



ARTIGO ORIGINAL

## Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática de *Coccus viridis* em *Coffea arabica*

### *Effect of protease inhibitors in the enzymatic activity of Coccus viridis in Coffea arabica*

Cristian Yizard Lizardo Chávez<sup>1\*</sup>   
Gláucia Cordeiro<sup>1</sup>   
Carolina Rocha da Silva<sup>1</sup>   
Camila Rocha da Silva<sup>2</sup>   
Wellington Garcia Campos<sup>3</sup>   
Maria Goreti de Almeida Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida P. H. Rolfs, s/n, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Rio Paranaíba, Km 7, Zona Rural, MG-230, Rodoviário, s/n, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), Praça Dom Helvécio, 74, 36301-160, São João Del-Rei, MG, Brasil

\*Autor Correspondente:  
E-mail: malmeida@ufv.br

#### PALAVRAS-CHAVE

Cafeeiro  
Cochonilha-verde  
Benzamidina  
Berenil

#### KEYWORDS

Coffee tree  
Cochineal-green  
Benzamidine  
Berenyl

**RESUMO:** A cultura do café no Brasil tem muita importância econômica e relevância no setor social. É possível que as injúrias causadas pelo inseto *Coccus viridis* (cochonilha-verde) seja um dos motivos da redução de sua produtividade. As plantas, ao serem injuriadas, são capazes de aumentar a síntese de inibidores de proteases (IPs) por toda sua extensão. Estudos demonstraram que insetos alimentados com plantas previamente pulverizadas com inibidores sintéticos têm seu desenvolvimento afetado. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos inibidores de proteases sintéticos, benzamidina e berenil, sobre a atividade proteolítica intestinal de *C. viridis*. Plantas de *Coffea arabica* foram infestadas com ninfas de *C. viridis* e pulverizadas com benzamidina e berenil, em quatro diferentes concentrações: 0; 0,25%; 0,5% e 0,75% (p/v). A resposta bioquímica do inseto foi avaliada após 24 horas da pulverização, coletando-se os insetos. A atividade das serino-proteases tripsina-like (amidásica e esterásica) e quimotripsina-like esterásica foi reduzida pela presença dos inibidores. O mesmo se obteve em relação à atividade das cisteíno-proteases.

**ABSTRACT:** The coffee culture in Brazil has much economic importance and relevance in the social sector. One of the possible reductions of its productivity is due to the injury caused by the insect *Coccus viridis* (cochineal-green). The plants when being injured are able to increase the synthesis of protease inhibitors (PIs) throughout their extension. Studies have shown that insects fed with plants previously sprayed with synthetic inhibitors have their development affected. Thus, the present work aimed to evaluate the effects of synthetic protease inhibitors, benzamidine and berenil, on the intestinal proteolytic activity of *C. viridis*. *Coffea arabica* plants were infested with *C. viridis* nymphs and sprayed with benzamidine and berenil in four different concentrations: 0; 0.25%; 0.5% e 0.75% (p/v). The insect's biochemical response was evaluated after 24 h of spraying, and the insects were collected. The activity of the serine proteases, trypsin-like (amidásica and esterásica) and chymotrypsin-like esterase, was reduced due to the presence of the inhibitors. The same was obtained in relation to the activity of cysteine proteases.

## 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de café (*Coffea arabica*), podendo atingir a produção anual de 50,92 milhões de sacas beneficiadas (Conab, 2019). Sua produtividade pode ser reduzida devido às injúrias causadas pela cochonilha-verde, *Coccus viridis*, identificada por Green em 1889 (*Coccidae*) (Lepelley, 1968). Esse inseto pode estar presente ao longo de todo o desenvolvimento da cultura. Durante sua alimentação, os adultos e as ninfas injetam toxinas no tecido vascular das plantas, ocasionando hipertrofia das células cambiais, com colapso das células do floema (Pedigo & Rice, 2005).

A defesa de plantas contra insetos é um processo complexo que envolve a ativação ou repressão de diferentes vias de sinalização permitindo a superexpressão de genes-alvo com propriedades defensivas (Carrillo et al., 2011). Um dos principais grupos de proteínas induzidos depois da exposição da planta ao inseto é o dos inibidores de proteases (IPs), que atuam no intestino dos insetos (Carrillo et al., 2011; Lawrence & Koundal, 2002; Meriño-Cabrera et al., 2018). Assim, a inibição de proteases diminuirá a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto, podendo acarretar até sua morte (Vila et al., 2005). Essas consequências já foram relatadas para lagartas – *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Mendonça et al., 2012) – que consumiram alimentos com presença de inibidores (Marinho-Prado et al., 2012; Paixão et al., 2013).

