

Efeitos tóxicos do tegumento de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*

LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
ABRIL- 2017

Efeitos tóxicos do tegumento de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*

LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia (Biologia celular).

Orientadora: Dr^a Antonia Elenir Amâncio Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
ABRIL- 2017

Efeitos tóxicos do tegumento de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*

LEONARDO FIGUEIRA REIS DE SÁ

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia (Biologia celular).

Aprovada em: / /

Comissão examinadora:

Dr. Evenilton Pessoa Costa LQFPP-CBB-UENF

Dr^a Valdirene Moreira Gomes LFBM-CBB-UENF

Dr^a. Luciana Belarmino da Silva IFF (Campos)

Dr. Antonia Elenir Amâncio Oliveira
Orientadora

Dedico essa conquista aos meus amados pais, Paulo e Rita, pois sem eles nada disso seria possível!



Centro de Biotecnologia e Biotecnologia

Foto: Mauricio Falcão Aguiar

VENI, VIDI, VICI

Caio Júlio César

Agradecimentos

A caminhada foi longa e árdua, em muitos momentos me senti perdido e com medo de todos os obstáculos que foram surgindo durante esses quatro anos, mas sempre nos momentos em que mais precisei, tive pessoas que sempre me levantavam e me faziam sentir confiante e acreditar que tudo ia dar certo. Sendo assim, não poderia deixar de registrar a minha gratidão para com vocês.

Agradeço a Deus pela sua força e presença em todos os momentos, principalmente naqueles em que os problemas pareciam sem solução.

Aos meus pais Rita e Paulo por todo esforço destinado a minha formação moral e profissional. Obrigado por acreditarem em meu potencial e sempre me darem força para persistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora Antonia Elenir Amâncio Oliveira por ter acreditado em meu potencial e me orientado nessa tese. Agradeço também por ser minha segunda mãe, pelos puxões de orelha e por sempre ter os conselhos mais sábios.

A minha namorada Amanda, por todo carinho, compreensão, companheirismo e pelas palavras de calma nos meus momentos de turbulência.

Aos amigos do LQFPP, por todos os momentos de aprendizado, companheirismo e descontração.

As intuições de fomento, FAPERJ, CNPQ e UENF, por todo apoio financeiro.

E a todos vocês que participaram direta e/ou indiretamente desse trabalho deixo aqui o meu **MUITO OBRIGADO!**

Índice

Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
1- Introdução	1
1.1- Insetos	2
1.1.1- <i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)	2
1.1.2-Ovogênese em Insetos	4
1.1.3-Desenvolvimento embrionário de insetos	5
1.1.4-Desenvolvimento pós embrionário	9
1.1.5-Digestão em Insetos	11
1.2-Sementes	14
1.2.1-Tegumento de sementes como barreira química de defesa	15
2- Objetivos	19
2.1-Objetivo geral	19
2.2-Objetivos específicos	19
3- Materiais e Métodos	20
3.1-Sementes	20
3.2-Insetos	20
3.3-Infestação das sementes naturais	20
3.4-Fixação e marcação dos embriões de insetos com DAPI	21
3.5-Quantificação de proteínas em embriões e larvas	22
3.6-Quantificação de aminoácidos livres em ovos	22
3.7-Quantificação de triacilgliceróis em ovos e larvas	23
3.8-Quantificação de glicose livre em ovos e larvas	23
3.9-Quantificação de glicogênio em ovos e larvas	23
3.10-Determinação das atividades de enzimas digestivas das larvas	24
3.10.1-Extração das enzimas das larvas	24
3.10.2-Quantificação da atividade de proteases cisteínicas	24
3.10.3-Quantificação da atividade de α -amilases	25
3.10.4-Quantificação da atividade de α -glucosidases	25

3.10.5-Quantificação da atividade de proteases aspárticas	26
3.11-Isolamento de vicilinas do tegumento de <i>C. ensiformis</i>	26
3.12-Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western Blotting</i>	26
3.13-Marcação de proteínas com isotiocianato de fluoresceína-FITC	28
3.14-Sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais	29
3.15-Experimentos <i>in silico</i> de docking de vicilinas com N-acetilglicosamina	30
3.16-Análise estatística	31
4- Resultados	32
4.1-Performance de <i>C. maculatus</i> durante a oviposição, penetração e sobrevivência em sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	32
4.2-Morfologia dos embriões de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidos sobre tegumentos de sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	35
4.3-Dinâmica energética de embriões de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidos sobre sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	36
4.4-Desenvolvimento de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	42
4.5-Dinâmica energética de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> durante o desenvolvimento em sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	43
4.6-Performance de <i>Callosobruchus maculatus</i> durante a infestação de sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais de <i>Canavalia ensiformis</i>	49
4.7-Efeito dos tegumentos artificiais de <i>Canavalia ensiformis</i> na atividade de enzimas digestão das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	52
4.8-Isolamento da fração rica em vicilinas do tegumento de <i>C. ensiformis</i> e toxicidade para larvas de <i>C. maculatus</i> quando incorporada em tegumentos artificiais	56
4.9-Análise <i>in silico</i> das interações de vicilinas com N-acetilglicosamina	63
5- Discussão	69
6- Conclusões	81
7- Referências bibliográficas	82

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1: Dimorfismo sexual de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	3
Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> .	4
Figura 3: Estágios de extensão e segmentação da banda germinal.	6
Figura 4: Fechamento dorsal e destino das membranas extra-embrionárias	7
Figura 5: Desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .	8
Figura 6: Canal alimentar de insetos.	11
Figura 7: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> na oviposição de fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	32
Figura 8: Penetração e sobrevivência de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	34
Figura 9: Desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre os tegumentos das sementes naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	35
Figura 10: Perfil proteico de embriões de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidos sobre tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	37
Figura 11: Níveis de proteínas durante a embriogênese de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	39
Figura 12: Níveis de aminoácidos livres durante a embriogênese de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	39
Figura 13: Níveis de triacilgliceróis durante a embriogênese de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .	41
Figura 14: Níveis de glicose livre e glicogênio durante a embriogênese de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre tegumentos naturais de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	42
Figura 15: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> na massa de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	43

Figura 16: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> nos níveis de proteína de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	44
Figura 17: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> nos níveis de triacilglicerois de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	45
Figura 18: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> nos níveis de glicose e glicogênio de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	46
Figura 19: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas em larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	48
Figura 20: Interferência do tegumento natural de <i>Canavalia ensiformis</i> na atividade de α -amilases e α -glucosidases em larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	49
Figura 21: Espessura dos tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	50
Figura 22: Interferência do tegumento artificial de <i>Canavalia ensiformis</i> na oviposição, sobrevivência e massa de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	51
Figura 23: Interferência do tegumento artificial de <i>Canavalia ensiformis</i> na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas em larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	53
Figura 24: Interferência do tegumento artificial de <i>Canavalia ensiformis</i> nas atividades de α -amilases e α -glucosidases em larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	54
Figura 25: Detecção de proteínas de tegumento de <i>Canavalia ensiformis</i> no intestino de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	55
Figura 26: Visualização do perfil proteico da fração F70-90 e detecção de vicilinas por <i>Western Blotting</i> .	57
Figura 27: Interferência da fração F70-90 na oviposição de fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	58
Figura 28: Interferência da fração F70-90 na sobrevivência de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	58
Figura 29: Interferência da fração F70-90 na massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	59
Figura 30: Interferência da fração F70-90 de <i>Canavalia ensiformis</i> na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	60

Figura 31: Interferência da fração F70-90 na atividade de α -amilases e α -glucosidases de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	61
Figura 32: Detecção de proteínas da fração F70-90 no intestino de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	62
Figura 33: Alinhamento das sequências primárias das proteínas canavalina (1CAV) e faseolina (2PHL) com a sequência do peptídeo SLREEEESQDNDFYF de tegumento de <i>Canavalia ensiformis</i> (Oliveira et al 1999).	65
Figura 34: Sobreposição dos modelos estruturais tridimensionais de 2PHL e 1CAV.	66
Figura 35: Experimento de <i>docking</i> molecular entre N-acetilglicosamina (NAG) e a proteína 2PHL.	67
Figura 36: Experimento de <i>docking</i> molecular entre N-acetilglicosamina (NAG) e a proteína 21CAV.	68

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
HAO	Horas após a oviposição
DAO	Dias após a oviposição
HJ	Hormônio juvenil
MP	Membrana peritrófica
KDa	Quilodaltons
DTT	1,4-Dithiothreitol
pH	Potencial Hidrogeniônico
cv	Cultivar
°C	Graus Celsius
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
h	Hora
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PBST	Tampão fosfato de sódio contendo Tween 20
µm	Micrômetros
µL	Microlitros
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
µg	Micrograma
mg	Miligrama
NaCl	Cloreto de Sódio
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
g	Força da gravidade
rpm	Rotações por minuto
HCl	Ácido Clorídrico

NaOH	Hidróxido de Sódio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
OPA	Ortoftaldialdeído
nm	Nanômetros
PBST	Tampão fosfato de sódio contendo Tween 20
TCA	Ácido tricloroacético
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
NP α Glu	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
F70-90	Fração rica em vicilinas do tegumento de <i>C. ensiformis</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
PDB	Protein Data Bank
Å	Angstrom
ELM	Eukaryotic Linear Motif
NAG	N-acetilglicosamina

Resumo

O tegumento é o primeiro tecido da semente a entrar em contato com a praga *Callosobruchus maculatus* durante a infestação. Neste trabalho, estudamos a influência do tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *C. maculatus*. As sementes foram infestadas e os ovos foram coletados em intervalos de 12 h. Os ovos foram corados com DAPI e os embriões foram visualizados por microscopia de fluorescência. O desenvolvimento embrionário e larval foi acompanhado em sementes naturais e artificiais. Os níveis de proteínas, aminoácidos livres, triglicérides, glicose, glicogênio e enzimas digestivas foram medidos durante o desenvolvimento embrionário e larval. O perfil proteico foi visualizado por SDS-PAGE. A investigação da ingestão e excreção larval de proteínas do tegumento artificial também foi analisada por conjugação proteica com FITC. O tegumento de sementes de *C. ensiformis* afetou negativamente a oviposição, penetração e sobrevivência das larvas. No entanto, o desenvolvimento embrionário ocorreu sem alterações morfológicas ou alterações nos níveis de proteínas, aminoácidos livres, glicose, glicogênio e triglicérides. Os efeitos tóxicos do tegumento natural das sementes foram acentuados durante o desenvolvimento das larvas, como o atraso no ganho de peso corporal, a incapacidade das larvas de penetrar no tegumento da semente e diminuição dos níveis de triglicérides, proteínas, glicose e enzimas digestivas. Embora as larvas tenham sobrevivido até os 17 DAO, nenhuma larva penetrou no tegumento de sementes naturais. Foi observado um efeito dose-dependente da farinha de casca de sementes sobre a oviposição, sobrevivência e massa das larvas. As atividades larvais de proteases cisteínicas, α -amilase e α -glucosidase diminuíram enquanto a atividade de proteases aspárticas aumentou com a ingestão de farinha de tegumento de sementes pela larva. A fração rica em vicilinas, isolada do tegumento de *C. ensiformis* foi muito tóxica para as larvas, o que mostrou uma diminuição no peso corporal e na atividade das enzimas digestivas. De acordo com programa ELM foram identificados *motifs* de interação de N-glicosilação nesta vicilina e por *docking* molecular foi mostrado o potencial de interação com N-acetilglicosamina (NAG) pela formação de ligação de hidrogênio. Esses resultados mostraram que o tegumento de *C. ensiformis* é uma barreira eficaz à

penetração de larvas, interferindo no desenvolvimento pós-embrionário. O mecanismo de toxicidade desse tecido da semente pode estar relacionado, pelo menos em parte, à presença de vicilinas ligadoras de quitina, que se ligam às estruturas intestinais das larvas, interferindo na absorção de nutrientes e na atividade das enzimas digestivas.

