, tais como a filtração molecular ou diferentes tipos de cromatografia disponíveis, capazes de explorar as diferentes características das proteínas para separá-las.

2.11.2 Purificação de moléculas não-protéicas

Da mesma forma que a purificação de proteínas se utiliza de suas diferentes propriedades para separá-las, a purificação de moléculas não-protéicas também se utiliza deste artifício.

Porém, diferentemente das proteínas, as moléculas não-protéicas apresentam, em geral, uma maior estabilidade em relação à perda de função da molécula devido à desnaturação. Dessa forma, métodos cromatográficos que se utilizam de solventes inviáveis para a separação de proteínas podem ser explorados para separar esse grupo de moléculas.

Por definição, cromatografia é um processo de separação no qual a amostra que contém uma mistura de compostos é distribuída entre duas fases. Uma fase é conhecida como estacionária, enquanto a outra é conhecida como fase móvel e desloca-se através da fase estacionária. A fase estacionária pode ser um sólido poroso, de superfície composta por um material ativo na forma de

partículas minúsculas ou por um fino filme de líquido colocado em um suporte sólido. A fase móvel pode ser gasosa ou líquida. Se um gás é utilizado, o processo é conhecido como cromatografia gasosa e se um líquido é utilizado, cromatografia líquida (Meyer, 2006).

Vários tipos de cromatografia são conhecidos, entre eles a cromatografia em papel, em camada delgada, de adsorção, de troca iônica, de exclusão, de bioafinidade, gasosa, líquida de alta eficiência, entre outros (Collins et al., 1997).

Neste trabalho, explorou-se cromatografia de adsorção, cujos princípios são descritos no item 2.11.3.

2.11.3 Cromatografia de adsorção

A cromatografia de adsorção é um método de separação que se baseia na adsorção de diferentes compostos presentes em uma mistura a um adsorvente (ex.: sílica ou alumina) em diferentes taxas. De acordo com a polaridade de determinada molécula, essa terá uma interação eletrostática de Van der Waals com o adsorvente (Collins et al., 1997). Como as diferentes moléculas demonstram forças de interação distintas com o adsorvente, as moléculas são separadas de acordo com a passagem de solventes de diferentes polaridades pela coluna.

Ao se aplicar uma amostra em uma coluna de cromatografia de adsorção, as moléculas polares interagem mais fortemente com a sílica em relação às moléculas de caráter mais apolar. Dessa maneira, realiza-se passagem de solventes de caráter apolar e o processo de separação se inicia, pois as moléculas com maior interação com o solvente migrarão juntamente com esse, ao passo que as moléculas cuja interação com a sílica é maior ficam adsorvidas. A fim de se continuar o processo de separação, deve-se aumentar gradativamente a polaridade dos solventes eluídos na coluna, para que esses possam vencer a

competição pelas moléculas adsorvidas na sílica. A diferença na adsorção entre as moléculas e a sílica é a base desse processo de separação (Scott, 2006).

3 OBJETIVOS

Objetivou-se com este trabalho analisar o pH ótimo e a atividade (U/g de inseto) das enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro, avaliar o efeito “in vitro” do inibidor presente em folhas de mamona sobre a tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro, avaliar a inibição desse inibidor sobre a tripsina bovina e purificar esse inibidor de tripsina.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram divididos em dois capítulos. No capítulo 1, estão apresentados os resultados da análise das enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro. No capítulo 2, os resultados de inibição de tripsina e purificação deste inibidor são descritos.

CAPÍTULO I
ENZIMAS DIGESTIVAS DO BICHO-MINEIRO DO CAFEEIRO

RESUMO

ROSSI, Guilherme Duarte. **Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro**. 2007. 28-49 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

As enzimas digestivas são os catalisadores das reações de hidrólise que ocorrem durante o processo digestivo. Os insetos são munidos de diferentes enzimas digestivas, as quais se diferenciam de acordo com suas dietas. Neste trabalho, objetivou-se verificar as atividades de algumas enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro como pré-requisito para posterior análise da inibição de enzimas participantes da digestão. As lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro - *Leucopetera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) - foram coletadas em campo e em casa-de-vegetação. O extrato enzimático utilizado na determinação das atividades foi obtido pela maceração das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro utilizando o homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e água gelada como meio de extração. Determinou-se a atividade de algumas enzimas incubando o extrato enzimático do bicho-mineiro do cafeeiro com substratos específicos. O experimento foi conduzido em Lavras-MG e analisaram-se as atividades no pH ótimo específico de cada enzima. As atividades das enzimas (U/g de lagarta) com seus respectivos pH's ótimos foram: α -glicosidase ($13,67 \pm 3,43$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0), amilase ($2,21 \pm 0,12$ U/g de inseto; pH ótimo = 10,5), aminopeptidase ($6,81 \pm 0,86$ U/g de inseto; pH ótimo = 8,3), β -glicosidase ($0,38 \pm 0,16$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0), fosfatase ácida ($0,79 \pm 0,19$ U/g de inseto; pH ótimo = 5,5), sacarase ($6,76 \pm 0,78$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,5), trealase ($2,21 \pm 0,44$ U/g de inseto; pH ótimo = 6,0) e tripsina ($0,70 \pm 0,2$ U/g de inseto; pH ótimo = 9,7). Pela comparação dos pH's ótimos encontrados em bicho-mineiro do cafeeiro, infere-se que o ambiente intestinal desse inseto se assemelha com o dos demais lepidópteros encontrados na literatura.

Comitê Orientador: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Orientador), - Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA e Dra. Angelita Duarte Corrêa UFLA

ABSTRACT

ROSSI, Guilherme Duarte. **Coffee leaf miner`s difegestive enzymes**. 2007. 28-49 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Digestive enzymes are the catalysts of the hydrolysis reactions occurring during the digestive process. Insects are fitted with different digestive enzymes, which differ from one another according to their diets. In this work, it was intended to verify the activities of some digestive enzymes of the coffee leaf miner as a pre-requisite for later analysis of the inhibition of enzymes participating in digestion. The leaf miner caterpillar *-Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) – were collected in fields and in greenhouse. The enzyme extract utilized in determining the activities was obtained from the grinding of the leaf miner caterpillars by utilizing the Potter-Elvehjem type homogenizer and icy water as a means of extraction. The activity of some enzymes incubating the enzyme extract of the coffee leaf miner with particular substrates was determined. The experiment was conducted in Lavras-MG and the activities in the optimum pH specific to each enzyme were investigated. The activities of the enzymes (U/g of caterpillar) with their respective optimum pH's were: α -glucosidase (13.67 ± 3.43 U/g of insect; optimum pH = 6.0), amylase (2.21 ± 0.12 U/g of insect; optimum pH = 10.5), aminopeptidase (6.81 ± 0.86 U/g of insect; optimum pH = 8.3), β -glucosidase (0.38 ± 0.16 U/g of insect; optimum pH = 6.0), acidic phosphatase (0.79 ± 0.19 U/g of insect; optimum pH = 5.5), saccharase (6.76 ± 0.78 U/g of insect; optimum pH = 6.5), trehalase (2.21 ± 0.44 U/g of insect; optimum pH = 6.0) and trypsin (0.70 ± 0.2 U/g of insect; optimum pH = 9.7). The comparison of the optimum pH's found in coffee leaf miner indicated that the intestinal environment of this insect is similar to the one of the other lepidopterans found in the literature.

Guidance Committee: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Major Professor), Dr. Maria das Graças Cardoso - UFLA and Dr. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

1 INTRODUÇÃO

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 (Meyer, 2006).

Nos insetos, esse processo de hidrólise ocorre principalmente no intestino médio, local onde as enzimas digestivas são secretadas (Acevedo Jaramillo, 1997).

A digestão é dividida 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 capazes de atravessar os poros da membrana peritrófica. A partir desse momento, os fragmentos menores de alimento são digeridos no espaço ectoperitrófico pela ação das enzimas responsáveis pela digestão intermediária e final (Santos, 1985).

Nos lepidópteros, o conteúdo intestinal, localizado no espaço endoperitrófico, apresenta pH alcalino, ao passo que o espaço ectoperitrófico apresenta pH mais próximo da neutralidade (Nation, 2002).

Objetivou-se com este trabalho analisar o pH ótimo e as atividades das enzimas digestivas α -glicosidase, amilase, aminopeptidase, β -glicosidase, fosfatase, sacarase, trealase e tripsina, a fim de se comparar as características das enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro - *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) - com as características de outros lepidópteros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e retirada das lagartas das minas

As lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro foram coletadas em folhas infestadas de um cafezal e de uma casa-de-vegetação no campus da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA), acondicionadas em sacos de papel e transportadas até o Laboratório de Bioquímica da UFLA, 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°C, até sua utilização nos ensaios enzimáticos. Cada conjunto de 12 lagartas constituiu uma repetição.