Benzamidina é um inibidor sintético de tripsina, que vem sendo utilizado para estudar a resposta de insetos a inibidores de proteases na dieta (Pilon et al., 2006). Outro inibidor sintético é o berenil, que é uma bis-benzamidina, sendo também inibidor de enzimas do tipo tripsina (Oliveira et al., 1993).

Há estudos apenas das culturas de soja, goiaba e eucalipto avaliando o efeito desses inibidores sintéticos sobre suas pragas (Marinho et al., 2010; Marinho-Prado et al., 2012; Paixão et al., 2013). Devido aos resultados positivos dessas pesquisas, à importância do café no Brasil e à cochonilha-verde ser uma praga potencial dessa cultura, existe a necessidade de compreendermos melhor o mecanismo de interação entre esse inseto e essa cultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos inibidores de proteases sintéticos, benzamidina e berenil, sobre a digestibilidade proteica de *C. viridis*, após a aplicação desses inibidores sobre as plantas de café.

## 2 Material e Métodos

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

Mudas de café de *C. arabica* da variedade catuaí vermelho, de seis meses de idade, foram obtidas no banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Café/UFV e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia/UFV.

Ninfas e adultos de *C. viridis* foram coletadas em folhas de café das plantações do banco de germoplasma e criadas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia/UFV, de acordo com a metodologia de Rosado et al. (2014). As ninfas foram transferidas para folhas do café catuaí vermelho, isentas de pragas e doenças. Posteriormente, foram colocadas no interior de uma

gaiola (1,0 m x 0,5 m x 1,0 m) telada com organza branca, sobre uma bancada de madeira a uma altura de um metro do solo, onde ficaram protegidas de predadores e parasitoides.

As concentrações de inibidores sintéticos testadas foram baseadas em estudos com insetos mastigadores. Já a solução de Triton X-100 0,005% (v/v) (diluído em água destilada) foi utilizada para aumentar a aderência da solução à folha (Paixão et al., 2013).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições (plantas) e sete tratamentos, os quais foram aplicados sobre as plantas com os insetos. Os tratamentos foram as seguintes soluções aquosas: T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidina 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamidina 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamidina 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v).

Para a avaliação, as plantas foram expostas ao ataque dos herbívoros por sete dias. Depois, com as ninfas nas folhas, realizou-se a pulverização da solução inibidora (150 mL para cada tratamento) utilizando um pulverizador de plástico de pressão manual (Marinho-Prado et al., 2012). Essa pulverização foi realizada às 8 h, quando as folhas do cafeeiro não apresentavam condições como dureza da cutícula foliar, estomas fechados e estado iônico da folha, que dificultariam a penetração do inibidor (Malavolta, 1980).

As atividades das enzimas digestivas da cochonilha-verde foram avaliadas com 30 ninfas de segundo e terceiro instar coletadas nas folhas e armazenadas em microtubos (1,5 mL). As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e levadas para o laboratório, onde foram mantidas a -80 °C, para análises posteriores. As coletas das amostras foram feitas 24 horas depois da pulverização dos IPs.

Para o extrato enzimático, os insetos foram macerados inteiros, com bastão de vidro estéril, adicionado 1 mL de solução HCl 10-3 M e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C (Oliveira et al., 2005). O sobrenadante, extrato bruto, foi utilizado para análises.

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) na faixa de concentração de 0 a 25 mg mL<sup>-1</sup> para obter a curva padrão. A atividade amidásica de tripsina-like foi determinada segundo o método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se o substrato cromogênico L-BApNA (N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl<sub>2</sub> 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu em 400  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500  $\mu$ L de substrato e 100  $\mu$ L de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático, a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilina, coeficiente de extinção molar de 8800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. A partir dos valores da absorbância calcularam-se as atividades de formação dos produtos. A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades ( $\mu$ M s<sup>-1</sup>) pela concentração de proteína (mg mL<sup>-1</sup>).