Abstract

Seed coat is the first seed tissue to come into contact with the pest *Callosobruchus maculatus* during infestation. In this work, we study the influence of *Canavalia ensiformis* seed coat on embryonic and larval development of *C. maculatus*. Seeds were infested and eggs were taken at 12 h intervals. Eggs were stained with DAPI and embryos visualized by fluorescence microscopy. Embryonic and larval development was accompanied in natural and artificial seeds. Proteins, free amino acid, triglycerides, glucose, glycogen and digestive enzymes levels were measured during embryonic and larval development. The protein profile was visualized by SDS-PAGE. Investigation of the larval intake and excretion of artificial seed coat proteins was also analyzed by protein conjugation with FITC. *C. ensiformis* seed coat negatively affected oviposition, penetration and larval survival. However, the embryonic development occurred without morphological alterations or changes in proteins, free amino acids, glucose, glycogen, triglycerides levels. The natural seed coat toxic effects were accentuated during larval development, such as a delay in body weight gain, the inability of larvae to penetrate the seed coat and decreases in triglycerides, proteins, glucose and glycogen levels and digestive enzymes activities. Although the larvae survived until the 17 DAO, no larvae penetrated the natural seed coat. A dose-dependent effect of the seed coat flour on female oviposition, larval survival and mass was observed. Larval cysteine protease, α -amylase and α -glucosidase activities decreased while aspartic protease activity increased with ingestion of seed coat flour by the larva. Vicilin rich fraction isolated from *C. ensiformis* seed coat was very toxic to larvae, which showed a decrease in body weight and in the activity of digestive enzymes. By ELM program N-glycosylation interaction motifs were identified in this vicilin and by molecular docking the potential to interact with N-acetylglucosamine (NAG) by the formation of hydrogen bond was showed. These results showed that *C. ensiformis* seed coat is an effective barrier to the penetration of larvae, interfering in larval post-embryonic development. The toxicity mechanism of this seed coat may be related, at least in part, to the presence chitin-binding vicilins that bind to larval gut chitinous structures interfering with the absorption of nutrients and activity of digestive enzymes of the larvae.

1- Introdução

A resistência de plantas a insetos possui importantes significados tanto ecológicos como econômicos. Interações incompatíveis entre plantas resistentes e pestes avirulentas são mediadas por constituintes de plantas que resultam de uma elaborada rede genética que leva o vegetal a evitar ou resistir ao ataque de um agressor (SMITH; CLEMENT, 2012). Investigação de produtos naturais de plantas tem resultado na descoberta de uma variedade de compostos com atividades tóxicas contra agressores, incluindo pragas herbívoras. Dentro desse contexto, tem se destacado o estudo de sementes de plantas como fonte de compostos com potencial químico para o controle de pestes da agricultura (POWELL, 2009). Grande parte da dieta em todo mundo consiste de cereais e leguminosas. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) 70% da alimentação humana consiste nesses produtos vegetais (cereais e leguminosas) e os outros 30% compreende animais que também se alimentam dessas mesmas fontes de nutrientes vegetais. Além disso, sementes de leguminosas representam uma importante fonte alimentar para populações de baixa renda de áreas tropicais e subtropicais (MOURA et al., 2007). A semente é um órgão de reserva, possuindo desta forma, uma grande quantidade de nutrientes. Devido essa riqueza de nutrientes, a semente se destaca como um dos órgãos da planta preferenciais ao ataque de uma grande diversidade de insetos (XAVIER-FILHO, 1993). Estima-se que no mundo cerca de 20% dos produtos agrícolas estocadas são perdidos pelo ataque de insetos. Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento essas perdas podem atingir até 80% da produção.

1.1- Insetos

Dentre os muitos filós que constituem o Reino Animal, o filo Arthropoda destaca-se por sua diversidade de formas de vida, correspondendo a mais de 80% do reino animal, agrupados em diversas classes que estão distribuídas em cinco subfilos: Trilobitomorpha, Chelicerata, Myriapoda, Hexapoda e Crustacea. Pertencente ao subfilo Hexapoda, a classe Insecta é considerada a maior e mais bem sucedida de todo o filo Arthropoda, representando 73% dos invertebrados e 83% dos artrópodes (CHAPMAN, 2013; MARANHÃO, 1977). A grande diversidade de insetos parece ser reflexo da combinação de características vantajosas tais como: evolução dos genes de desenvolvimento em corpos segmentados e compartimentalizados, co-evolução com as plantas, miniaturização e o voo (PANIZZI, A.R. PARRA, 1991).

1.1.1- *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

Dentro da classe Insecta a ordem Coleoptera é a que possui o maior número de membros, com aproximadamente 370 mil espécies descritas, representando 40% de todos os insetos (CHAPMAN, 2013; LAWRENCE, J.F. BRITTON, 1991; PEREIRA; ALMEIDA, 2001; WHITING, 2002).

Os representantes dessa ordem são conhecidos popularmente como besouros e possuem como características morfológicas principais: um corpo altamente esclerotizado, cabeça com olhos conspícuos e aparelhos bucais mastigadores. Além disso, as asas anteriores são esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas, denominadas élitros, que cobrem as asas posteriores e o corpo (BRUSCA, R.C . BRUSCA, 2007). Uma importante característica existente nos besouros é a presença dos élitros. Durante o voo, os élitros se mantêm entreabertos e imóveis, enquanto as asas membranosas vibram. O sucesso evolutivo desses insetos pode estar relacionado à presença dessa estrutura, que possibilita a exploração de diferentes nichos ecológicos(CHAPMAN, 2013). A família Chrysomelidae é uma das mais numericamente representativas da ordem Coleoptera e é dividida em 11 subfamílias: Bruchinae, Chrysomelinae, Criocerinae, Cryptocephalinae, Donaciinae, Eumolpinae, Galerucinae, Hispinae, Lamprosomatinae, Sagrinae e Spilopyrinae (REID, 2000). Larvas de coleópteros da Família Chrysomelidae consomem o interior de sementes de leguminosas e

comprometem o seu valor comercial, nutricional e germinativo e por essa razão, são considerados umas das principais pragas de leguminosas (SOUTHGATE, 1979). O besouro *Callosobruchus maculatus* também popularmente conhecido como “gorgulho” ou “caruncho” é uma das principais pragas de feijões do gênero *Vigna*, podendo atacar sementes tanto durante o armazenamento quanto no interior de vagens. Tem como características morfológicas principais um corpo com aproximadamente 3 mm de comprimento, tórax preto com pubescências douradas, e uma mancha em forma de “X” nos élitros. Na fase adulta, observa-se um dimorfismo sexual onde as fêmeas são maiores que os machos (GALLO et al., 2002) (Figura 1).



Figura 1: Dimorfismo sexual de *Callosobruchus maculatus*. Adaptado de Oliveira, 2003.

Logo após a oviposição, os ovos que ficam aderidos ao tegumento (casca) da semente, possuem um formato subelíptico, com uma cor esbranquiçada (BASTOS, 1981). O desenvolvimento embrionário sobre sementes hospedeiras é finalizado em 5 a 6 dias após a oviposição. A larva eclode, cava o tegumento para atravessá-lo e alcançar os cotilédones. Todo o desenvolvimento restante se dá no interior da semente, onde as larvas consomem os cotilédones, crescem, se transformam em pupas, sofrendo gradativamente um processo de esclerotização e apresentando em seus últimos estágios vestígios de asas, patas e olhos. Após um período médio de 25 dias após a oviposição, os insetos adultos emergem deixando galerias e restos de excrementos no interior das sementes (BASTOS, 1981; DE SÁ et al., 2014; WILIAMS, 1980) (Figura 2).

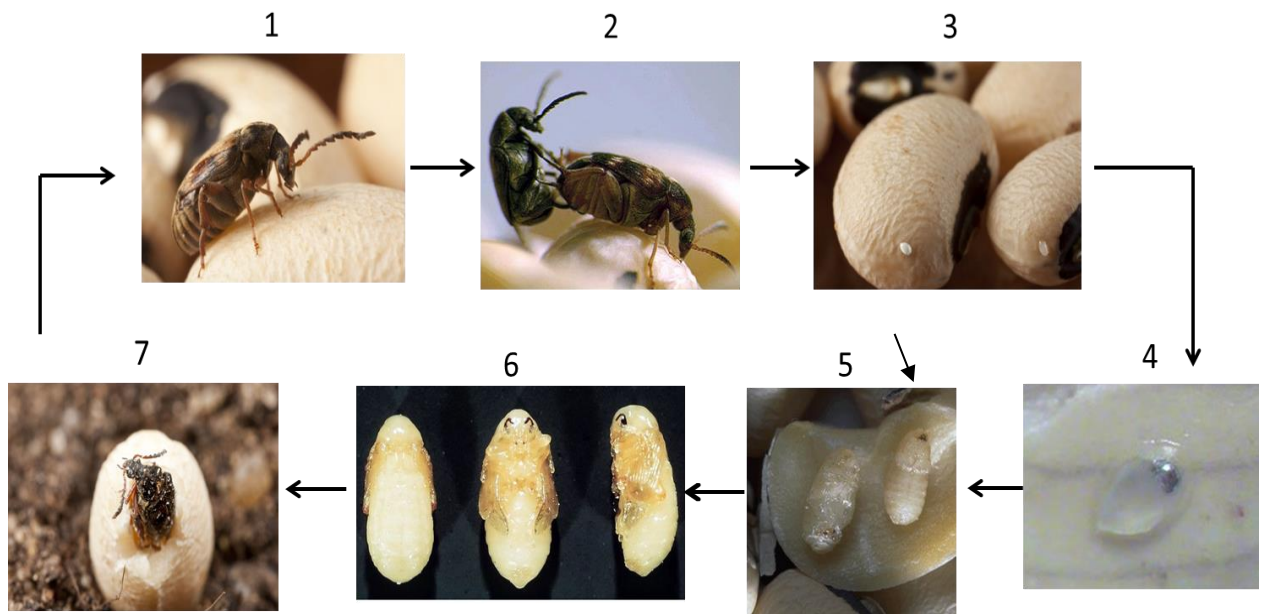


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do inseto *Callosobruchus maculatus*.
 1-Fêmea do inseto logo após a emergência, 2-Acasalamento, 3-Ovos ovipostos sobre a semente, indicados pela seta negra 4-Larva formada no interior do ovo, 5-Larvas se desenvolvendo no interior das sementes, 6-Pupas extraídas das sementes e 7-Inseto adulto no momento da emergência.