2.2 Extração enzimática

Em razão do tamanho diminuto das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro, a retirada do intestino médio foi impossibilitada. Desse modo, a solução encontrada foi homogeneizar a lagarta inteira. Após experiências realizadas, determinou-se o número de 12 lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro para cada mL de meio extrator (água 4°C). Cada conjunto de 12 lagartas 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°C para facilitar a maceração. Após a pré-maceração, transferiu-se essa solução para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, onde se realizou a maceração em um volume de solução igual a 1 mL.

Após maceração final, filtrou-se a solução obtida com uma tela de nylon com poros de 100 µm de diâmetro e completou-se o volume final para 1 mL. Esse homogeneizado foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas. Cada conjunto de 12 lagartas constituiu uma repetição.

2.3 Determinação dos pH's ótimos das enzimas analisadas

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 obtido conforme o item 2.2 em diferentes pH's. 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.

2.3.1 pH ótimo da α -glicosidase

Utilizou-se o tampão citrato-fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ nos seguintes pH's: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0. Incubaram-se $100 \mu\text{L}$ do extrato enzimático obtido no item 2.2 juntamente com $100 \mu\text{L}$ do substrato p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo 10 mmol.L^{-1} (preparado em água) por 2 horas a 30°C (Santos, 1985). A reação foi interrompida com $1,0 \text{ mL}$ de $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e realizou-se a leitura em espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda igual a 400 nm . Uma curva-padrão de p-nitrofenol foi utilizada como referência para os cálculos de atividade.

2.3.2 pH ótimo da amilase

Utilizaram-se os tampões fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ nos seguintes pH's : 7,0; 7,5 e 8,3 e o tampão glicina/ $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, nos pH's 8,3; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 e 11,0. Incubaram-se $100 \mu\text{L}$ do extrato enzimático com o substrato amido 1% (preparado em água) e deixou-se reagir por 8 horas a 30°C . De acordo com metodologia proposta por Noelting & Bernfeld (1948), a reação foi interrompida com $200 \mu\text{L}$ do reagente DNS, com posterior ebulição por 5 minutos, resfriamento e adição de $1,6 \text{ mL}$ de água. Os açúcares redutores formados a pela hidrólise do amido foram quantificados mediante observações em

espectrofotômetro a 550 nm. Uma curva-padrão de glicose foi utilizada com referência para os cálculos de atividade.

2.3.3 pH ótimo da aminopeptidase

Utilizaram-se os tampões fosfato 0,1 mol.L⁻¹ nos pH's 7,0; 7,5 e 8,3 e o tampão glicina/NaOH 0,1 mol.L⁻¹ nos pH's 8,3; 9,0; 9,5; 10,0 e 10,5. Incubaram-se 100 µL do extrato enzimático juntamente com 1000 µL do substrato LpNA 1 mmol.L⁻¹ por 30 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com a adição de 200 µL de ácido acético 30%. O monitoramento da hidrólise do substrato foi realizado com espectrofotômetro a 410 nm. Os cálculos de velocidade de catálise da enzima foram baseados no coeficiente de extinção molar da p-nitroanilida, de acordo com Erlanger et al. (1961).

2.3.4 pH ótimo da β-glicosidase

Utilizou-se o mesmo procedimento do item 2.3.1, porém, o substrato utilizado foi p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo 10 mmol.L⁻¹.

2.3.5 pH ótimo da fosfatase

Utilizou-se o mesmo procedimento do item 2.3.1, porém, o substrato utilizado foi p-nitrofenilfosfato 20 mmol.L⁻¹. Os tampões utilizados foram citrato 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5), TRIS/maleato 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,3) e glicina/NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 8,3; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 e 11,0) e deixando-se 100 µL do extrato enzimático reagir com 100 µL do substrato por 4 horas a 30°C.

2.3.6 pH ótimo da sacarase

Utilizou-se o mesmo procedimento do item 2.3.2, porém, o substrato utilizado foi a sacarose 20 mmol.L⁻¹ e os tampões utilizados foram

citrato/fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) e fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,0 e 7,5). Incubaram-se $100 \mu\text{L}$ do extrato enzimático com $100 \mu\text{L}$ do substrato por 6 horas a 30°C .

2.3.7 pH ótimo da trealase

Utilizou-se o mesmo procedimento do item 2.3.2, porém, o substrato utilizado foi a trealose 20 mmol.L^{-1} e os tampões utilizados foram citrato/fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) e fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,0 e 7,5). Incubaram-se $100 \mu\text{L}$ do extrato enzimático com $100 \mu\text{L}$ do substrato por 8 horas a 30°C .

2.3.8 pH ótimo da tripsina

Utilizou-se o mesmo procedimento do item 2.3.3, porém o substrato utilizado foi o BapNA $0,87 \text{ mmol.L}^{-1}$ e os tampões utilizados foram TRIS/HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0) e glicina/NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 9,0; 10,0; 10,5). Incubou-se $200 \mu\text{L}$ do extrato enzimático com 1 mL do substrato por 1 hora a 30°C .

2.5 Eletroforese do extrato enzimático do bicho-mineiro do cafeeiro

Preparou-se um gel para eletroforese em cilindro a 7,5% segundo Davis (1964) e Ornstein (1964). A eletroforese foi realizada em corrente constante de 2,5 mA por gel e variação da voltagem livre. Aplicou-se uma alíquota de $0,2 \text{ mL}$ de extrato enzimático sobre o gel e, após a corrida, fracionou-se o gel em pedaços de 2 mm com o auxílio de lâminas de aço. Deixaram-se as frações eluindo em $200 \mu\text{L}$ de água e realizou-se a recuperação da atividade de tripsina de acordo com o item 2.6.

2.6 Atividade de enzimas digestivas

As atividades das diferentes enzimas digestivas foram quantificadas de acordo com a TABELA 2, incubando-se o extrato enzimático obtido no item 2.2 por 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.

TABELA 2 – Condições-padrões e métodos de determinação de atividade das enzimas.

Enzima	EC ⁴	Substrato	Concentração final	pH	Determinação realizada
α -glicosidase	3.2.1.20	p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo	10 mM	6,0	p-nitrofenol ²
Amilase	3.2.1.1	Amido	0,5%	10,5	Açúcares redutores ¹
Aminopeptidase	3.4.11.1	LpNA	1 mM	8,3	p-nitroanilida ³
β -glicosidase	3.2.1.21	p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo	10 mM	6,0	p-nitrofenol ²
Fosfatase ácida	3.1.3.2	p-nitrofenilfosfato	10 mM	5,5	p-nitrofenol ²
Sacarase	3.2.1.48	Sacarose	10 mM	6,5	Açúcares redutores ¹
Trealase	3.2.1.28	Trealose	10 mM	6,0	Açúcares redutores ¹
Tripsina	3.4.21.4	BapNA	0,87 mM	9,7	p-nitroanilida ³

Os ensaios foram realizados a 30°C, nos pH's ótimos determinados. Os tampões utilizados foram: citrato (pH = 5,5), citrato-fosfato (pH = 6,0 e 6,5), e glicina-NaOH (pH = 8,3; 9,7 e 10,5). ¹ – Noelting & Bernfeld, 1948. ² – Santos, 1985 ³ – Erlanger et al, 1961. ⁴ – Moss, 2006.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 pH's ótimos

A α -glicosidase do bicho-mineiro do cafeeiro apresentou um valor de pH ótimo igual a 6,0 (FIGURA 2), justamente o mesmo encontrado por Prativiel-Sosa et al. (1986), citados por Terra et al. (1996), que analisaram essa mesma enzima estudando *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller, 1775), (Lepidoptera: Thaumetopoeidae).

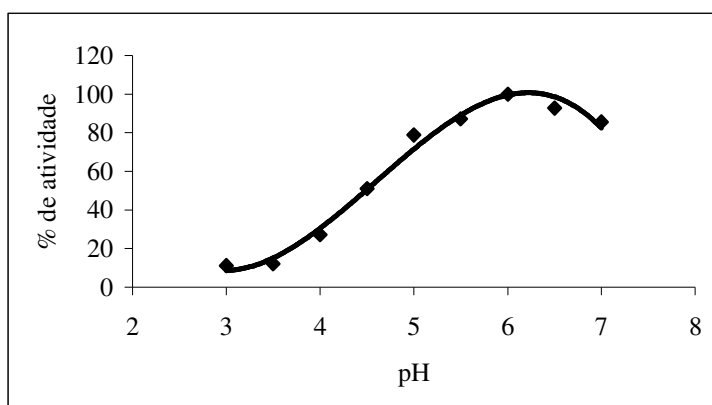


FIGURA 2. pH ótimo da α -glicosidase do bicho-mineiro do cafeeiro

Já o pH ótimo da amilase encontrado no bicho-mineiro do cafeeiro foi igual a 10,5 (FIGURA 3). Esse valor é parecido com os encontrados por Nagaraju et al., 1995, que analisaram *Antheraea mylitta* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Saturniidae) e encontraram o valor de pH ótimo da amilase igual a 9,5.