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

mistura reacional consistiu em 450  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; 500  $\mu\text{L}$  de substrato e 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático, a absorbância da amostra foi obtida a 247 nm por 2,5 minutos, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A partir dos valores de absorbância calcularam-se as atividades de formação dos produtos em  $\mu\text{M s}^{-1}$ . A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades ( $\text{M s}^{-1}$ ) pela concentração de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e convertidas a  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína.

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

Realizou-se a atividade amidásica de cisteino-proteases pelo método descrito por Erlanger et al. (1961) com modificações conforme Mendonça et al. (2012), utilizando-se 500  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico L-BapNA na concentração final de 0,5 mM, a 25 °C e 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 5 mM de DTT (1,4-ditiotreitol), para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Em 50  $\mu\text{L}$  de extrato foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inibidor de serino-proteases benzamida na concentração final de 1 mM, a qual corresponde ao  $\text{K}_i$  de inibição de tripsinas-*like* por benzamida. A reação foi realizada durante 2,5 minutos com leitura de absorbância a 410 nm a cada 30 s. Para a determinação

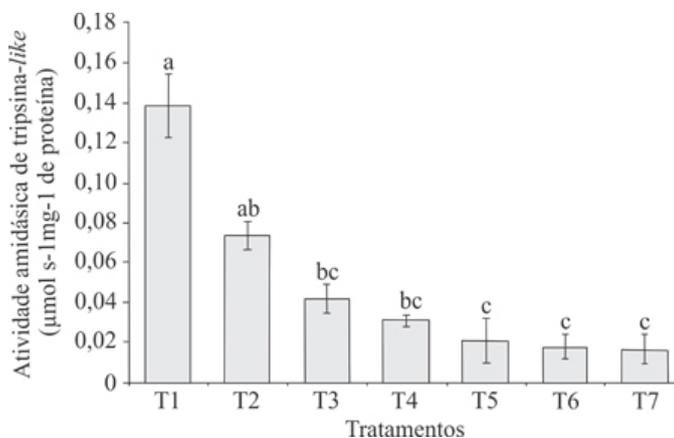
da atividade, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, p-nitroanilina, 8800  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A partir dos valores de absorbância, calcularam-se as atividades de formação dos produtos em  $\text{M s}^{-1}$ . A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades ( $\text{M s}^{-1}$ ) pela concentração de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e convertidas a  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Determinou-se a atividade proteásica segundo o método descrito por Tomarelli et al. (1949), utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 a 37 °C. A mistura reacional consistiu em 50  $\mu\text{L}$  de substrato e 60  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 240  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10% (p/v). Após a parada de reação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Para remoção das proteínas precipitadas, tubos plásticos de 2 mL contendo as amostras foram centrifugados a 8000g por 5 minutos a 25 °C. Uma alíquota de 240  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. As absorbâncias foram determinadas a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas totais expressadas em  $\text{mg mL}^{-1}$  para a obtenção da atividade específica. Todas as análises do experimento foram realizadas em triplicatas.

Em todas as análises foram verificadas as pressuposições para análise de variância (ANOVA). Quando necessário, após a ANOVA (teste F a 5% de significância), aplicou-se teste Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Realizaram-se os procedimentos estatísticos pelo software estatístico R version 3.0.2 (R Core Team, 2013).

### 3 Resultados e Discussão

Na atividade amidásica de tripsina-*like*, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas. O controle foi significativamente diferente dos demais, com exceção do tratamento benzamida 0,25%, enquanto aos tratamentos benzamida 0,50%, 0,75% e berenil 0,25%, 0,50% e 0,75% não apresentaram diferenças significativas entre eles (Figura 1).