1.1.2- Ovocênese em Insetos

Durante a ovocênese a fêmea deposita nos ovos compostos orgânicos necessários para o início da construção do embrião (STEWART; THOMPSON, 1993). Assim, após a oviposição tudo que é requerido para o desenvolvimento do embrião já foi adicionado aos ovos, com exceção de oxigênio para o metabolismo aeróbio e em algumas espécies, água (VLECK, 1991). O conjunto de recursos energéticos contidos no ovo é chamado de vitelo e durante a sua formação (vitelogênese) são depositadas grandes quantidades de proteínas, lipídeos e açúcares nos ovócitos em crescimento. O principal componente do vitelo é uma proteína denominada vitelina. Nos animais ovíparos, em sua maioria, as vitelinas são derivadas de uma lipofosfoglicoproteína precursora denominada vitelogenina que pode ter de 200 até 700 KDa (LIM et al., 2001). A vitelogenina é sintetizada no corpo gorduroso de insetos e internalizada pelos ovócitos através de endocitose mediada por receptor, sendo acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo. Uma das funções da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua utilização está relacionada à ação de proteases (LOGULLO et al., 1998; YAMAMOTO; TAKAHASHI, 1993). Em *Aedes aegypti*, a deposição sequencial de componentes do vitelo durante a

ovogênese foi observada paralelamente a dois processos de crescimento do comprimento tanto dos folículos ovarianos como dos ovócitos. A primeira fase de crescimento linear foi associada com a incorporação equicalórica (em quantidades equivalentes em calorias) e sincrônica (simultânea) de lipídeos e proteínas aos ovócitos. A segunda fase linear de crescimento foi caracterizada pela incorporação rápida e tardia de glicogênio aos ovócitos (BRIEGEL; GUT; LEA, 2003).

Nos estágios finais da ovogênese tanto as células foliculares quanto as nutridoras sofrem um processo de apoptose. No momento da postura, os ovos contêm apenas um único núcleo haplóide e as camadas externas tais como a membrana vitelínica e o córion (DA FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012).

1.1.3- Desenvolvimento embrionário de insetos

Logo após a postura dos ovos, inicia-se a divisão do núcleo zigótico e cada núcleo filho dará origem a um energídeo. À medida que se dividem os energídeos migram para uma região periférica da massa de vitelo denominada periplasma, onde após a sua chegada continuam a se dividir. Em muitas espécies de insetos, nem todos os energídeos migram para a periferia, onde alguns permanecem na massa de vitelo e se transformam em vitelófagos que são relacionados com a degradação de vitelo (CHAPMAN, 2013; GILLOTT, 2005).

Devido às sucessivas divisões dos energídeos na região do periplasma os núcleos se tornam muito próximos uns aos outros, formando assim o estágio de blastoderma sincicial. Quando ocorre a formação de uma membrana plasmática ao redor de cada núcleo do blastoderma sincicial forma-se então o blastoderma celular (GILLOTT, 2005).

Após a formação do blastoderma celular ocorrem simultaneamente a gastrulação, evidenciada pela formação do mesoderma, ectoderma e endoderma, e o posicionamento das células que darão origem à banda germinal (primórdio embrionário) e das membranas extra-embrionárias: serosa e âmnion (GILBERT; BARRESI, 2013). Na região ventral do ovo, a banda germinal se desenvolverá no futuro embrião enquanto o restante do blastoderma dará origem às membranas extra-embrionárias (CHAPMAN, 2013; GILLOTT, 2005).

Durante a formação da banda germinal, inicia-se um processo denominado extensão da banda germinal, onde a parte posterior se estende dorsalmente em direção à região anterior até quase tocar o lobo cefálico. À medida que a banda germinal se estende, os segmentos cefálicos, torácicos e abdominais tornam-se mais evidentes (CHAPMAN, 2013; GILLOTT, 2005) (Figura 3).

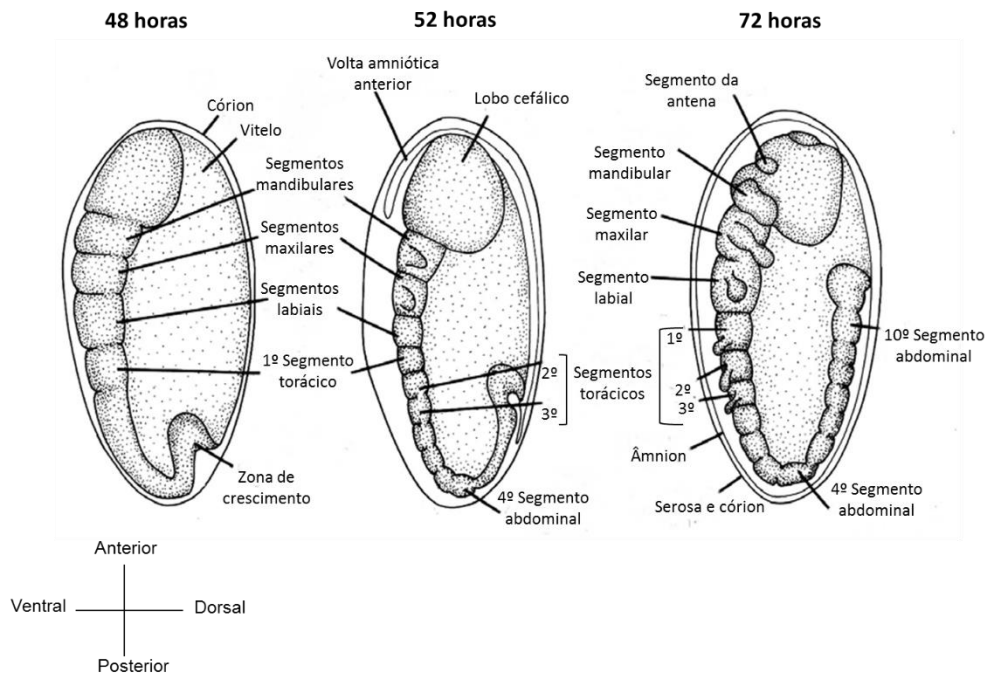


Figura 3: Estágios de extensão e segmentação da banda germinal. Representação dos estágios de extensão e segmentação da banda germinal em *Bruchidius obtectus* com 48, 52 e 72 horas de desenvolvimento embrionário. Adaptado de Gillott, 1985.

Logo após a total extensão da banda germinal é iniciado o processo de retração da banda germinal, evidenciado pelo retorno da região posterior, que havia crescido em direção à região anterior, à sua posição original (CHAPMAN, 2013; GILLOTT, 2005).

Finalizado o processo de retração da banda germinal, o embrião cresce lateralmente encobrendo todo o vitelo, evento esse denominado fechamento dorsal. Em alguns membros da família Chrysomelidae o âmnion forma o fechamento dorsal provisório e a serosa se mantém intacta ao redor do embrião (CHAPMAN, 2013; GILLOTT, 2005) (Figura 4).

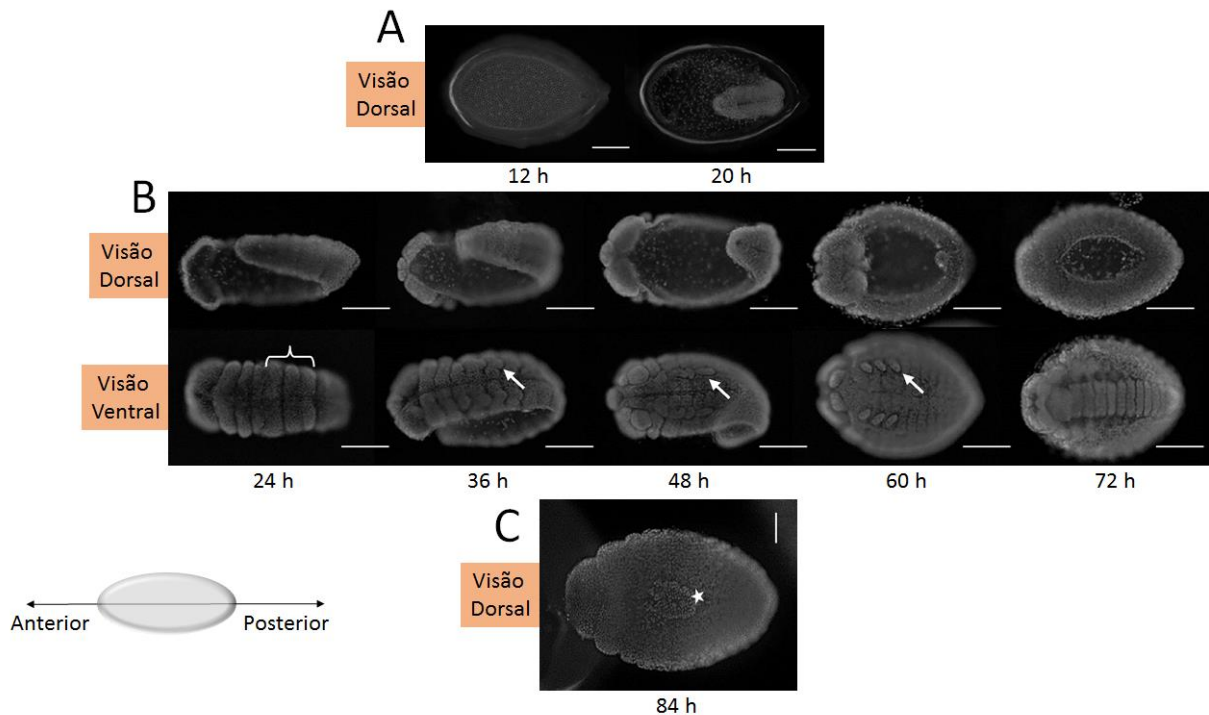


Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes de *Vigna unguiculata*. Microscopia ótica de fluorescência (DAPI) do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*. Os tempos em h indicam horas após a oviposição (HAO). **A:** visão dorsal dos embriões de 12 e 20 HAO dentro dos ovos; **B:** visão dorsal e ventral de embriões de 24 a 72 HAO fora dos ovos; **C:** visão dorsal de um embrião de 84 HAO fora do ovo. Chaves brancas destacam os segmentos torácicos, setas brancas apontam os apêndices de patas e a estrela branca indica uma pequena parte do vitelo ainda exposta ao final do fechamento dorsal. Barra de escala = 50 μ m. Adaptado de De Sá et al., 2014.