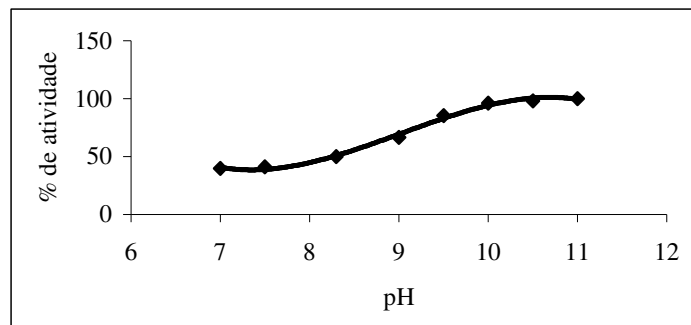


FIGURA 3. pH ótimo da amilase do bicho-mineiro do cafeeiro

Ao analisar a aminopeptidase do bicho-mineiro do cafeeiro, determinou-se um valor de pH ótimo igual a de 8,3 (FIGURA 4). Esse valor é semelhante ao encontrado por Lee et al. (1995), que encontraram uma faixa de pH ótimo de 7,5 a 8,5 para a leucina, cisteína e dipeptidil IV aminopeptidases estudando *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae).

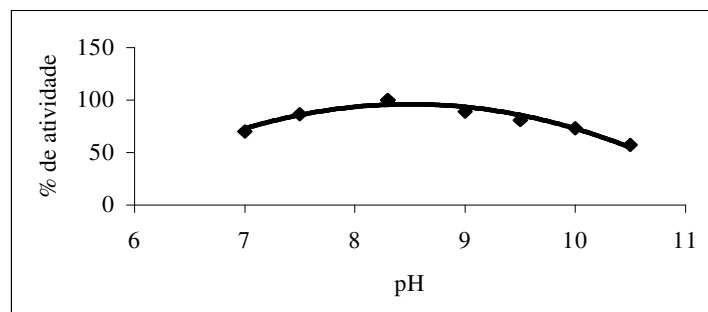


FIGURA 4. pH ótimo da aminopeptidase do bicho-mineiro do cafeeiro

A análise do pH ótimo da β -glicosidase do bicho-mineiro do cafeeiro demonstrou que a maior atividade desta enzima foi em pH igual a 6,0 (FIGURA 5). Resultados obtidos por Franzl et al. (1989), estudando *Zygaena trifolii*

(Esper, 1783) (Lepidoptera: Zygaenidae) (faixa de pH ótimo encontrada entre 3,5 e 6,5) e por Santos & Terra (1986), analisando *Erinnyis ello* (Linnaes, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) (pH ótimo igual a 6,0), assemelham-se muito com o resultado obtido para o bicho-mineiro do cafeeiro.

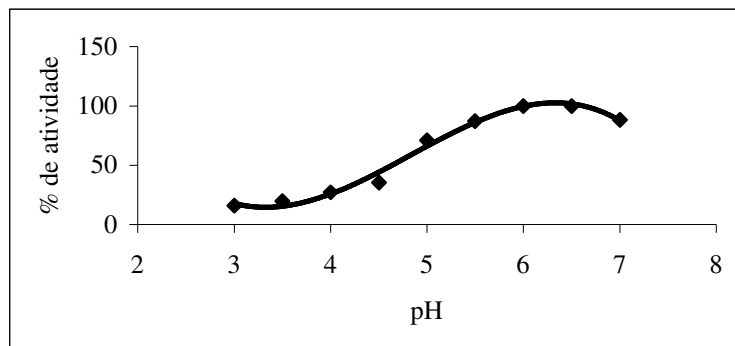


FIGURA 5. pH ótimo da β -glicosidase do bicho-mineiro do cafeeiro

Utilizando o substrato p-nitro-fenilfosfato, Srinivas et al. (2006) determinaram que o pH ótimo da fosfatase alcalina de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é igual a 10,5. Na FIGURA 6, pode-se observar a presença de duas enzimas responsáveis pela retirada de grupos fosfato das moléculas, sendo uma ativa em pH ácido (5,5) e outra em pH alcalino (9,5). Esse resultado condiz com outras experiências realizadas utilizando-se outros lepidópteros, que por meio das quais detectaram-se a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas (Santos & Terra, 1984 e Terra et al., 1990 citados por Terra, 2005).

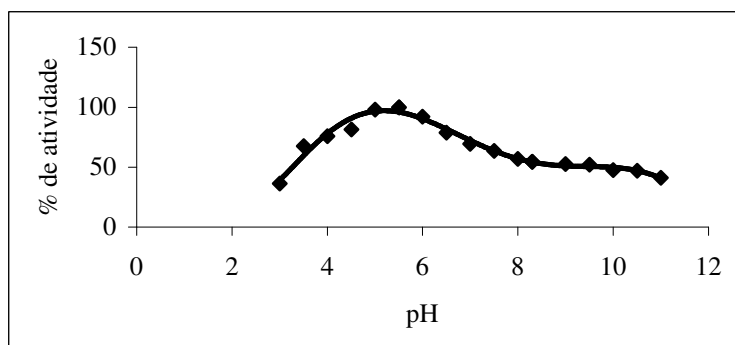


FIGURA 6. pH ótimo da fosfatase do bicho-mineiro do cafeeiro

Agarwal (1987), estudando a sacarase de *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), determinou que o pH ótimo dessa enzima é igual a 6,2. Observou-se atividade ótima da sacarase do bicho-mineiro do cafeeiro em pH igual a 6,5 (FIGURA 7).

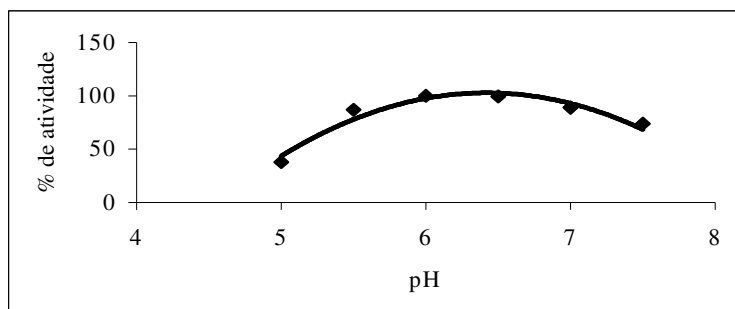


FIGURA 7. pH ótimo da sacarase do bicho-mineiro do cafeeiro

Sumida et al. (1977), determinaram que o pH ótimo da trealase solúvel no lúmen de *Bombix mori* (Linneaus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) é igual a 5,0, ao passo que o pH ótimo da trealase ligada à membrana desse mesmo inseto

é 6,0. No caso da análise da trelase do bicho-mineiro do cafeeiro, observou-se um valor de pH ótimo igual a 6,0.

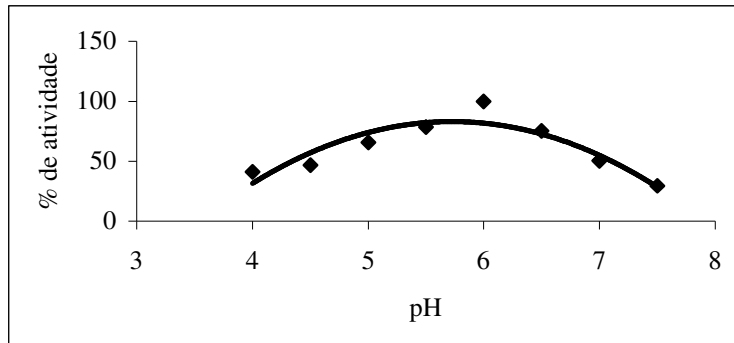


FIGURA 8. pH ótimo da trelase do bicho-mineiro do cafeeiro

A tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro indicou maior atividade em pH 9,7 (FIGURA 9). Esse resultado é condizente com o esperado, pois, de acordo com Santos et al. (1983), a digestão primária de proteínas ocorre no lúmen do intestino médio, local onde o pH é alcalino. Milne & Kaplan (1993), citados por Terra (1996), estudando *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae), encontraram o valor de 9,5 para o pH ótimo da tripsina desse inseto.