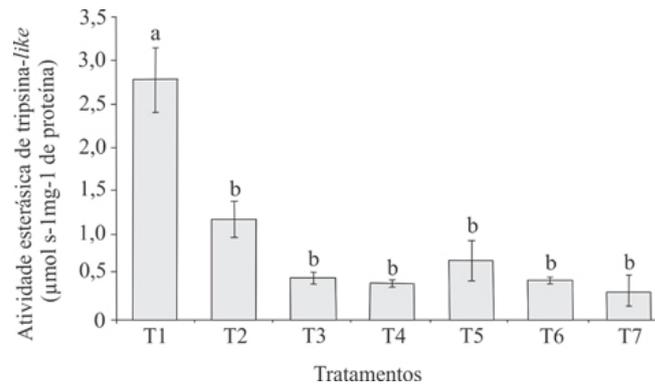


**Figura 1.** Atividade amidásica de tripsina-*like* ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos (soluções aquosas), pulverizados sobre plantas com insetos – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamida 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamida 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamida 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v). Médias ( $\pm$  desvio-padrão; n = 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Figure 1.** Tripisin-*like* amidase activity ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  protein) for *Coccus viridis* under different treatments (aqueous solutions) sprayed on insect plants – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidine 0.25% (w/v); T3: Triton X-100 + benzamidine 0.50% (w/v); T4: Triton X-100 + benzamidine 0.75% (w/v); T5: Triton X-100 + berenyl 0.25% (w/v); T6: Triton X-100 + berenyl 0.50% (w/v); T7: Triton X-100 + berenyl 0.75% (w/v). Mean ( $\pm$  standard deviation; n = 3) of the treatments followed by the same letter did not differ among them by the Tukey test at 5% of significance

Houve diferença estatística entre os tratamentos com inibidores e o controle para a atividade esterásica da enzima

tripsina-like (Figura 2). Verificou-se ainda que, para os dois tipos de inibidores, não houve diferença estatística entre eles.

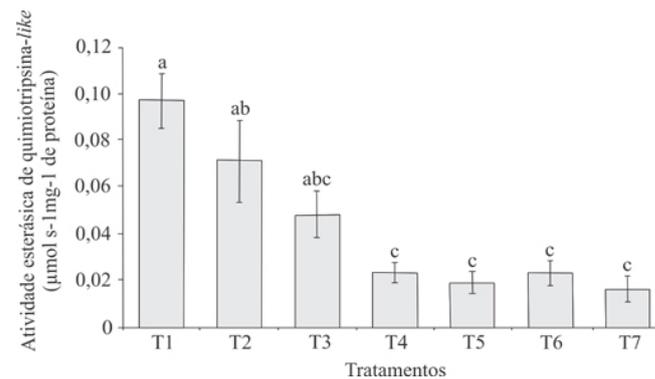


**Figura 2.** Atividade esterásica de tripsina-like ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos (soluções aquosas), pulverizados sobre plantas com insetos – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidina 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamidina 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamidina 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v). Médias ( $\pm$  desvio-padrão; n = 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Figure 2.** Tripisin-like ester activity ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  protein) for *Coccus viridis* under different treatments (aqueous solutions) sprayed on insect plants – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidine 0.25% (w/v); T3: Triton X-100 + benzamidine 0.50% (w/v); T4: Triton X-100 + benzamidine 0.75% (w/v); T5: Triton X-100 + berenyl 0.25% (w/v); T6: Triton X-100 + berenyl 0.50% (w/v); T7: Triton X-100 + berenyl 0.75% (w/v). Mean ( $\pm$  standard deviation; n = 3) of the treatments followed by the same letter did not differ among them by the Tukey test at 5% of significance

Para a atividade esterásica de quimotripsina-like, a atividade do tratamento-controle foi igual aos tratamentos benzamidina 0,25% e 0,50%. Já os tratamentos benzamidina

0,50% e 0,75% apresentaram os mesmos níveis de atividade dos tratamentos com berenil em todas as concentrações utilizadas (Figura 3).



**Figura 3.** Atividade esterásica de quimotripsina-like ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos (soluções aquosas), pulverizados sobre plantas com insetos – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidina 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamidina 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamidina 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v). Médias ( $\pm$  desvio-padrão; n = 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Figure 3.** Chymotrypsin-like ester activity ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  protein) for *Coccus viridis* under different treatments (aqueous solutions) sprayed on insect plants – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidine 0.25% (w/v); T3: Triton X-100 + benzamidine 0.50% (w/v); T4: Triton X-100 + benzamidine 0.75% (w/v); T5: Triton X-100 + berenyl 0.25% (w/v); T6: Triton X-100 + berenyl 0.50% (w/v); T7: Triton X-100 + berenyl 0.75% (w/v). Mean ( $\pm$  standard deviation; n = 3) of the treatments followed by the same letter did not differ among them by the Tukey test at 5% of significance

As atividades das serino-proteases, em geral, apresentaram um comportamento similar em todos os tratamentos, em que o tratamento-controle apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos benzamidina 0,75% e berenil 0,25%, 0,50% e 0,75%.

Os resultados sugerem que o berenil foi mais eficiente que a benzamidina na inibição da atividade das serino-proteases. Berenil, mesmo na menor concentração usada, reduziu a atividade

enzimática na mesma proporção que a maior concentração usada para benzamidina. Observou-se que, para berenil, a inibição também não foi proporcional à dosagem utilizada, sendo a concentração de 0,25% tão eficaz quanto a 0,75%.