No período de 60 a 84 HAO, os embriões encontram-se no processo de fechamento dorsal, quando as células do vitelo da região dorsal são cobertas por células embrionárias (Figura 5B e C). O término do fechamento dorsal acontece aproximadamente em 84 HAO (Figura 5C), mas ainda é possível observar uma pequena parte do vitelo exposta na região dorsal (Figura 5 estrela branca). O final da embriogênese, definido na literatura como o momento em que a larva eclode de dentro do ovo, para os embriões de *C. maculatus* acontece com 5 dias após a oviposição (DAO). Não foram observadas mudanças morfológicas significativas nos eventos do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, quando comparados com os que se desenvolveram sobre *V. unguiculata* ou sobre sementes não hospedeiras de *Phaseolus vulgaris* (DE SÁ et al., 2014).

1.1.4- Desenvolvimento pós embrionário

Durante a eclosão, a maioria dos embriões força seu caminho para fora do ovo, exercendo pressão contra o interior da casca. O inseto aumenta o seu volume ao engolir o fluido extra-embrionário e, em alguns casos, ao engolir o ar que difunde através da casca. Em seguida, as ondas de contração muscular bombeiam a hemolinfa para frente, de modo que as regiões torácicas e da cabeça são pressionadas firmemente contra o interior da casca. A posição da ruptura depende geralmente de onde o inseto pressiona o córion (CHAPMAN, 2013; GILBERT; BARRESI, 2013).

Em ovos de *C. maculatus* a ruptura do córion ocorre na região ventral dos ovos, que está diretamente aderida ao tegumento da semente. Com o desenvolvimento embrionário finalizado, os embriões de *C. maculatus* possuem sua cabeça esclerotizada. Essa esclerotização cefálica garante uma rigidez mandibular importante para a ruptura do córion e penetração das sementes (DE SÁ et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

Insetos podem ser agrupados em três grandes categorias: ametábolos, hemimetábolos e holometábolos. Em insetos holometábolos, as larvas normalmente de corpo mole são na maior parte muito diferentes do adulto e um estágio pupal está presente entre o último estágio larval e o adulto. A pupa é característica do desenvolvimento holometabólico, que ocorre em todos os Neuropteras, Trichopteras, Lepidopteras, Coleopteras, Hymenopteras, Dipteras e Siphonapteras (CHAPMAN, 2013).

Durante o desenvolvimento das larvas, não há geralmente nenhuma mudança morfológica marcante na forma do corpo, sendo cada ínstar sucessivo semelhante ao anterior, mas o grau de mudança da larva de último ínstar para a pupa e posteriormente para o adulto varia consideravelmente (CHAPMAN, 2013).

Essa mudança chama-se metamorfose e pode estar relacionada à perda de características adaptativas peculiares à larva e ao ganho de características peculiares ao adulto. A metamorfose é a consequência de uma muda que é iniciada na ausência de um nível adequado de hormônio juvenil (HJ). Como o nome sugere, o papel do HJ em estágios larvais é prevenir o progresso do desenvolvimento desde a fase larval até a pupa e adulto. Efetivamente, HJ é

um hormônio "morfostático", e impede a metamorfose (CHAPMAN, 2013; TRUMAN; RIDDIFORD, 2002).

Após a embriogênese, o desenvolvimento de *C. maculatus* pode ser dividido em sete estágios: 1º instar, até o 9º dia após a oviposição (DAO); 2º instar, do 10º ao 13º DAO ; 3º instar, do 14º ao 17º DAO (); 4º instar, do 18º ao 20º DAO ; pré-pupa, aos 21 DAO; pupa, aos 24 DAO; e adulto. Por não se alimentar durante os estágios de pupa e adulto, é durante o estágio larval que ocorrem os processos de digestão e absorção de nutrientes tendo seu pico no 3º instar (CHI et al., 2009; DE SÁ et al., 2014; PEDRA et al., 2003).

Durante o ciclo de vida de insetos holometábolos, os níveis de nutrientes estocados é fundamental, visto que durante a alimentação larval as reservas energéticas além de usadas nos processos de metamorfose irão prover a reserva de nutrientes para o inseto adulto (MIRTH; RIDDIFORD, 2007). Carboidratos, incluindo açúcares simples, amido e outros polissacarídeos, são componentes importantes da dieta para a maioria dos insetos. Os carboidratos são utilizados para manutenção do metabolismo energético durante o período de jejum, síntese de quitina, sendo importantes ainda no processo de voo nos insetos (KAUFMANN; BROWN, 2008). A glicose é estocada na forma de glicogênio, o qual é rapidamente mobilizado nos tecidos liberando trealose que é a forma principal de açúcar circulante em insetos. Em vários insetos a aclimatação ao frio leva ao aumento no conteúdo de glicose e trealose e essas mudanças são suportadas pela rápida mobilização de glicogênio (OVERGAARD et al., 2007; VANIN; BUBACCO; BELTRAMINI, 2008).

Os adipócitos de insetos estocam grandes quantidades de lipídeos, essenciais para crescimento, reprodução e ainda para prover energia necessária durante os longos períodos sem alimentação. As reservas lipídicas são as mais importantes utilizadas pelo inseto devido à alta demanda energética para os processos de metamorfose (HAHN; DENLINGER, 2007) desenvolvimento do embrião e períodos prolongados de voo e representam, em alguns insetos, mais de 50% do seu peso seco. A maior parte desses lipídeos é estocada na forma de triacilgliceróis, normalmente sintetizados a partir de carboidratos da dieta (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006).

1.1.5- Digestão em Insetos

Para suprir às suas necessidades nutricionais, insetos fitófagos devem ajustar seus hábitos alimentares, sua fisiologia digestiva e expressão gênica para se adaptarem aos seus alimentos. A maioria dos nutrientes ingeridos estão na forma de macromoléculas e devem ser inicialmente quebrados em moléculas menores antes de serem absorvidos. O processo de quebra, sendo mecânica ou química, ocorre no trato do sistema digestivo de insetos. Devido à grande diversidade de associações entre insetos e plantas, existem variações consideráveis na composição alimentar, estrutura do trato digestivo, secreção enzimática e processos digestivos entre os diferentes insetos (TERRA; CRISTOFOLETTI, 1996; ZHU-SALZMAN et al., 2003). De uma maneira geral, o sistema digestivo dos insetos é formado por um canal alimentar que percorre o corpo desde a boca até o ânus e é dividido em três regiões: o intestino anterior, intestino médio e o intestino posterior (CHAPMAN, 2013) (Figura 6).

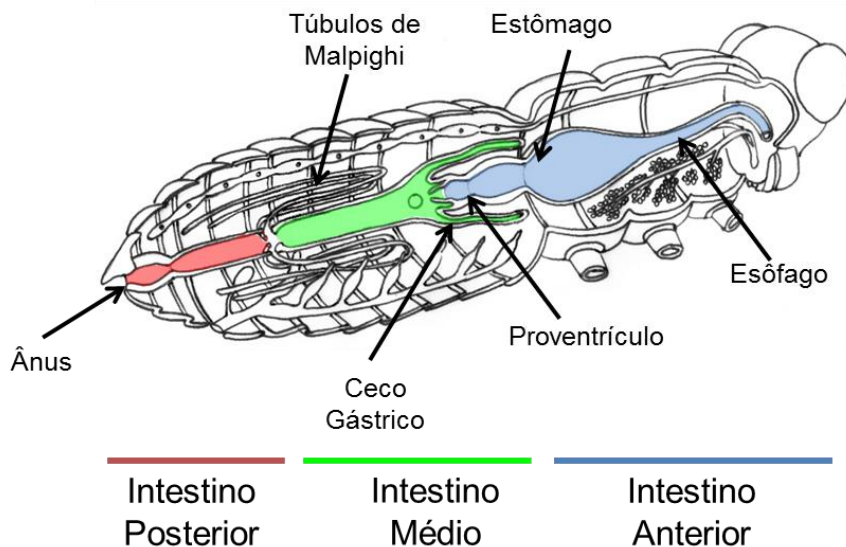


Figura 6: Canal alimentar de insetos. Representação esquemática das principais subdivisões do canal alimentar de insetos. Baseado em Chapman, 2013.

O intestino médio é geralmente um tubo simples, de diâmetro e comprimentos variados, que compreende o tecido mais importante para a digestão e absorção de nutrientes (CHAPMAN, 2013). Em algumas espécies de insetos, durante a digestão no intestino médio, o bolo alimentar é recoberto por uma membrana acelular formada majoritariamente por quitina e proteínas,

denominada membrana peritrófica (MP). Essa membrana tem como função principal proteger o epitélio do intestino contra possíveis injúrias mecânicas e/ou químicas e a penetração de microrganismos do alimento. Uma variação da membrana peritrófica pode ser observada em bruquídeos como *C. maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, onde foi descrita a presença de um gel peritrófico revestindo o bolo alimentar. O gel também apresenta quitina e proteínas em sua composição e se diferencia da membrana peritrófica pela falta de resistência mecânica e diferenças nas propriedades de permeabilidade (TERRA, 2001).

Assim como em humanos, os insetos obtêm seus aminoácidos essenciais através da digestão de proteínas alimentares. Para uma alimentação baseada em sementes de leguminosas, ricas em proteínas, o processo digestivo de várias espécies de insetos se concentra na ação de proteases (endopeptidases). Por realizarem a quebra de proteínas, gerando aminoácidos livres essenciais para o desenvolvimento, essas enzimas são consideradas como potenciais alvos para o controle de pragas agrícolas (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Em insetos herbívoros as enzimas também são importantes para facilitar a penetração dos tecidos vegetais (CASTRO; FONTES, 2005).

As proteases digestivas podem ser classificadas em quatro grupos, levando em consideração o aminoácido presente no sítio catalítico: proteases serínicas, com um aminoácido serina e outro histidina no sítio ativo; proteases cisteínicas, com uma cisteína no sítio ativo; proteases aspárticas, com a presença do aspartato no sítio ativo e metaloproteases que possuem íons metálicos (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) no sítio ativo (RAO et al., 1998; YOUSEF et al., 2003).

De acordo com a acidez presente no intestino médio de diferentes ordens de insetos, algumas classes de proteases podem ser utilizadas preferencialmente. Em insetos das ordens Diptera e Lepidoptera a digestão ocorre em um ambiente alcalino, favorecendo a atividade de proteases serínicas (HAQ; ATIF; KHAN, 2004). Por outro lado, os representantes da ordem Coleoptera por possuírem intestinos com pHs ácidos contam majoritariamente com a atividade de proteases aspárticas e cisteínicas em seus processos digestivos (MURDOCK et al., 1987).

Com base em suas sequências de aminoácidos as proteases cisteínicas podem ser classificadas em clãs e famílias (RAWLINGS; SALVESEN, 2012). As proteases cisteínicas da família C1 do clã CA são as mais conhecidas. Esta família compreende, entre outras proteases, as catepsinas lisossomais encontradas em animais. Essas enzimas são monômeros que possuem massa molecular entre 20 e 40 KDa e pH ótimo entre 5 e 6, com exceção da catepsina C, que é um tetrâmero com massa molecular de 200 KDa (RAWLINGS; SALVESEN, 2012; TERRA; FERREIRA, 2005).