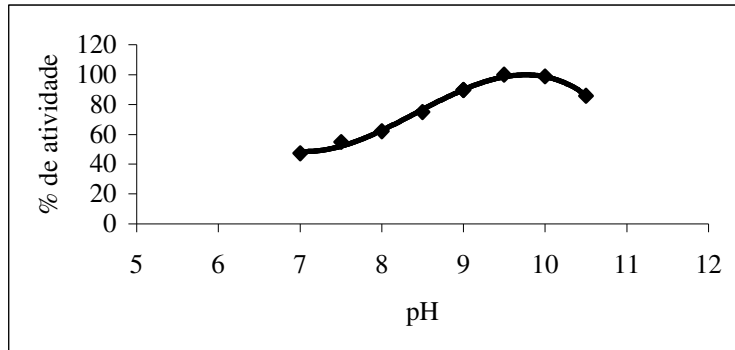


FIGURA 9. pH ótimo da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro

O conteúdo intestinal de lagartas *E. ello*, de acordo com Santos et al. (1983), apresenta pH alcalino próximo de 9,0. Considerando a análise dos resultados de pH ótimo das enzimas das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro, infere-se que, da mesma forma que *E. ello*, o conteúdo intestinal desse inseto também seja alcalino, pois as enzimas do tipo despolimerases relacionadas com a digestão primária (tripsina e amilase) apresentaram um pH ótimo alcalino. As despolimerases são secretadas no lúmen, a fim de iniciar a digestão, reduzindo o tamanho das moléculas ingeridas na alimentação.

As enzimas responsáveis pela finalização do processo de hidrólise, além de poderem estar solúveis no lúmen, localizam-se presas ao glicocálice e ligadas às membranas das microvilosidades, locais onde o pH é mais ácido que no lúmen do intestino médio (Nation, 2002).

Os valores de pH ótimo das enzimas analisadas responsáveis pelo processo de digestão intermediária e final de carboidratos (α e β glicosidases, sacarase, trealase) no bicho-mineiro do cafeeiro estão próximos da neutralidade ou levemente ácidos. Santos (1985) ressalta que o pH da região mais próxima ao tecido epitelial é menos alcalino que o conteúdo endoperitrófico.

Nakoneczny et al. (2006) relatam valores superiores de atividade das enzimas envolvidas na digestão intermediária e final (maltase, celobiase, trealase, sacarase e α -glicosidase) no tecido epitelial do intestino médio (local com pH menos alcalino) de *Parnassius apollo* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Papilionidae) em relação ao conteúdo do intestino médio (local mais alcalino). Já no conteúdo do intestino médio, esses autores encontraram maior atividade de amilase (envolvida na digestão primária) em relação à atividade dessa enzima, determinada no tecido epitelial do intestino médio.

Dessa forma, analisando os valores de pH ótimo das enzimas digestivas avaliadas no bicho-mineiro do cafeeiro, pode-se sugerir que seu processo digestivo seja organizado de forma semelhante ao dos demais lepidópteros comparados; o alimento é ingerido, passa pelo processo de digestão primária em um ambiente fortemente alcalino, pela ação de despolimerases (amilase e tripsina) e, em seguida, o alimento sofre os processos de digestão intermediária e final em ambientes menos alcalinos por ação de outras hidrolases (α e β glicosidases, sacarase e trealase, por exemplo)

3.2 Eletroforese do extrato enzimático do bicho-mineiro do cafeeiro e revelação da atividade de tripsina

Diferentemente da curva de pH ótimo, a revelação da atividade de tripsina das frações obtidas a partir da eletroforese do extrato enzimático do bicho-mineiro do cafeeiro indicou a presença de pelo menos duas enzimas do tipo tripsina atuantes sobre o substrato BapNA em pH= 9,7 (FIGURA 10). Paulillo et al. (2000) demonstraram um perfil eletroforético semelhante para *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), com dois picos de atividades para enzima do tipo tripsina. Possivelmente, a curva de pH ótimo de tripsina (FIGURA 9) indicou a presença de apenas uma enzima, pelo fato de que as diferentes enzimas observadas em gel de eletroforese apresentem valores

de pH ótimo muito próximos ou até mesmo semelhantes, inferindo-se que as enzimas reveladas estejam relacionadas com a digestão de proteínas no lúmen do intestino médio, local onde o pH é alcalino. Estudos mais refinados precisam ser realizados para que se possa afirmar tal hipótese.

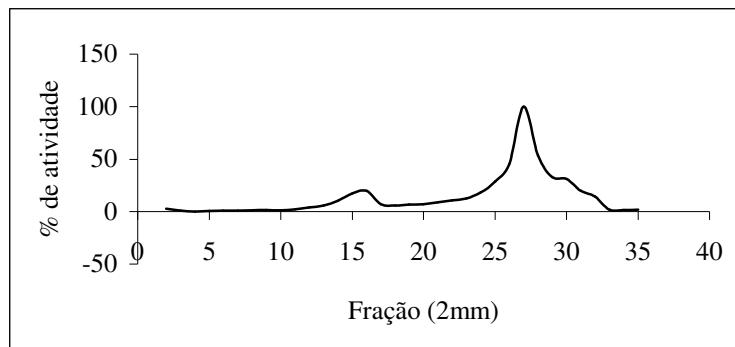


FIGURA 10. Recuperação da atividade de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro nas frações de gel de poliacrilamida.

3.3 Atividade das enzimas analisadas

As enzimas do bicho-mineiro do cafeeiro foram analisadas em seus respectivos pH's ótimos e apresentaram atividades expressas em U (μMol de substrato hidrolisado ou produto formado/minuto), conforme TABELA 3.

TABELA 3. Atividade e atividade específica das enzimas analisadas.

Enzima	EC (Moss, 2006)	Atividade (U/g de inseto)
α -glicosidase	3.2.1.20	13,67 \pm 3,43
Amilase	3.2.1.1	2,21 \pm 0,12
Aminopectidase	3.4.11.1	6,81 \pm 0,86
β -glicosidase	3.2.1.21	0,38 \pm 0,16
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
Tripsina	3.4.21.4	0,70 \pm 0,099

Pode-se observar, pela comparação dos resultados de atividade (U/g de inseto) obtidos para o bicho-mineiro do cafeeiro (TABELA 3) com os resultados obtidos por Santos et al. (1983), cujo alvo de estudo foi o lepidóptero *E. ello*, que as atividades de todas as enzimas comparadas apresentaram valores superiores no bicho-mineiro do cafeeiro, com exceção da amilase, cujo valor de atividade é maior em *E. ello*. As atividades obtidas por Santos et al. (1983) foram: α -glicosidase (0,95 U/g de inseto), amilase (5,76 U/g de inseto), aminopectidase (1,79 U/g de inseto), β -glicosidase (0,25 U/g de inseto), trealase (0,33 U/g de inseto) e tripsina (0,0606 U/g de inseto). A conversão da atividade de U/animal disponível em Santos et al. (1983) para U/g de inseto pode ser feita de acordo com o trabalho de Terra et al. (1982), no qual está demonstrado que o peso médio das lagartas utilizadas nos ensaios foi de 5 gramas. As diferenças nas atividades podem estar relacionadas com o teor de nutrientes da fonte de alimento ou em razão das necessidades fisiológicas das lagartas.

4 CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados de pH ótimo das enzimas das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro, sugere-se que, da mesma forma que a maioria dos lepidópteros, o conteúdo intestinal desse inseto também é alcalino, pois as enzimas do tipo despolimerases analisadas relacionadas com a digestão primária (tripsina e amilase) apresentaram um pH ótimo alcalino.

Os valores de pH ótimo das enzimas analisadas responsáveis pelo processo de digestão intermediária e final de carboidratos (α e β glicosidases, sacarase, trealase) no bicho-mineiro do cafeeiro são próximos da neutralidade ou levemente ácidos.

A atividade de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro foi 11,55 vezes maior que a atividade de tripsina em *E. ello*. Com base nessa informação, verifica-se que o bicho-mineiro do cafeeiro apresenta uma grande necessidade da atuação de enzimas do tipo tripsina em seu processo digestivo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO JARAMILLO, E. **Aspectos basicos 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**, Dodrecht, v. 20, n. 1, p. 19-30, 1987.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 121, p. 404-427, 1964.

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.

FRANZL, S.; ACKERMANN, I.; NAHRSTEDT, A. Purification and characterization of a β -glucosidase (linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii* Esper, 1783 (Insecta, Lepidoptera). **Experientia**, Basel, v. 45, n. 8, 1989.

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, Jan. 1995.

MEYER, J. R. ENT 425 Home Page. Disponível em:
<<http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/index.html>>. Acesso em: 09 nov. 2006.

MOSS, G. P. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em:
<<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 16 nov. 2006.

NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Purification and characterization of a digestive amylase from the tasar silkworm *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). **Comparativa Biochemistry and Physiology B-Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 201-209, Jan. 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, Oct. 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 β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.121, p. 321-349, 1964.

PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA, M. C. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors. **Journal of Economical Entomology**, Oxford, v. 93, p. 892–896, 2000.

SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. Midgut α -glucosidase e β -frutosidase 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. **Fisiologia e bioquímica da digestão em *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae)**. São Paulo, 1985. 178 p.

SRINIVAS, R.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMUHU, K.; SHERMAN, N. E. ; RAO, J. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolyses of organophosforus compounds from an insecticide resistant pest *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuide) **Biochemistry Biophys 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 Enviromental Physiology**, New York, v. 115, n. 2, p. 241-253, 1977.

TERRA, W. R.; WALTER, R.; COSTA, R. H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 255-269, June 2005.

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.; VALENTIN, A.; SANTOS, C. D. Utilization of sugars, hemicellulose, starch, protein, fat and minerals by *Erinnyis ello* larvae and the digestive role of their midgut hydrolases. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1143-1147, 1987.

TERRA, W. R. et al. **Digestive enzymes**. In: LEHANE M. J. (Ed.). **Billin**. London: Chapman and Hall, 1996. p.153-194.

CAPÍTULO II
INIBIÇÃO DA TRIPSINA DE BICHO-MINEIRO DO CAFEEIRO E
PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR PRESENTE EM EXTRATOS DE FOLHAS
DE MAMONA

RESUMO

ROSSI, Guilherme Duarte. **Inibição da tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro e purificação do inibidor presente em extratos de folhas de mamona.** 2007. 50-68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Inibidores de tripsina representam uma estratégia de controle de insetos e, por isso, a identificação e caracterização desses inibidores são etapas muito importantes para que novas formas de controle de pragas sejam desenvolvidas. Os inibidores de tripsina atuam na digestão primária de proteínas e comprometem o processo digestivo por completo, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos ao inseto. A incorporação de inibidores de tripsina na dieta de insetos-praga é uma forma de controle cuja eficácia foi verificada por diferentes autores. A fim de se observar a eficiência de extratos de folhas de mamona na inibição de enzimas do tipo tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, conduziu-se em Lavras-MG um experimento com a finalidade de observar o fenômeno de inibição “in vitro” e iniciou-se um processo de purificação dessa molécula mediante precipitações com sulfato de amônio e acetona, e em seguida, por meio de cromatografia de adsorção com posterior análise em espectrômetro de massas. Pelos resultados obtidos, verificou-se presença de um inibidor de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro nos extratos de folhas de mamona capaz de inibir 2,12 UTI/g de folhas frescas de mamona por grama de inseto, o que representa, aproximadamente 40% de inibição. Em testes realizados com tripsina bovina observou-se que o inibidor presente no extrato de folhas de mamona não apresenta poder de inibição sobre essa enzima. Os procedimentos de purificação e os tratamentos de fervura e fervura mais adição de β -mercaptoetanol no extrato de folhas de mamona mostraram que o inibidor trata-se de uma molécula não-protéica e termorresistente.

Comitê Orientador: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Orientador), - Dra. Maria das Graças Cardoso - UFLA e Dra. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

ABSTRACT

ROSSI, Guilherme Duarte. **Coffee leaf miner trypsin inhibition and castor bean leaf extract inhibitor purification.** 2007. 50-68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Trypsin inhibitors stand for a strategy of insect control and, therefore, the identification and characterization of these inhibitors are very important steps for new forms of pest control to be developed. Trypsin inhibitors act in the primary digestion of proteins and endanger the digestive process wholly, reducing the availability of aminoacids to the insect. The incorporation of trypsin inhibitors in the diet of pest insects is a control form whose efficacy was verified by different authors. In order to observe the efficiency of castor bean leaf extracts in inhibiting trypsin –type enzymes of the coffee leaf miner, in Lavras-MG, an experiment was conducted with the purpose of observing an “in vitro” inhibition phenomenon and a purification process of this molecule through precipitations with ammonium sulfate and acetone was started, and next, through adsorption chromatography with later analysis in mass spectrometer. The reached results indicated the presence of a trypsin inhibitor of the coffee leaf miner in the castor bean leaf extracts, capable of inhibiting 2.12 UTI/g of fresh leaves per gram pf insect, which stands for about 40% of inhibition. Tests performed with bovine trypsin indicated that the inhibitor present in the castor bean leaf extract presents no inhibiting power on this enzyme. The purification procedures and the treatments of boiling and boiling plus addition of β -mercaptoethanol in the castor bean leaf extract showed that the inhibitor is a non-protein and heat-resistant molecule.

Guidance Committee: Dr. Custódio Donizete dos Santos - UFLA (Adviser), Dr. Maria das Graças Cardoso - UFLA and Dr. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A presença de metabólitos secundários com a função de defesa em plantas é um evento muito conhecido na natureza (Duke, 2007 e Hammerschmidt, 1999). Dessa forma, é interessante detectar, isolar e caracterizar essas moléculas de defesa presentes naturalmente nas plantas e utilizá-las no controle de pragas ou doenças que afetam a produção agrícola. Apesar de diversas moléculas oriundas de plantas terem sido caracterizadas, o modo de ação de poucas é conhecido (Lehane & Billingsley, 1996)

Uma classe muito conhecida de compostos secundários presentes em plantas são os inibidores de tripsina, uma serina protease relacionada com a digestão primária de proteínas. Esses inibidores apresentam a propriedade de inibir enzimas relacionadas com a digestão protéica e impedem que o organismo que os ingere tenha seu desenvolvimento adequado, podendo até mesmo interromper o ciclo de vida da espécie em questão (Lee et al., 1999, Mcmanus, 1999 e Xu et al., 1996).

Existem diversos tipos de inibidores de tripsina de natureza protéica e esses são classificados de acordo com suas características em pelo menos 7 famílias (Lehane & Billingsley, 1996). Mas existem também inibidores de tripsina de natureza não-protéica, como o 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto (Megyery et al., 2006) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (Gomez-Cabronero et al., 2006).

Objetivou-se com este trabalho confirmar a presença de um inibidor de tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro em extratos de folhas de mamona, verificar sua ação sobre a tripsina bovina e purificar esse inibidor de tripsina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos extratos de folhas de mamona (*Ricinus communis*)

Para o preparo do extrato com inibidor, utilizaram-se folhas de mamona de uma espécie de ocorrência espontânea no câmpus da UFLA denominada mamoinha de caule vermelho. Em testes nos quais se utilizaram outras cultivares, verificou-se que a mamoinha de caule vermelho foi a única a apresentar inibição para a tripsina de lepidópteros (bicho-mineiro do cafeeiro, *S. frugiperda* e *E. ello*) e não inibir a tripsina bovina. Essa propriedade se faz muito importante e útil para a incorporação desse inibidor em plantas de interesse comercial por meio do melhoramento de plantas.

Foram coletadas folhas de tamanho e aspectos visuais padronizados, evitando-se folhas que apresentassem sinais de lesões por pragas, doenças ou qualquer outro tipo de injúria. Após serem destacadas da planta, as folhas foram colocadas em uma caixa de isopor a 4°C e transportadas até o Laboratório de Bioquímica da UFLA, onde retiraram-se os pecíolos e nervuras principais, cortando-as em pedaços de aproximadamente 1 cm². Em seguida, macerou-se o material cortado utilizando-se um almofariz e um pistilo resfriados a 4°C.

Após obter uma massa homogênea, adicionou-se o meio de extração (água) resfriado a 4°C, numa proporção definida em 1:3 (peso de folhas/volume de meio de extração) e colocou-se para extração do inibidor em um agitador orbital a 4°C sob agitação de 150 rpm por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a amostra foi levada à centrifuga por 10 minutos, 4°C e 10.000 x g. Após a centrifugação, descartou-se o sedimento e armazenou-se o sobrenadante, que foi utilizado nos ensaios de inibição.

2.2 Ensaio de inibição da atividade da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro

A atividade do inibidor de tripsina foi determinada a pela comparação entre um ensaio cinético (com pelo menos 4 períodos de tempo) da atividade de tripsina (Erlanger et al., 1961) do bicho-mineiro na presença e ausência do inibidor. Ensaios-controle, como o branco de substrato (atividade na ausência de enzima e inibidor), branco de enzima (atividade na ausência de substrato e inibidor), branco de inibidor (atividade na ausência de substrato e enzima) e a atividade de tripsina no extrato de mamona foram realizados da mesma maneira que os tubos experimentais. Os resultados foram expressos em unidades de tripsina inibida (UTI), que consiste no desaparecimento da absorção de luz correspondente a $1 \mu \text{ mol.L}^{-1}$ de p-nitroanilida (produto formado durante a atividade da tripsina sobre o substrato BapNA) durante 1 minuto de reação em 1 g de folha de mamona fresca.

A fim de se verificar a desnaturação do inibidor de tripsina presente nas folhas de mamona, foram realizados ensaios da tripsina de bicho-mineiro na presença de um extrato de folhas de mamona fervido durante cinco minutos, para verificar sua estabilidade quando submetido ao calor.