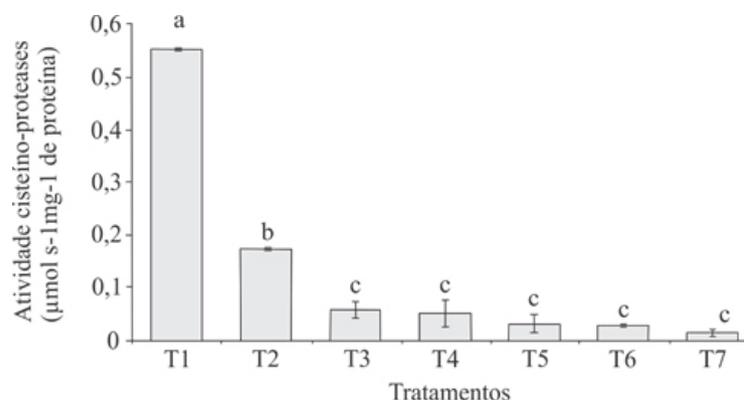
Esses resultados podem ser explicados devido ao mecanismo de ação dos inibidores sintéticos e sua capacidade de formar complexos estáveis com as proteases-alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima. A benzamidina,

composta por uma só molécula de mesmo nome, se posiciona no sítio de especificidade, sítio S1, da tripsina. Por sua vez, por apresentar uma ligação diazo entre dois anéis aminobenzamidínicos, o berenil é um potente inibidor parcialmente competitivo, com comportamento parabólico semelhante à tripsina. Berenil se liga ao centro ativo como inibidor competitivo da tripsina, bem como ao seu centro ativo secundário, exibindo um comportamento inibitório parcialmente competitivo com o substrato (Junqueira et al., 1992; Oliveira et al., 1993).

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

Os efeitos do berenil e benzamidina nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras e em alguns trabalhos, tais como: incorporando na dieta artificial dos insetos (Pilon et al., 2006), pulverização direta sobre a planta (Marinho-Prado et al., 2012; Paixão et al., 2013) e pela expressão em plantas transgênicas (Maheswaran et al., 2007; Steppuhn & Baldwin, 2007). Mas os trabalhos dos autores mencionados foram feitos com insetos mastigadores. Fica também evidente neste trabalho que os inibidores de proteases sintéticos podem causar efeitos deletérios sobre a atividade proteolítica em *C. viridis*, que é inseto sugador da ordem Heteroptera.

Para atividade de cisteíno-proteases, o controle foi estatisticamente superior aos demais tratamentos. A dosagem de benzamidina 0,25%, exceto para o controle, apresentou maior atividade que as outras concentrações de IPs. Os tratamentos benzamidina 0,50%, 0,75% e berenil 0,25%; 0,50% e 0,75% apresentaram o mesmo nível de inibição para cisteíno-proteases (Figura 4).



**Figura 4.** Atividade esterásica de cisteíno-proteases ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos (soluções aquosas), pulverizados sobre plantas com insetos – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidina 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamidina 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamidina 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v). Médias ( $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ ) dos tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

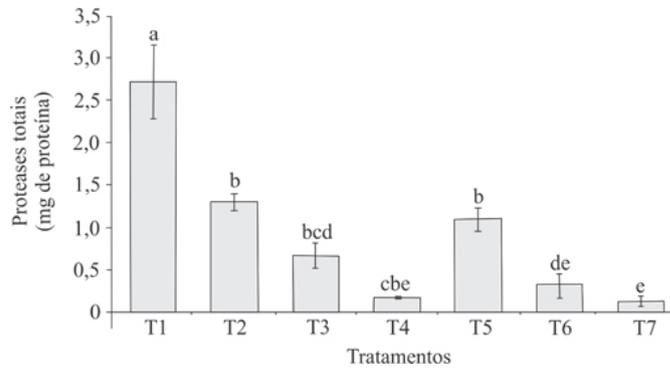
**Figure 4.** Esterase activity of cysteine proteases ( $\mu\text{mol s}^{-1}\text{mg}^{-1}$  protein) for *Coccus viridis* under different treatments (aqueous solutions) sprayed on insect plants – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidine 0.25% (w/v); T3: Triton X-100 + benzamidine 0.50% (w/v); T4: Triton X-100 + benzamidine 0.75% (w/v); T5: Triton X-100 + berenyl 0.25% (w/v); T6: Triton X-100 + berenyl 0.50% (w/v); T7: Triton X-100 + berenyl 0.75% (w/v). Mean ( $\pm$  standard deviation;  $n = 3$ ) of the treatments followed by the same letter did not differ among them by the Tukey test at 5% of significance