As proteases cisteínicas de maior importância são as catepsinas lisossomais B, H e L. A Catepsina L é uma endopeptidase que hidrolisa preferencialmente, ligações peptídicas com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto as catepsinas B atuam sobre arginina. A catepsina L é a principal protease cisteínicas em insetos, sendo inibida por E-64 e ativada por cisteína e DTT (1,4-Dithiothreitol) (TERRA; FERREIRA, 2005).

Em larvas de *C. maculatus*, o pH do intestino médio é de aproximadamente 5,5 e proteases cisteínicas tipo catepsinas L, referidas como CmCPs, são descritas como as enzimas digestivas majoritárias (ZHU-SALZMAN; SALZMAN, 2001). Embora não detectadas em larvas com uma alimentação normal, as proteases cisteínicas tipo catepsinas B (CmCatB) foram altamente expressas durante uma dieta contendo doses subletais de cistatina de soja (inibidor de proteases cisteínicas) (AHN et al., 2004; MOON et al., 2004).

Dentre as proteases aspárticas, a catepsina D é a mais bem estudada em vertebrados e artrópodes, sendo responsável pela degradação proteica intra e extracelular (AHN; ZHU-SALZMAN, 2009). Essas proteases tem um pH ótimo ácido variando de 3 a 5 e dependem de dois resíduos de aspartato para a catálise. As catepsinas D são secretadas no lúmen do intestino médio de muitas coleópteras, onde as proteases cisteínicas são as enzimas digestivas majoritárias (BRUNELLE et al., 1999; SILVA; XAVIER-FILHO, 1991).

Embora não possuam destaque como atividades digestivas principais, carboidrases como α -glucosidases e amilases, também possuem um papel importante na digestão de insetos bruquídeos sendo consideradas em alguns trabalhos como alvos potenciais para o controle dos mesmos (LEMOS et al., 1990; PEDRA et al., 2003). As α -glucosidases possuem propriedades similares entre as ordens de insetos (Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e

Lepdoptera) das quais já foram purificadas e caracterizadas (ERTHAL; PERES SILVA; SAMUELS, 2004).

As α -glucosidases de insetos ocorrem sob a forma solúvel no lúmen do intestino médio, ou podem estar presas ao glicocálix das células epiteliais. Embora as propriedades bioquímicas de muitas α -glucosidases intestinais já sejam conhecidas, como massas moleculares entre 60-80 kDa, pH ótimo variando de 5 a 6,5 e inibição por Tris (hidroximetil)aminometano, poucos trabalhos reportam suas especificidades (GILBERT, 2012; TERRA; FERREIRA, 2005). As α -glucosidases possuem propriedades similares entre as ordens de insetos (Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e Lepdoptera) das quais já foram purificadas e caracterizadas (ERTHAL; PERES SILVA; SAMUELS, 2004; TERRA; FERREIRA, 2005)

Também relacionadas à digestão de carboidratos, a maioria das amilases de insetos têm pesos moleculares em torno de 48 a 60 kDa e um pH ótimo que corresponde, geralmente, ao pH prevalente nos intestinos médios a partir dos quais foram isoladas. As amilases de insetos são enzimas dependentes de cálcio, e são geralmente ativadas por cloreto mas também pode ocorrer com outros ânions, tais como: brometo e nitrato (GILBERT, 2012). Uma α -amilase de insetos já bem descrita foi purificada a partir intestino médio de larvas de *Tenebrio molitor*. A enzima tem três domínios, onde o domínio central A que compreende o centro da molécula e inclui os resíduos de aminoácidos catalíticos (Asp 185, Glu 222 e Asp 287). Os domínios B e C são quase opostos um do outro, de cada lado do domínio A. Essas características estruturais são compartilhadas por muitas outras α -amilases conhecidas (NIELSEN; BORCHERT, 2000; STROBL et al., 1997, 1998).

Diante do grande número de funções que os componentes do sistema digestivo de insetos podem exercer, inúmeros trabalhos se concentram em analisar as alterações nesse sistema em resposta a diferentes dietas. Por outro lado, outros trabalhos atuam na investigação de compostos de plantas que interfiram nas atividades enzimáticas digestivas e sejam conseqüentemente letais aos insetos (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; GATEHOUSE et al., 1985; KITCH; MURDOCK, 1986; NOGUEIRA et al., 2012; PEDRA et al., 2003; SALES et al., 2000; SILVA et al., 2004).

1.2- Sementes

A semente é o órgão responsável por garantir a propagação e dispersão da planta, contendo material genético e moléculas necessários para a formação e desenvolvimento de um novo indivíduo. Além disso, por serem utilizadas na alimentação humana, na produção de rações animais, na produção de medicamentos e outros produtos naturais, as sementes desempenham um papel importante para a economia e sobrevivência das civilizações (BEWLEY; BLACK, 1992; MOÏSE et al., 2005).

Em angiospermas, a semente é basicamente constituída por tecido meristemático (eixo embrionário), tecido de reserva (cotilédones) e o tegumento, tecido de proteção que reveste toda a semente. Sua composição é determinada por fatores genéticos, diferentes práticas culturais e condições ambientais, podendo variar entre espécies ou até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (BEWLEY; BLACK, 1992).

Por possuírem uma grande variedade de nutrientes, as sementes são alimentos preferenciais para muitos organismos, inclusive muitas pragas como insetos herbívoros, sendo assim são uma das partes da planta mais atacadas. Por serem incapazes de disparar respostas de defesa induzidas pelo ataque do agressor, as sementes quiescentes possuem suas defesas baseadas na proteção física e nas defesas químicas constitutivas, compostos químicos já depositados em seus tecidos desde o preenchimento dos grãos. Desta forma as sementes são consideradas fontes ricas de compostos de defesa das plantas (XAVIER-FILHO, 1993). Dentro desses tipos de defesa estão incluídas estruturas físicas (tricomas, espinhos e pelos) e substâncias químicas (metabólitos secundários e macromoléculas, principalmente proteínas) (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; XAVIER-FILHO, 1993).

1.2.1- Tegumento de sementes como barreira química de defesa

O tegumento ou casca é o tecido externo que reveste a semente. Ele é de origem materna e formado a partir de transformações do envoltório do óvulo, podendo apresentar variações em relação à textura, coloração, porosidade, espessura e dureza. Além de diferenças nas características anatômicas e morfológicas, esse tecido apresenta uma grande variedade de compostos como:

compostos do metabolismo secundário (taninos, fenóis, pigmentos e ceras), proteínas, carboidratos, lipídeos, inibidores de germinação, etc., que podem variar em concentração entre diferentes espécies (MOÏSE et al., 2005).

Além de promover a defesa do embrião, os tegumentos estão relacionados com o direcionamento de nutrientes para o tecido meristemático, controle de processos de dormência e germinação, controle da absorção de água e trocas gasosas (BEWLEY, 2017; WEBER; BORISJUK; WOBUS, 2005).

Por ser a estrutura de revestimento, o tegumento é o primeiro tecido da semente a entrar em contato com os possíveis agressores. Para muitos autores, essa proteção se baseia exclusivamente em suas propriedades físicas como espessura e dureza, entretanto muitos trabalhos vêm relacionando compostos químicos dos tegumentos com essa proteção. Já na década de 70, um estudo com 73 espécies diferentes de sementes infestadas pelo inseto *C. maculatus*, mostrou não haver relação direta entre espessura/dureza dos tegumentos com a proteção. Alta mortalidade de larvas foram observadas em sementes com tegumentos muito finos, enquanto que sementes com tegumentos espessos e duros as larvas tiveram êxito em penetrar e sobreviver (JANZEN, 1977). Assim concluiu-se que para muitas sementes a presença de compostos tóxicos nos tegumentos pode estar relacionada com a resistência das sementes a predação. Resultados similares foram observados para diferentes sementes de *Phaseolus vulgaris* infestadas com o inseto *Acanthoscelides obtectus*, onde altas variações na mortalidade de larvas de primeiro instar independeram das propriedades físicas dos tegumentos (THIERY; JARRY; POUZAT, 1994).

A infestação de sete cultivares diferentes de soja *Glycine max* com *C. maculatus* mostrou grande interferência dos tegumentos dessas sementes em parâmetros do ciclo de vida do inseto, desde penetração, eclosão larval, desenvolvimento e sobrevivência das larvas. Mais uma vez foi observado não haver correlação entre espessura, coloração ou textura dos tegumentos com a habilidade da larva em atravessá-los, visto que mesmo em sementes de soja com tegumentos com espessuras similares, foram observadas variações superiores a 100 % no tempo que a larva levou para atravessar os tegumentos. Atrasos de até 116% no tempo para a larva atravessar o tegumento e alcançar os cotilédones também foram observados. A presença de compostos tóxicos,

com WD_{50} (dose que reduz a massa larval para 50%) em torno 1,5 % nesses tegumentos também foi demonstrada pelos autores (OLIVEIRA et al., 2009).

Em um estudo realizado com a infestação de sementes cultivadas dos feijões comuns *Phaseolus vulgaris* (cultivares manteiga, vermelho e manteiga-vermelho), *Phaseolus lunatus*, e *Vigna angularis* e com as sementes selvagens (silvestres) de *Canavalia ensiformis*, *Adenantha pavonina*, *Albizia sp.*, *Bauhinia variegata*, *Peltogyne gracilipes*, *Clitoria fairchildiana*, *Dioclea altissima*, *Caesalpinia ferrea*, *Galactia latisiliqua*, *Macroptilium bracteatum*, *Sesbania virgata*, *Tephrosia adunca* e *Vigna vexilata*, foi demonstrado que as propriedades tóxicas dos tegumentos independem das propriedades físicas dos tegumentos e também do processo de domesticação, uma vez que os feijões comuns do gênero *Phaseolus* que possuem tegumentos finos, foram extremamente tóxicos para o inseto *C. maculatus* (SOUZA et al., 2011).

A interação entre o tegumento de *P. vulgaris* e o inseto *C. maculatus* também foi investigada e os resultados mostraram a fase larval é a mais afetada pela toxicidade desses tegumentos. Proteínas dos tegumentos de *P. vulgaris* marcadas com FITC ficaram retidas no intestino das larvas. Além disso, a atividade de importantes enzimas digestivas de *C. maculatus*, protease cisteínica, α -amilase e α -glucosidase foram diminuídas nas larvas que se desenvolveram após atravessarem os tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *P. vulgaris*. A embriogênese, que é a fase de desenvolvimento do inseto que possui mais contato com o tegumento, aconteceu normalmente, não sendo observadas diferenças nos principais eventos morfológicos do embrião desenvolvido sobre sementes de *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* (DE SÁ et al., 2014) Esses resultados indicaram que a toxicidade desse tegumento para o inseto possa estar relacionada, pelo menos em parte, à alterações moleculares no processo digestivo das larvas.