Como os inibidores de tripsina protéicos podem ser termorresistentes, outro tratamento foi realizado no extrato de folhas de mamona. Esse tratamento consistiu em adicionar beta mercaptoetanol 0,2% em solução e posterior fervura por 5 minutos. Esse tratamento foi realizado para verificar a desnaturação do inibidor de tripsina devido ao rompimento de pontes dissulfeto que poderiam conferir resistência térmica ao inibidor.

2.3 Ensaio de inibição da atividade da tripsina bovina

Testes com tripsina bovina purificada do fabricante MERCK (4 mg/200mL HCl 0,001 N) foram realizados da mesma forma que o ensaio descrito no item 2.2, mas em pH=7,0.

Esses testes foram realizados para se verificar a ação do inibidor de tripsina encontrado nas folhas de mamona sobre a tripsina de mamíferos.

2.4 Extração de enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda*

Como as lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro eram de difícil obtenção, utilizaram-se lagartas de *S. frugiperda*, a fim de se testar a ação inibitória do extrato de folhas de mamona sobre sua tripsina.

As lagartas foram coletadas em campo e colocadas sob gelo picado até ficarem imóveis (aproximadamente 10 minutos). Cortaram-se a cabeça e o ânus de cada lagarta e, com o auxílio de pinças, estiletes e tesouras, retiraram-se seus tegumentos, deixando apenas seus intestinos. Separou-se o intestino médio, descartando-se os intestinos anterior e posterior.

O intestino médio foi macerado em homogeneizador do tipo Potter na proporção de 1 intestino médio de *S. frugiperda* para 4 mL de água a 4°C. Após maceração, filtrou-se o homogeneizado em tela de nylon de 100 µm. Essa solução constituiu o extrato enzimático de *S. frugiperda*, utilizado como modelo nos ensaios de inibição de tripsina.

2.5 Purificação do inibidor

A purificação iniciou-se com procedimentos mais simples e massais, como precipitação por sulfato de amônio e por acetona, pois acreditava-se que o inibidor em questão era de natureza protéica, fato mais comum entre os inibidores de tripsina encontrados em plantas. Após verificar que o inibidor não era de natureza protéica, adotou-se um método de cromatografia de adsorção.

2.5.1 Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com sulfato de amônio

Utilizou-se sulfato de amônio saturado (solução 100%) a 4°C na proporção de 80% em solução em relação ao volume de extrato de mamona utilizado. Após precipitação, centrifugaram-se as soluções de extrato de mamona mais sulfato de amônio a 10.000 x g, por 10 minutos e a 4°C. Descartou-se, em seguida, o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em um volume de água a 4°C, igual ao volume inicial de extrato de folhas de mamona inicialmente colocado na solução com sulfato de amônio.

2.5.2 Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona

A precipitação com acetona procedeu-se da mesma maneira que a precipitação com sulfato de amônio (item 2.5.1), porém, utilizando-se acetona a -20°C e variando a proporção dessa de 10% a 80% em solução. O sedimento foi ressuspensão no mesmo volume de extrato e o sobrenadante foi evaporado em banho-maria a 37°C e ressuspensão em água no volume inicial de extrato de folhas de mamona colocado na solução com acetona a -20°C, a fim de verificar a presença do inibidor nesta fração.

2.5.3 Liofilização das folhas de mamona

Para o preparo da amostra colocada na coluna de cromatografia de adsorção, as folhas de mamona foram liofilizadas em Liofilizador Labconco Freeze Dry System/Freezone 4,5 até massa constante.

Após a liofilização, as folhas foram moídas utilizando almofariz e pistilo. O pó de folhas de mamona obtido após maceração foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado e protegido da luz sob temperatura

ambiente, até as análises. O processo de liofilização indicou uma umidade média de 70% nas folhas de mamona.

2.5.4 Montagem de uma coluna de cromatografia de adsorção

Utilizou-se uma coluna de vidro de 50 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. A sílica utilizada foi Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm; 230-400 mesh) do fabricante Merck.

A coluna foi preenchida com uma mistura pastosa composta por sílica e clorofórmio P.A. Essa “pasta” foi colocada na coluna tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Acima da sílica, adicionou-se terra diatomácea e, finalmente, acoplou-se uma bomba de pressão ao topo dessa coluna.

A amostra aplicada na coluna foi preparada adicionando-se 5 mL de metanol P.A. a 1 g de folhas de mamona liofilizadas, deixando a extração do inibidor ocorrer por 30 minutos em um agitador orbital a 150 rpm. Filtrou-se essa solução em papel de filtro e aplicou-se 1 mL desse extrato metanólico na coluna.

A série eluotrópica utilizada foi a seguinte: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol.

As frações coletadas tinham um volume aproximado de 100 mL e a troca de solventes ocorreu pela observação de manchas na coluna. Coletaram-se as diferentes manchas formadas de acordo com a eluição dos diferentes solventes em recipientes distintos.

2.5.4 Rotoevaporação das frações

Observou-se que o volume das frações obtidas na cromatografia era muito grande e possivelmente o inibidor estaria muito diluído, inviabilizando sua detecção. Dessa maneira, rotoevaparam-se as frações obtidas até que o

solvente da fração em questão fosse totalmente evaporado. Ressuspendeu-se o remanescente com 5 mL do solvente em questão, a fim de concentrar a fração.

Utilizaram-se as seguintes temperaturas de ebulição: hexano = 69°C; diclorometano = 40°C; acetato de etila = 77°C; etanol = 78°C; metanol = 65°C.

2.5.5 Teste de inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção

As frações obtidas em solventes apolares (hexano, diclorometano e acetato de etila) foram particionadas em água (5 mL) e utilizou-se a fase aquosa nos ensaios de inibição, pois, por experiências anteriores (dados não publicados), verificou-se que o inibidor apresenta grande afinidade por água e outros solventes polares. Já as frações ressuspensas em etanol e metanol foram utilizadas diretamente nos ensaios de inibição, realizando ensaios-controle na presença de metanol e etanol.

2.5.6 Espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de adsorção

A fim de se identificar qual molécula era responsável pela inibição da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, realizou-se a espectrometria de massas de frações que não inibiam a tripsina e de frações que inibiam a tripsina.

A espectrometria de massas foi realizada pelos processos Foto-Fenton e UV/H₂O₂ e foram analisados por LC/MS Trap (Agilent-1100). As amostras foram ionizadas com tampão formato de amônio pH 5,5 e inseridas no aparelho por infusão a um fluxo de 5 µL/min, com controle de carga no quadropolo (ICC) ajustado para 30000. A temperatura do gás de secagem (N₂) foi de 325°C e fluxo de 4 L min⁻¹, com potencial de extração de íons de -3500 V.

Esperava-se, com essa comparação, indicar a molécula responsável pela inibição mediante observação da presença da mesma molécula nas frações que inibiam a tripsina e sua ausência nas frações que não inibiam.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da inibição da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, de *S. frugiperda* e bovina por extratos de folhas de mamona

Utilizando o extrato de folhas de mamona, pôde-se observar a eficiência desse para inibir a tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro (FIGURA 11). O inibidor presente no extrato de folhas de mamona foi capaz de inibir a atividade da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, em média, 2,12 UTI/g de folhas frescas de mamona. Em termos percentuais, essa inibição representa aproximadamente 42% (FIGURA 12).

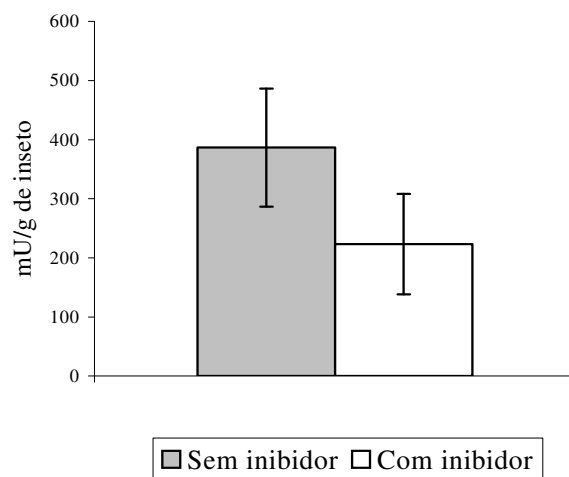


FIGURA 11. mU de tripsina por grama de inseto de bicho-mineiro na ausência e presença de extrato de folhas de mamona. Média e desvios-padrão obtidos com três repetições.

Os tratamentos que consistiam em ferver o extrato de folhas de mamona na presença e ausência de beta-mercaptoetanol 0,2%, a fim de se desnaturar o inibidor indicaram que a inibição se manteve mesmo após os tratamentos.