Em semelhança com os resultados das serino-proteases, o berenil foi mais eficiente que a benzamidina na inibição da atividade das cisteíno-proteases, uma vez que o berenil acopla tanto no sítio ativo S1 como no sítio ativo S2, o que potencializa seu efeito inibitório, menores concentrações foram testadas e inibiram a atividade enzimática na mesma magnitude que as duas maiores concentrações usadas para benzamidina. Além disso, a inibição produzida por este inibidor não foi proporcional à dosagem usada, uma vez que a concentração de 0,25% foi tão eficaz como a de 0,75%. Assim, podemos considerar que a dosagem de berenil a 0,25% foi a mais eficiente.

A atividade de cisteíno-proteases no intestino de *C. viridis* foi afetada negativamente pela presença da benzamidina e do berenil. Esse fato não era esperado, uma vez que esses inibidores são competitivos de serino-proteases, como já

descrito em estudos com tripsina-like usando benzamidina em *A. gemmatilis* (Paixão, 2013; Xavier et al., 2005), *T. leucoceraea* (Marinho-Prado et al., 2012), *Locusta migratoria* (Lam et al., 2000), *Rhyzopertha dominica* (Zhu & Backer, 1999), *Sesamia nonagrioides* (Novillo et al., 1999) e *Ostrinia nubilalis* (Bernardi et al., 1996). Em contrapartida, o trabalho realizado com berenil e *Thyrinteina arnobia* apresentou diminuição na atividade específica de cisteíno-proteases (Marinho-Prado et al., 2012), corroborando com o nosso resultado.

A atividade de proteases totais nas cochinilhas do tratamento-controle apresentou maior atividade em relação aos demais. Os tratamentos benzamidina 0,25%, 0,50% e berenil 0,25% foram estatisticamente iguais, enquanto os tratamentos com concentrações de benzamidina 0,75% e berenil 0,50% e 0,75% não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 5).



**Figura 5.** Atividade de proteases totais (mg de proteína) para *Coccus viridis* sob os diferentes tratamentos (soluções aquosas), pulverizados sobre plantas com insetos – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamida 0,25% (p/v); T3: Triton X-100 + benzamida 0,50% (p/v); T4: Triton X-100 + benzamida 0,75% (p/v); T5: Triton X-100 + berenil 0,25% (p/v); T6: Triton X-100 + berenil 0,50% (p/v); T7: Triton X-100 + berenil 0,75% (p/v). Médias ( $\pm$  desvio-padrão; n = 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Figure 5.** Activity of total proteases (mg of protein) for *Coccus viridis* under different treatments (aqueous solutions) sprayed on insect plants – T1: Triton X-100; T2: Triton X-100 + benzamidine 0.25% (w/v); T3: Triton X-100 + benzamidine 0.50% (w/v); T4: Triton X-100 + benzamidine 0.75% (w/v); T5: Triton X-100 + berenyl 0.25% (w/v); T6: Triton X-100 + berenyl 0.50% (w/v); T7: Triton X-100 + berenyl 0.75% (w/v). Mean ( $\pm$  standard deviation; n = 3) of the treatments followed by the same letter did not differ among them by the Tukey test at 5% of significance

Assim como ocorreu com a atividade de serino-proteases e cisteíno-proteases, os menores valores de atividade de proteases totais foram nos tratamentos com a aplicação dos IPs benzamida e berenil (Figura 5), podendo afetar negativamente a fisiologia do inseto. A atividade de proteases totais não apresentou diferença entre os IPs benzamida e berenil nas diferentes dosagens avaliadas.

## 4 Conclusão

Os inibidores sintéticos benzamida e berenil foram eficientes na inibição da atividade proteolítica das cochonilhas-verdes ao serem pulverizados nas plantas de *Coffea arabica*, como demonstrando pela redução de atividade nas serino-proteases e cisteíno-proteases. Sendo *C. viridis* um inseto sugador pertencente a um grupo de insetos de importância econômica, é recomendável fazer estudos com outras pragas dessa ordem usando inibidores sintéticos de proteases.