Compostos tóxicos a insetos também foram isolados de tegumentos de sementes. Dos tegumentos de sementes de *Canavalia ensiformis* (OLIVEIRA et al., 1999), *Phaseolus lunatus* (MORAES et al., 2000), *Phaseolus vulgaris* (SILVA et al., 2004) e *Albizia lebeck* (SOUZA et al., 2012) foram isoladas proteínas com sequência de aminoácidos similar a vicilinas. As vicilinas são proteínas do tipo globulinas com funções essenciais como proteínas de reserva e de defesa de sementes (SALES et al., 2000). Trabalhos estudando os papéis de vicilinas como

proteína de defesa mostraram que proteases do intestino de larvas do inseto *C. maculatus* tiveram dificuldades em digerir essas proteínas (SALES; MACEDO; XAVIER-FILHO, 1992). Vicilinas de cultivares de *V. unguiculata* resistentes a *C. maculatus* foram consideradas o principal fator de resistência, mostrando toxicidades contra as larvas do inseto (MACEDO et al., 1993). Essa toxicidade das vicilinas vem sendo relacionada a capacidade de ligação a matrizes de quitina presente no intestino de insetos (MACEDO et al., 1993; MOTA et al., 2003; PAES et al., 2000; SALES et al., 1996; YUNES et al., 1998).

Do tegumento de sementes de *Albizia lebbbeck* também foi isolada uma protease cisteínica da superfamília C1, com 100% de identidade com uma mexicana de *Jacaratia mexicana* e 78,5% de identidade com proteases cisteínicas de soja. A toxicidade dessa protease também foi relacionada com a propriedades de ligação à quitina no intestino das larvas de *C. maculatus* (SILVA et al., 2016).

Um carboidrato tóxico para larvas de *C. maculatus* também foi isolado do tegumento de sementes de *C. ensiformis*. Esse açúcar mostrou massa molecular de 883,0 Da e estrutura constituída por uma cadeia principal de unidades de ramnose unidas por ligações do tipo α (1 \rightarrow 2) com ramificações de galactose com ligações do tipo α (1 \rightarrow 4) (OLIVEIRA et al., 2001).

Muitos avançados no sentido de confirmar o poder protetor dos tegumentos contra a penetração de insetos foram realizados nos últimos anos. Esses trabalhos ainda mostraram a presença de moléculas tóxicas para insetos nesses tecidos. Entretanto a maioria desses ensaios foi realizada adicionando as moléculas em dietas simulando cotilédones artificiais e não tegumentos artificiais. A identificação dos mecanismos de toxicidade desses tegumentos para insetos bruquídeos e a caracterização das alterações morfológicas e bioquímicas sofridas pelas larvas que consumiram esses tecidos também ainda são desconhecidas para a maioria desses tegumentos.

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Estudar os efeitos da toxicidade do tegumento de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*.

2.2- Objetivos específicos

- Analisar o desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus* sobre tegumentos de sementes naturais de *V. unguiculata* comparado com o desenvolvimento sobre sementes não hospedeiras de *C. ensiformis*;
- Analisar o perfil metabólico de embriões de *C. maculatus* desenvolvidos sobre os tegumentos de sementes naturais de *V. unguiculata* e *C. ensiformis*;
- Analisar os efeitos tóxicos de tegumentos naturais e artificiais de *C. ensiformis* sobre os parâmetros de desenvolvimento oviposição, eclosão larval, massa das larvas e sobrevivência de *C. maculatus*;
- Avaliar a ingestão e excreção de proteínas dos tegumentos de *C. ensiformis* por larvas de *C. maculatus*;
- Isolar vicilinas de tegumentos de *C. ensiformis* e avaliar os efeitos tóxicos dessas proteínas quando incorporadas em tegumentos artificiais;
- Analisar *in silico* as interações moleculares entre as vicilinas de tegumentos e o monômero de quitina, *N*-acetilglicosamina.

3- Materiais e Métodos

3.1- Sementes

As sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) foram obtidas comercialmente no mercado central da Cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

As sementes de *Canavalia ensiformis* foram obtidas no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará/Ce, replicadas no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e plantadas no sítio Vale do Sol, localizado na cidade de Eugenópolis/MG. As sementes quiescentes foram acondicionadas em frascos fechados a uma temperatura de -20 °C.

3.2- Insetos

O inseto *Callosobruchus maculatus* foi obtido a partir de uma colônia, mantida no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Para a criação foram usadas sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) que foram infestadas com fêmeas de 2 dias de idade por 24 h. As sementes infestadas foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, de boca larga fechados com tampas plásticas perfuradas. Os frascos foram mantidos em câmaras de crescimento do tipo B.O.D, à temperatura de 28 °C e umidade ambiente. A cada geração de insetos emergidos novas sementes foram infestadas para a continuidade da criação.

3.3- Infestação das sementes naturais

Sementes naturais de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* foram infestadas com fêmeas de *C. maculatus* com 2 dias após a emergência, numa proporção de 5 fêmeas por semente, durante 24 horas à 28 °C. As sementes foram desinfestadas e o número de ovos sobre os tegumentos foi contado com o auxílio de um estereoscópio. A penetração e o desenvolvimento larval foram monitorados diariamente até o máximo de 20 dias após a oviposição (DAO). Nos

tempos de 5, 12, 15, 17 e 19 DAO as sementes foram abertas com o auxílio de um bisturi para a retirada das larvas que foram avaliadas quanto ao ganho de peso e sobrevivência. As larvas coletadas em cada um dos tempos foram armazenadas a -70 °C e utilizadas em experimentos posteriores.

3.4- Fixação e marcação dos embriões de insetos com DAPI

Os experimentos de fixação e marcação de embriões seguiram a metodologia previamente descrita por (DE SÁ et al., 2014). Sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* foram infestadas com fêmeas de 2 DAO por 4 h a 28 °C em B.O.D. Nos tempos de 24, 48 e 72 HAO foram retirados 70 e 120 g de sementes de *V. unguiculata* e *C. ensiformis*, respectivamente, e colocadas em frascos contendo 150 mL de cloro comercial (2-2,5 % de hipoclorito de sódio). As sementes foram agitadas levemente por 30 seg para a digestão do exocórtion (camada mais externa da casca do ovo) para possibilitar o descolamento do ovo da superfície do tegumento. Os ovos foram recuperados com o auxílio de uma peneira (Falcon cell strainer-70 µm Nylon mesh, Becton Dickinson). Os ovos retidos pela peneira foram recolhidos com o auxílio de um pincel de cerdas finas. Em seguida, colocados em frascos contendo uma solução fixadora formada por: 3,8 mL de PBST (tampão fosfato de sódio 0,15 M, Tween 20 0,05 %, pH 7,6), 1,2 mL de formaldeído 37 % e 5 mL de heptano. A mistura foi agitada em uma plataforma rotatória a 220 rpm por 1h. Após repouso de 5 min a fase inferior (contendo PBST e formaldeído) foi retirada e 8 mL de metanol resfriado a -20 °C foram adicionados ao tubo, seguido de vigorosa agitação manual por 40 seg. A solução foi removida e os ovos contendo os embriões fixados foram lavados com metanol por três vezes. Para a retirada dos embriões do interior dos ovos, os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por 10 segundos e agitados vigorosamente. Este procedimento foi repetido duas vezes.

3.4- Fixação e marcação dos embriões de insetos com DAPI

Os experimentos de fixação e marcação de embriões seguiram a metodologia previamente descrita por (DE SÁ et al., 2014). Sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* foram infestadas com fêmeas de 2 DAO por 4 h a 28 °C em B.O.D. Nos tempos de 24, 48 e 72 HAO foram retirados 70 e 120

g de sementes de *V. unguiculata* e *C. ensiformis*, respectivamente, e colocadas em frascos contendo 150 mL de cloro comercial (2-2,5 % de hipoclorito de sódio). As sementes foram agitadas levemente por 30 seg para a digestão do exocórtion (camada mais externa da casca do ovo) para possibilitar o descolamento do ovo da superfície do tegumento. Os ovos foram recuperados com o auxílio de uma peneira (Falcon cell strainer-70 µm Nylon mesh, Becton Dickinson). Os ovos retidos pela peneira foram recolhidos com o auxílio de um pincel de cerdas finas. Em seguida, colocados em frascos contendo uma solução fixadora formada por: 3,8 mL de PBST (tampão fosfato de sódio 0,15 M, Tween 20 0,05 %, pH 7,6), 1,2 mL de formaldeído 37 % e 5 mL de heptano. A mistura foi agitada em uma plataforma rotatória a 220 rpm por 1h. Após repouso de 5 min a fase inferior (contendo PBST e formaldeído) foi retirada e 8 mL de metanol resfriado a -20 °C foram adicionados ao tubo, seguido de vigorosa agitação manual por 40 seg. A solução foi removida e os ovos contendo os embriões fixados foram lavados com metanol por três vezes. Para a retirada dos embriões do interior dos ovos, os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por 10 segundos e agitados vigorosamente. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Para a análise da morfologia embrionária em microscópio de fluorescência, os embriões foram marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Os embriões foram reidratados com tampão PBST, seguidos de três lavagens com mesmo tampão. Após isso, uma solução de DAPI de 5 µg/ml de tampão PBST foi adicionada aos embriões que foram incubados por 10 min a -4°C. Os embriões marcados foram lavados novamente com PBST e visualizados ao microscópio de fluorescência.

3.5- Quantificação de proteínas em embriões e larvas

Ovos de diferentes horas após a oviposição (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 HAO) foram retirados da superfície dos tegumentos individualmente com o auxílio de uma agulha e colocados em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1M; NaCl 0,15M, pH 7,2), na proporção de 1,3 ovos/µL. Larvas com 5, 12, 15 e 17 DAO foram retiradas das sementes com o auxílio de uma agulha ou bisturi e maceradas em tampão PBS na proporção de 10 mg/mL. Todos os extratos foram macerados manualmente por 1 min com pistilo, agitados por 30 min a 4 °C e centrifugados por 5 min a 10000 x g a 4 °C. Os sobrenadantes dos ovos e larvas

foram submetidos a dosagem de proteínas de acordo com o método de (SMITH et al., 1985) usando ácido bicinconínico (BCA). As absorvâncias foram medidas a 560 nm e para a determinação da concentração foi utilizada uma curva de albumina sérica bovina pura (BSA) como padrão.

3.6- Quantificação de aminoácidos livres em ovos

Ovos de diferentes períodos de desenvolvimento (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 HAO) foram coletados em uma solução de HCl 0,02 M na proporção de 1,3 ovos/ μ L. A solução contendo os ovos foi centrifugada por 10500 x g por 10 min a 4 °C, macerada por 2 min e centrifugada a 10000 x g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante foi utilizado nas análises de aminoácidos livres seguindo metodologia de (SMITH et al., 1985). Os aminoácidos foram detectados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) num cromatógrafo Shimadzu modelo LC- 10AD, equipado com coluna de troca catiônica (Amino-Na) e detector de fluorescência. A coluna foi submetida a um fluxo de 0,5 mL/min e eluição com um gradiente crescente de pH, de acordo com instruções do fabricante.