Com tais resultados, verifica-se que o inibidor de tripsina presente nas folhas de mamona seja uma molécula não-protéica, pois o tratamento com beta-mercaptoetanol 0,2% é suficiente para desnaturar todas as proteínas do extrato, mesmo as termoresistentes. Caso o inibidor fosse protéico, esse se desnaturaria e perderia sua função, não sendo possível observar a inibição nos extratos fervidos e fervidos com adição de beta-mercaptoetanol 0,2%.

O mesmo comportamento de inibição de tripsina pode ser observado para o lepidóptero *S. frugiperda*, cuja tripsina foi inibida em $414,01 \pm 135,11$ UTI/g de folha de mamona.

Esse valor representa aproximadamente 40% da tripsina de *S. frugiperda* inibida e é muito semelhante ao valor obtido para o bicho-mineiro do cafeeiro (FIGURA 12). A lagarta *S. frugiperda* foi utilizada como inseto-modelo para recuperação da atividade de tripsina nas frações obtidas na cromatografia de adsorção.

Já o teste de inibição de tripsina realizado com tripsina bovina na presença do extrato de folhas de mamona indicou que esse não apresenta propriedade inibitória sobre essa enzima, pois sua atividade foi recuperada em 100% nos ensaios de inibição (FIGURA 12).

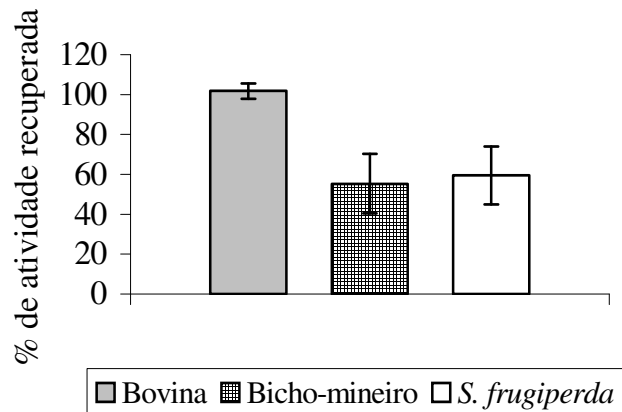


FIGURA 12. Porcentagem de atividade de tripsina recuperada nos ensaios de tripsina bovina, bicho-mineiro do cafeeiro e *S. frugiperda* na presença de extratos de folhas de mamona. Médias e desvios padrão obtidos com três repetições.

3.2 Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com sulfato de amônio

Após a precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com sulfato de amônio saturado na proporção de 80% em solução, verificou-se que a recuperação da atividade de tripsina de bicho-mineiro na presença do sedimento ressuspenso em água foi de 90%. Desse modo, pode-se concluir que o inibidor não está acompanhando as proteínas que sedimentam na presença do sulfato de amônio na proporção de 80% em solução.

3.3 Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona

A precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona a -20°C , variando a proporção de acetona de 10% a 80% em solução, indicou que o inibidor não apresenta as mesmas características das proteínas com relação à precipitação.

Nas faixas de precipitação nas quais se esperava menor quantidade de proteínas (sedimento de 10, 20, 30, 40 e 50% de acetona -20°C em solução), verificou-se maior inibição (FIGURA 13), ao passo que nas faixas de precipitação onde se esperava maior quantidade de proteínas (sedimento de 60, 70, 80%) verificou-se uma menor inibição da tripsina. A análise de inibição no sobrenadante mostrou que, conforme se aumenta a proporção de acetona -20°C em solução, maior a capacidade deste solvente solubilizar o inibidor (FIGURA 13).

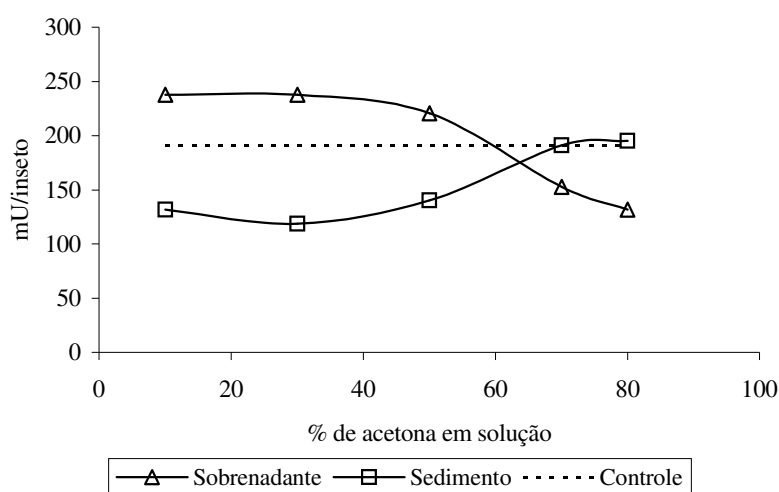


FIGURA 13. Atividade da tripsina de *S. frugiperda* (mU/inseto) no sedimento e no sobrenadante do extrato de folhas de mamona fracionado em diferentes proporções de acetona -20°C e no controle (extrato de folhas de mamona não fracionado). Médias obtidas com três repetições.

3.4 Análise da inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção

Ao se realizar o teste de inibição de tripsina na presença das frações provenientes dos solventes apolares hexano (frações 1, 2, 3 e 4) e diclorometano (frações de 5, 6, 7, 8 e 9), não se observou a propriedade de inibição de tripsina

de *S. frugiperda* (enzima-modelo de mesmo comportamento da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, conforme FIGURA 12). Porém, ao se realizar o teste de inibição da tripsina com as frações cujo eluente utilizado foi o acetato de etila, pôde-se diagnosticar a propriedade de inibição nas frações 10, 11 e 12, mas, na fração 13 do mesmo eluente, não se pôde observar o mesmo comportamento. A partir da fração 14 (eluição com etanol), outro pico de inibição de tripsina foi diagnosticado, sugerindo que podem existir duas moléculas diferentes envolvidas no processo de inibição (FIGURA 14).

Para verificar a estabilidade da molécula de inibidor de tripsina presente nas frações, realizou-se um teste de inibição de tripsina após 7 dias em relação ao primeiro teste. Como pode ser observado na FIGURA 14, o mesmo perfil de inibição de tripsina foi verificado após decorrido o tempo de avaliação. Não se testou a inibição de tripsina após 7 dias utilizando-se as frações anteriores à décima, pois pôde-se verificar que o inibidor de tripsina presente em extratos de folhas de mamona não tem afinidade por solvente apolares. Esse fato pode ser sustentado pelos dados não publicados (testes com extração do inibidor em água, etanol e metanol e partição com éter), que mostram que o inibidor de tripsina em questão apresenta grande afinidade por solventes polares em detrimento de solventes apolares.

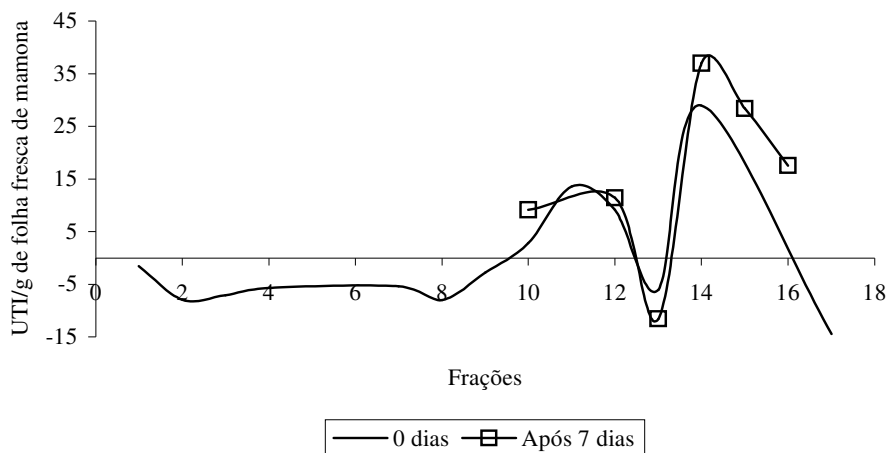


FIGURA 14. UTI (*S. frugiperda*) por grama de folha de mamona na presença das frações imediatamente após obtenção e após 7 dias.

3.5 Espectrometria de massas das frações obtidas

Na tentativa de se obter o peso molecular da substância responsável pela inibição da tripsina dos insetos utilizados, uma espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de adsorção foi realizada. Comparações realizadas entre as frações que apresentavam o poder de inibição de tripsina (frações 10, 11, 12, 14 e 15) com a fração que não apresentava o poder de inibição (fração número 13) não puderam sugerir o peso da molécula responsável pela inibição de tripsina presente no extrato de folhas mamona.