## Referências

BERNARDI, R.; TEDESCHI, G.; RONCHI, S.; PALMIERI, S. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: pyralidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 26, n. 8-9, p. 883-889, 1996.

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

CARRILLO, L.; HERRERO, I.; CAMBRA, I.; SANCHEZ-MOGNE, R.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 49, p. 1191-1200, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – Embrapa. *Acompanhamento da Safra Brasileira – Café*. Safra 2019. Brasília, DF: Conab, 2019. 61 p.

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

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 9, p. 873-887, 1992.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 85-94, 2000.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 93-109, 2002.

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

MAHESWARAN, G.; PRIDMORE, L.; FRANZ, P.; ANDERSON, M. A. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Reports*, New York, v. 26, n. 6, p. 773-782, 2007.

MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MARINHO, J. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; PALLINI-FILHO, A.; OLIVEIRA, J. A. Resposta bioquímica de *Thyrntina leucoceraea* a inibidor de proteases em plantas de goiaba. *Idesia*, Arica, v. 28, p. 101-109, 2010.

MARINHO-PRADO, J. S.; LOURENCAO, A. L.; GUEDES, R. N. C.; PALLINI-FILHO, A.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Enzymatic response of the eucalypt defoliator *Thyrntina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) to a bis-benzamidine proteinase inhibitor. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 41, n. 5, p. 420-425, 2012.

MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA M. G. A.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the

- velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* (Hübner)). *Journal of Pest Science*, New York, v. 85, n. 1, p. 117-123, 2012.
- MERIÑO-CABRERA, Y.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, R. S.; SOLIS-VARGAS, M.; CORDEIRO, G.; RAINHA, F. R.; CAMPOS, W. G.; PICANÇO, M. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. *Annals of Applied Biology*, Hoboken, v. 172, n. 2, p. 236-243, 2018.
- NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 177-184, 1999.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(pbenzamidino)-azo-beta-trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 268, n. 36, p. 26893-26903, 1993.
- OLIVEIRA, M. G. A.; SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2005.
- PAIXÃO, G. P.; LOURENÇÃO, A. L.; SILVA, C. R.; MENDONÇA, E. G.; SILVA, P. L.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 61, n. 34, p. 8034-8038, 2013.
- PEDIGO, L. P.; RICE, M. E. *Entomology and pest management*. 5th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2005. 784 p.
- PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 23-29, 2006.
- POMPERMAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Hoboken, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001.
- ROSADO, J. F.; BACCI, L.; MARTINS, J. C.; SILVA, G. A.; GONTIJO, L. M.; PICANÇO, M. C. Natural biological control of green scale (Hemiptera: Coccidae): a field life-table study. *Biocontrol Science and Technology*, Abingdon, v. 24, n. 2, p. 190-202, 2014.
- STEPPUHN, A.; BALDWIN, I. T. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters*, Hoboken, v. 10, n. 6, p. 499-511, 2007.
- TOMARELLI R. M.; CHARNEY J.; HARDING M. L. The use of azocasein as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *Journal Laboratory Clinical Medical*, Amsterdam, v. 34, p. 428-433, 1949.
- VILA, L.; QUILIS, J.; MEYNARD, D.; BREITLER, J. C.; MARFÀ, V.; MURILLO, I.; SAN SEGUNDO, B. Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal*, Hoboken, v. 3, n. 2, p. 187-202, 2005.
- XAVIER, L. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, A. V.; DE SIMONE, S. +G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology*, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 147, 2005.
- ZHU, Y.; BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 29, n. 12, p. 1053-1063, 1999.

**Contribuição dos Autores:** Cristian Yizard Lizardo Chávez realizou os experimentos e a escrita científica; Gláucia Cordeiro contribuiu com a revisão bibliográfica e a escrita científica; Carolina Rocha da Silva contribuiu com a escrita científica e a revisão gramatical; Camila Rocha da Silva contribuiu com a avaliação do trabalho na área de bioquímica e escrita científica; Welligton Garcia Campos contribuiu com a escrita científica e a revisão do manuscrito; Maria Goreti de Almeida Oliveira orientou o trabalho e supervisionou as etapas descritas anteriormente.

**Agradecimentos:** Ao Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP) pelo suporte financeiro.

**Fontes de Financiamento:** Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP).

**Conflito de Interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.