Os aminoácidos foram detectados por fluorescência de excitação/emissão de 350 nm e 450 nm, respectivamente, utilizando derivatização pós-coluna empregando uma solução 0,08 % de ortoftaldialdeído (OPA) em tampão carbonato de sódio. A coluna foi padronizada com uma mistura de aminoácidos contendo 500 pmoles de cada um dos aminoácidos ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), treonina (Thr), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), arginina (Arg), serina (Ser), isoleucina (Ile) e glutamina (Gln).

3.7- Quantificação de triacilgliceróis em ovos e larvas

Ovos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 HAO (1,3 ovos/ μ L) e larvas com 5, 12, 15 e 17 DAO (10 mg/mL) foram macerados manualmente com pistilo em solução aquosa de Tween 20 (0,005%), agitados por 1 h a 4 °C e centrifugados por 5 min a 2000 x g (HILDEBRANDT; BICKMEYER; KÜHNLEIN, 2011). Os sobrenadantes foram diluídos 10x com solução aquosa de Tween 20 e alíquotas de 25 μ L foram utilizadas para as dosagens utilizando o Kit Triglicérides 120

(Doles), seguindo as recomendações do fabricante. As absorvâncias foram lidas a 510 nm e as concentrações determinadas usando-se uma curva de glicerol como padrão.

3.8- Quantificação de glicose livre em ovos e larvas

Ovos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 HAO (1,3 ovos/ μ L) e larvas com 5, 12, 15 e 17 DAO (10 mg/mL) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,4, agitados por 30 min a 4 °C e centrifugados a 3800 x g por 2 min a 4 °C, onde 15 μ L de cada sobrenadante foram utilizados no ensaio. O conteúdo de glicose foi quantificado enzimaticamente pelo método da glicose oxidase, utilizando o Kit Glucox 500 (Doles), seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi incubada por 30 min a 37°C e as absorvâncias lidas a 510 nm. O conteúdo de glicose foi determinado utilizando como referência uma curva padrão de glicose pura.

3.9- Quantificação de glicogênio em ovos e larvas

A quantificação de glicogênio foi feita de acordo com (MORAES et al., 2007). Ovos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 HAO (1,3 ovos/ μ L) e larvas com 5, 12, 15 e 17 DAO (10 mg/mL) foram macerados agitados e centrifugados de acordo com o item 3.8. Alíquotas de 5 μ L de cada sobrenadante foram adicionadas a 20 μ L de solução contendo a enzima α -amiloglucosidase (1,0 mg/mL) e a reação foi incubada a 40 °C por 4 h. Posteriormente, os tubos foram avolumados até 250 μ L com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 e misturados a 250 μ L do reagente Glucox (15 mg/mL em PBS pH 7,4). A reação foi incubada a 37 °C por 10 min e as absorvâncias lidas a 510 nm. O conteúdo de glicogênio foi determinado através de uma curva padrão de glicogênio submetida às mesmas condições do ensaio.

3.10- Determinação das atividades de enzimas digestivas das larvais

3.10.1- Extração das enzimas das larvas

Larvas que desenvolveram em sementes naturais com 5, 12, 15 e 17 DAO e em sementes artificiais (15 ou 20 DAO) foram homogeneizadas em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 7,6) na proporção de 10 mg/mL e

agitadas por 30 min a 4 °C e centrifugadas a 1700 x g por 5 min a 4 °C. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados como fontes enzimáticas para os ensaios de atividade de proteases cisteínicas e α -amilase.

Para a obtenção dos extratos para os ensaios de α -glucosidases, as larvas foram maceradas em água destilada na proporção de 10 mg/mL e submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e maceração. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 18000 x g após cada ciclo. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados diluídos em uma solução de 0,1% NP-40, fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, imidazol 5 mM, PMSF (flúor fenilmetanossulfonil) e benzamidina 1 mM. As amostras foram incubadas por 12 h sob agitação a 4 °C, centrifugados a 18000 x g por 30 min a 4 °C e os sobrenadantes usados nos experimentos.

Para os ensaios de proteases aspárticas, as larvas foram maceradas em tampão acetato de sódio 0,2M pH 3,5 e agitadas por 15 minutos a 4°C na proporção de 10 mg/mL. As amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram usados para os ensaios.

3.10.2- Quantificação da atividade de proteases cisteínicas

A atividade de próteses cisteínicas foi determinada de acordo com o método de (MICHAUD et al., 1994). A azocaseína utilizada como substrato foi preparada a uma concentração de 1 % em tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6). Uma alíquota de 30 μ L do extrato larval foi incubada com 80 μ L da solução de azocaseína e 10 μ L do tampão citrato-fosfato por 1 h a 37 °C. A reação foi parada com a adição de 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram centrifugadas por 2 min a 3000 x g e 350 μ L do sobrenadante foram misturados a 300 μ L de NaOH 1 M. A leitura foi feita em comprimento de onda de 440 nm. A atividade de proteases cisteínicas foi calculada utilizando uma curva padrão de papaína pura.

3.10.3- Quantificação da atividade de α -amilases

A determinação da atividade da enzima α -amilase foi feita através da metodologia descrita por (MILLER, 1959), com modificações utilizando o reativo

de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). O ensaio foi inicialmente constituído de 44 μL do extrato larval + 6 μL de uma solução de amido 1 %, incubados a 37 °C por 45 minutos e então foram adicionados 100 μL do reativo de DNS. As soluções foram fervidas durante 5 min e mais 100 μL de água destilada foram acrescentados a cada mistura. As absorbâncias foram lidas a 540 nm. Para os ensaios foram feitos três brancos: o branco do reagente DNS (50 μL de tampão fosfato de potássio); o branco da solução de amido 1 % (44 μL de tampão fosfato de potássio, 6 μL da solução de amido 1 %) e os brancos das amostras (50 μL de cada amostra). As absorbâncias dos brancos foram diminuídas das absorbâncias das amostras. Para quantificar a atividade de α -amilases foi feita uma curva padrão utilizando maltose.

3.10.4- Quantificação da atividade de α -glucosidases

A atividade de α -glucosidases foi determinada de acordo com (MILLER, 1959), usando p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (NP α Glu) como substrato. Uma solução de 10 mM NP α Glu foi preparada em tampão citrato fosfato 100 mM, pH 5,5. Uma alíquota de 25 μL do extrato larval foi diluída em água (1:10) e adicionados 25 μL da solução de NP α Glu. As reações foram incubadas a 30 °C por 15, 30, 45 ou 60 min e paradas com 200 μL de tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,2. A atividade de α -glucosidase foi medida indiretamente pela quantificação do produto, o p-nitrofenolato, resultante da hidrólise de NP α Glu, que absorve luz em um comprimento de onda de 410 nm.

3.10.5- Quantificação da atividade de proteases aspárticas

A atividade de proteases aspárticas foi determinada de acordo com o método de (LEMOS et al., 1990) utilizando hemoglobina como substrato. Uma solução de hemoglobina 1% foi diluída em tampão ácido (acetato de sódio 0,2 M, ácido clorídrico 0,06 M, pH 3,5). Uma alíquota de 50 μL de extrato larval foi adicionada a 50 μL de tampão ácido. A reação foi iniciada pela adição de 500 μL da solução de hemoglobina, mantida a 40 °C por 1 h e parada pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. Após 30 minutos, a suspensão foi centrifugada a 7000 x g por 20 min a temperatura ambiente. Foram adicionados a 200 μL do sobrenadante 20 μL de uma solução de hidróxido de sódio 2 M e a

absorbância foi lida a 750 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma absorbância de 0,100.

3.11- Isolamento de vicilinas do tegumento de *C. ensiformis*

Sementes de *C. ensiformis* foram descascadas e os tegumentos foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um grau e pistilo, resultando em uma farinha fina que foi usada para o isolamento de uma fração rica em vicilinas, de acordo com metodologia descrita por (MACEDO et al., 1993). Proteínas da farinha foram extraídas na proporção de 1:10 em tampão PBS (fosfato de sódio 100 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,6) sob agitação por 1 h a 4 °C. O extrato foi centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio (0-70 %) e deixado em repouso por 12 h a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi novamente precipitado de 70-90 % de saturação com sulfato de amônio. O extrato foi deixado em repouso por 12 h a 4 °C e centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 20 min. O precipitado resultante foi diluído em PBS, dialisado contra água destilada por 72 h e liofilizado. A fração resultante, rica em vicilinas, foi denominada F70-90 e usada para os experimentos posteriores.

3.12- Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting*

As proteínas totais solúveis de ovos durante o desenvolvimento embrionário foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % contendo SDS segundo metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970) com modificações. A eletroforese foi realizada utilizando um gel de empacotamento formado por SDS 0,1 %; acrilamida 5 %; bis-acrilamida 0,25 %; Tris-HCl 0,75 M, pH 6,8; TEMED 0,04 % e persulfato de amônio 0,08 % e um gel de separação contendo SDS 0,1 %; acrilamida 12 %; bis-acrilamida 0,06 %; Tris-HCl 0,375 M, H 8,8; TEMED 0,02 % e persulfato de amônio 0,5 %.

Para a extração das proteínas das amostras inicialmente 50 ovos de diferentes horas após a oviposição (HAO) foram macerados manualmente em 50 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, azul de bromofenol 1 %, pH 6,8, agitados por 30 min à 4 °C e centrifugadas a 7000 x g por 5 min. O sedimento foi descartado e 25 µL do sobrenadante foram então aplicadas em cada poço do gel de empacotamento.

A eletroforese foi efetuada em ambiente de tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) por aproximadamente 2 h com uma voltagem de 60 V, para corrida no gel de empacotamento e 80 V no gel de separação. O gel foi corado com uma solução corante (0,9 g de azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 mL de ácido acético) e descorado por uma solução descorante (35 % de metanol e 10 % de ácido acético).

Para a comprovação da presença de proteínas imunorrelacionadas à vicilinas na fração F70-90, as proteínas da fração foram visualizadas em um gel de poliacrilamida 10 % contendo SDS (nas mesmas condições descritas acima) e posteriormente submetidas a *Western blotting* de acordo com a metodologia de (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Para a eletroforese, uma alíquota de 10 µL de F70-90 foi adicionada à 5 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, azul de bromofenol 1 %, pH 6,8 e aplicados no gel de empacotamento. Um extrato proteico de cotilédone de sementes de *V. unguiculata* (controle positivo de vicilinas) foi preparado com 1 mg de farinha de cotilédones em 5 mL de tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 7,2), agitado por 1 h a 4 °C, centrifugado a 1700 x g por 5 min a 4 °C. Um µL do sobrenadante foram misturados com 5 µL do tampão de amostra e aplicados no gel. Foram feitos dois géis semelhantes para coloração e outro para o *Western blotting*.