4 CONCLUSÕES

O inibidor de tripsina presente no extrato de folhas de mamona apresentou propriedades de inibição de tripsina de lepidópteros (bicho-mineiro do cafeeiro e *S. frugiperda*), mas não foi capaz de inibir a tripsina bovina.

O inibidor de tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro encontrado nas folhas de mamona é uma molécula não-protéica e termorresistente.

Os processos de purificação e detecção de massa molecular adotados não puderam sugerir o peso da molécula responsável pela inibição de tripsina.

Métodos cromatográficos com melhor poder de separação precisam ser realizados para, posteriormente, efetuar outros processos de identificação da molécula em questão.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUKE, S. O. **Natural pesticides from plants**. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-511.html>>. Acesso em: 23 jan. 2007.
- 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.
- GOMEZ-CABRONERO, J. et al. **Actions of protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride on neutrophil granule enzyme secretion and superoxide production induced by fMet-Leu-Phe and phorbol 12-myristate-13-acetate**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2551825&dopt=Abstract>. Acesso em: 27 nov. 2006.
- HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285–306, 1999.
- LEE, S. I.; LEE, S. H.; KOO, J. C.; CHUN, H. J.; LIM, C. O.; MUN, J. A.; SONG, Y. H.; CHO, M. J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Staal) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p.1-9, 1999.
- LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Ed.). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman and Hall, 1996. 486 p.
- MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J.; PHILIP, B.; WATSON, L. M.; LAING, W. A.; VOISEY, C. R.; WHITE, D. W. R. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: effects on larval development of *Spodoptera litura*. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 8, n. 5, p. 383-395, Oct. 1999.
- MEGYERY, P et al. **4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride attenuates tumor necrosis-factor- α -induced blood brain barrier opening**. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&epsidt=1876088>>. Acesso em: 27 nov. 2006.
- XU, D. P.; XUE, Q. Z.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. ^a; WA, T. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, transgenic rice

plants confers resistance to two major rice insects pests. **Molecular Breeding**,
Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 167-173, 1996.

5 CONCLUSÕES GERAIS

No presente estudo, pôde-se inferir que o ambiente digestivo do bicho-mineiro do cafeeiro é semelhante ao dos demais lepidópteros, já que os valores de pH ótimos encontrados são muito parecidos com os valores encontrados para outros lepidópteros.

Observou-se a inibição da tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro em aproximadamente 42% por um inibidor não-protéico e termorresistente.

6 PERSPECTIVAS

A utilização desse inibidor de tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro em folhas de mamona pode futuramente se consolidar em uma opção para que se realize o controle dessa praga mediante a incorporação desse inibidor numa planta de café utilizando técnicas de alteração molecular de plantas.

Dessa forma, o isolamento e a caracterização desse inibidor de tripsina são necessários para que os estudos sobre essa possibilidade avancem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO JARAMILLO, E. **Aspectos basicos sobre morfologia y fisiologia de insectos**. Manizales, Caldas: Universidad de Caldas, 1997. 293 p.
- AGRIANUAL - Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artes Médicas, 1997. 1294 p.
- ALVES, P. M. P. **Monitoramento da resistência do bicho-mineiro do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), a inseticidas, em Minas Gerais**. Viçosa, 1991. 57 p.
- ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Adipokinetic hormone-induced lipolysis in the fat body of an insect, *Manduca sexta*: synthesis of sn-1,2-diacylglycerols. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 38, n. 1, p. 68-76, Jan. 1997.
- BLUM, M. S. **Fundamentals of insect physiology**. New York: J. Wiley, 1985. 598 p.
- BOWN, D. P.; GATEHOUSE, J. A. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 271, n. 10, p. 2000-2011, May 2004.
- BRENNAN, Y. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 6, p. 3609-3617, June 2004.
- BROADWAY, R. M. Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, n. 7, p.2101-2113, July 1989.
- COLLINS, H. C. et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1997. 279 p.
- Del LAMA, M. A.; FERREIRA, K. M Genetic characterization of the peptidases of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **Brazilian Journal of Biology**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 2, p. 291-299, May 2003.

FRAGOSO, D. B. **Resistência e sinergismo a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)**. 2000. 35 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

HORN, D. J. **Biology of insects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1978. 439 p.

JANY, K.; HANG, H.; PFLEIDERER, G.; ISHAY, J. Enzymatic and Chemical Properties of an Endopeptidase from the Larva of the Hornet *Vespa crabro* **Biochemistry**, Washington, v. 17, n. 22, p. 4675-4682, 1978

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 887-900, Nov. 1997.

LEE, S. H.; KOO, J. C.; CHUN, H. J.; LIM, C. O.; MUM, J. H.; SONG, Y. H.; CHO, M. J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Staal) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1999.

LEHNINGER, A. et al. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

MARANA, S. R.; JACOBS-LORENA, M.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive L-glycosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1545, n. 1/2, p. 41-52, Feb. 2001.

McMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J.; PHILIPS, B.; WATSON, L. M.; LAING, W. A.; VOISEY, C. R.; WHITE, D. W. R. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: Effects on larval development of *Spodoptera litura*. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 8, n. 5, p. 383-395, Oct. 1999.

MERCK & Co. Resource library. Disponível em:
<http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands.jspzQzpgzEzzSzppdocszSzuszSzcommonzSzdorlandzSzsdorlandzSzmd c 72zPzhtm>. Acesso em: 14 dez. 2006.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, v. 176, n. 1, p. 1-15, Jan. 2006.

MEYER, J. R. ENT 425 Home Page. Disponível em:
<<http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/index.html>>. Acesso em: 09 nov. 2006.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 4. ed. Chichester: Wiley, 2004. 357 p.

MORAES, J. C. **Pragas do cafeeiro: importância e métodos alternativos de controle**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1997. 59 p. (Curso de Especialização Pós-Graduação "Lato Sensu" por tutoria à distância: Cafeicultura Empresarial: produtividade e qualidade).

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

OLIVERIA NETO, A.; BATISTA, J. A. N.; RIGDEN, D. J.; FRAANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; MONTEIRO, A. C.; S.; MONNERAT, R. G. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the Cotton Boll Weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 1235-1242, June 2004.

OLSEN, J. V.; ONG, S. E.; MANN, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 3, n. 6, p. 608-614, June 2004.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. Brasília: CNPq, 1991. 359 p.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. MEROPS: The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n 1, p. 325-331, Jan. 1999.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C. Pragas do cafeeiro. In: **Simpósio sobre fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**, 1. , Poços de Caldas, MG, 1986. 447 p.

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.; TERRA, W. R. Midgut α -glucosidase e β -frutosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 819-824, 1986.

SANTOS, C. D. **Fisiologia e bioquímica da digestão em *Erinnyis ello*** (Lepidoptera: Sphingidae). São Paulo, 1985. 178 p.

SCOTT, R. P. W. **Liquid chromatography**. Disponível em: <<http://www.chromatography-online.org/HPLC/Stationary-Phases/Silica-Gel/rs41.html>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

SEIDMAN, L.; MOWERY, J. **Salting out: Ammonium Sulfate Precipitation**. Disponível em: <http://matcmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter_4/section4_2.htm>. Acesso em: 27 nov. 2006

SOUZA, J. C et al. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. 2. ed. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, 1998. (EPAMIG. Boletim Técnico, n. 54).

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

TERRA, W. R.; VALENTIN, A.; SANTOS, C. D. Utilization of sugars, hemicellulose, starch, protein, fat and minerals by *Erinnyis ello* larvae and the digestive role of their midgut hydrolases. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1143-1147, 1987.

TERRA, W. R.; WALTER, R.; COSTA, R. H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 255-269, June 2005.

TERRA, W. R. et al. Digestive enzymes. In: LEHANE M. J. (Ed.). **Billin**. London: Chapman and Hall, 1996. p. 153-194.

URSIC BEDOYA, R. J. et al. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti* **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 89-94, 2005.

USCIAN, J. M.; BEGOYA, R. J. U.; MITZEY, A. M.; OBRAZTSOVA, M.; LOWENBERGER, C. Phospholipase A₂ activity in the fat body of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 187-201, Jan. 1993.

VOET, D. et al. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 200. 931 p.

WANG, N. S. **Enzyme purification by acetone precipitation**. Disponível em: <<http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab6b.htm>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

WATANABE, H.; NAKAMURA, M.; TOKUDA, G.; YAMOAKA, I.; SCRIVENER, A. M.; NODA, H. Site of Secretion and Properties of Endogenous Endo-1,4-Glucanase Components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese Subterranean Termite. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 305-313, Apr. 1997.

WEGENER, G. et al. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 1233-1240, 2003.

WIGGLESWORTH, V. B. **Insect physiology**. 7. ed. London: Chapman and Hall, 1974. 166 p.

XU, D.; XUE, Q. Z.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, transgenic rice plants confers resistance to two major rice insects pests. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 167-173, 1996.