Após a eletroforese, o gel não corado foi transferido para membrana de nitrocelulose. O sanduíche de transferência foi montado em sistema semi-seco usando-se três pedaços de papel filtro (3 mm) com dimensões 8,6 x 13,5 cm. Os papéis e a membrana foram equilibrados por 20 min com tampão Tris 25 mM, glicina 192mM e metanol 20 %, pH 8,0. O sanduiche foi composto por uma folha de papel, seguido da membrana, o gel e as outras duas folhas. O sistema foi fechado e a transferência ocorreu em uma voltagem de 23 V por 3 h.

Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 h em tampão bloqueador (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6 contendo 2 % de leite em pó desnatado), à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 10 min com PBS (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,2) e incubada por 12 h a 4 °C com o anticorpo anti-vicilina de cotilédone de *V. unguiculata* (cv. EPACE 10), produzido em coelho e diluído em tampão bloqueador (1:2000). A membrana foi lavada com PBS por 1 h e incubada com o anticorpo anti-IgG de coelho

complexado com peroxidase em uma diluição de 1:1000, por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente com PBS por 1 h e a reação revelada com solução composta por 5 mg de DAB (diaminobenzidina) dissolvidos em 5 mL de uma solução composta de 100 µL de tampão Tris-HCl 2 M (pH 7,5), 300 µL de imidazol 0,1 M, 4,9 mL de água destilada e 5 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), colocado imediatamente no momento da revelação. A solução reveladora foi deixada em contato com a membrana até o aparecimento das bandas. A reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

3.13- Marcação de proteínas com isotiocianato de fluoresceína-FITC

Proteínas da farinha dos tegumentos de *C. ensiformis* e proteínas da fração F70-90 foram complexadas com FITC, segundo metodologia descrita por (DE SÁ et al., 2014).

Proteínas da farinha do tegumento de *C. ensiformis* foram extraídas em tampão bicarbonato de sódio (0,75 M, pH 9,5) sob agitação a 4 °C por 1 h. O extrato foi centrifugado a 2000 x *g* por 5 min a 4 °C e a quantificação de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de (SMITH et al., 1985).

As proteínas da fração F70-90 foram resuspendidas em tampão bicarbonato de sódio na proporção de 8,5 mg/mL, dosadas e reservadas para marcação com FITC.

Para marcação das proteínas, uma solução de FITC em DMSO (dimetilsulfóxido) foi misturada com o extrato dos tegumentos (sobrenadante + precipitado) ou da F70-90, na proporção de 5 mg de FITC para 1 mg de proteína. A mistura foi agitada levemente por 1 h à temperatura ambiente e dialisada contra água destilada por 48 h à 4 °C. A amostra foi liofilizada e o pó resultante foi utilizado para os experimentos.

3.14- Sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais

As sementes artificiais foram confeccionadas de acordo com o método descrito por (DE SÁ et al., 2014). Foram feitas sementes artificiais cobertas com três tipos de tegumentos artificiais. Os dois primeiros foram feitos com diferentes concentrações de farinha de tegumento de *C. ensiformis* não marcadas (10, 20,

40, 60, 80 e 100 %) e marcada com FITC (40 e 60 %). Essas frações foram misturadas a uma farinha de cotilédone de *V. unguiculata* na proporção desejada para constituírem o tegumento artificial. Em ambos os casos, foram utilizados como controle tegumentos artificiais confeccionados exclusivamente com farinha de cotilédone de *V. unguiculata*.

No terceiro tipo o tegumento artificial foi feito com 2 % da fração F70-90 marcada com FITC misturado a farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. Para esse tegumento artificial, foram utilizados dois tipos de controle, contendo farinha de cotilédone de *V. unguiculata* não marcada ou marcada com FITC.

Para a construção da semente, em um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm) foram colocados inicialmente 20 mg das misturas referentes aos tegumentos artificiais e em seguida mais 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. O molde foi prensado em uma prensa manual, resultando na semente artificial coberta com tegumento artificial em um dos seus lados. As partes da semente não cobertas pelo tegumento artificial foram cobertas com *parafilm* antes da oviposição.

Cada semente foi colocada em um tubo de ensaio de vidro com a parte do tegumento artificial voltada para cima e infestada com duas fêmeas de 2 DAO. Após 24 h de infestação, as sementes foram desinfestadas, o número de ovos contados e o excesso removido, deixando apenas três ovos sob o tegumento. O desenvolvimento embrionário e larval foi acompanhado diariamente por até 20 DAO.

Sementes com o tegumento artificial contendo farinha de tegumento de *C. ensiformis* marcada ou não com FITC foram abertas com 15 DAO, enquanto as sementes cobertas com as frações F70-90 foram abertas com 20 DAO. As larvas sobreviventes foram pesadas, estocadas a -70 °C para análise da atividade enzimática ou ainda imediatamente dissecadas para análise em microscopia de fluorescência.

3.15- Experimentos *in silico* de docking de vicilinas com *N*-acetilglicosamina

Para os experimentos de modelagem e docking inicialmente usou-se como referência a sequência do peptídeo SLREEEESQDNDFYF obtida por (OLIVEIRA et al., 1999) referente a vicilina isolada do tegumento de *C.*

ensiformis. Essa sequência foi submetida a análise por BLASTp contra o banco de dados do Protein Data Bank (PDB) utilizando os parâmetros de configuração padronizados pela ferramenta. Este método permitiu selecionar o cristal com maior similaridade ao peptídeo. Posteriormente foi utilizada a ferramenta Template Identification, hospedada no servidor de modelagem SWISS-MODEL para identificar estruturas candidatas em *C. ensiformis* (BIASINI et al., 2014) levando em consideração a identidade da sequência, cobertura e resolução do cristal (apenas cristais com resolução inferior a 3Å foram considerados). Após a análise foram selecionadas a sequência da vicilina de *Phaseolus vulgaris*, faseolina (2PHL) descrita por (LAWRENCE et al., 1994) e da vicilina de *C. ensiformis*, canavalina (1CAV) de acordo com (KO et al., 1993). As sequências de 2PHL e 1CAV foram submetidas a análise pelo ELM (Eukaryotic Linear Motif) (DINKEL et al., 2014) para a procura de *motifs* de interação com N-acetilglicosamina. Os experimentos de *docking* foram feitos utilizando o programa Autodock v4.2.6 (MORRIS et al., 2009). Nos parâmetros de configuração foi criado um grid de 55x55x55 (x, y e z) centralizado no resíduo de Asp-261, utilizando o átomo de nitrogênio ND2 (coordenadas 14.028, 33.325 e 16.287 x, y e z respectivamente). O grid é utilizado para delimitar a região de influência do cálculo, considerando apenas os resíduos dentro da área delimitada pela caixa criada no grid. As soluções do *docking* foram visualizadas e registradas utilizando PyMOL v1.3 (Schrodinger LLC) com o plugin Autodock (MORRIS et al., 2009).

3.16- Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com um mínimo de duas repetições independentes e os dados apresentados são a média e desvio padrão calculados baseados em todas as repetições. O cálculo da média e desvio e os tratamentos estatísticos foram feitos utilizando o programa Graph-Pad Prism 5.0. Médias com diferenças estatísticas com relação aos seus controles estão indicadas por *.

4- Resultados

4.1- Performance de *C. maculatus* durante a oviposição, penetração e sobrevivência em sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*

Sementes naturais de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* foram infestadas e após 24 h o número de ovos postos foi contabilizado. Os resultados mostraram que houve uma redução de aproximadamente 45 % no número de ovos postos sobre o tegumento de *C. ensiformis* (7,4 ovos/semente) quando comparado com o número de ovos sobre os tegumentos de *V. unguiculata* (13,9 ovos/semente) (Figura 7A).

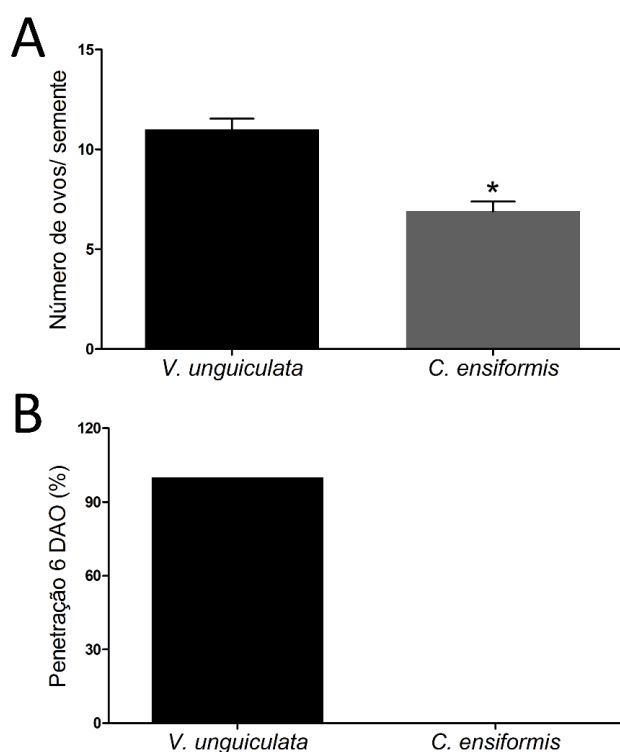


Figura 7: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* na oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*. **A:** Número de ovos postos sobre os tegumentos naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* após 24 horas de infestação. **B:** Porcentagem de larvas que penetraram os tegumentos de naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* em 6 dias após a oviposição (DAO). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Quando analisada a penetração das larvas ao longo de 6 DAO, os resultados mostraram que enquanto 100 % das larvas penetraram o tegumento de *V. unguiculata*, nenhuma penetração foi observada nos tegumentos de *C. ensiformis* (Figura 7B).

A visão macroscópica dos ovos mostrou que 7 DAO os ovos sobre o tegumento de *V. unguiculata* apresentavam uma coloração branca, indicativo da presença de farinha dentro dos ovos. A deposição dessa farinha dentro dos ovos é resultado da escavação das larvas. Nesse mesmo tempo não se observa mais a larva dentro dos ovos (Figura 8A).

Nos ovos postos sobre os tegumentos de *C. ensiformis* as larvas permaneceram dentro dos ovos em todo o período avaliado, de 5 até 17 DAO (Figura 8B). Quando retiramos os ovos de *C. maculatus* de 17 DAO sobre o tegumento de *C. ensiformis* foi possível confirmar a presença da larva parcialmente dentro do ovo (Figura 8C a-d), comprovando que nenhuma larva eclodiu completamente, embora grande parte estivesse viva até 17 DAO.

Quando avaliada especificamente a sobrevivência nesse período, os resultados mostraram que larvas que se desenvolveram sobre os tegumentos de *V. unguiculata* tiveram uma sobrevivência próxima a 100 % durante o período do 5º ao 19º DAO. Por outro lado, a sobrevivência de larvas sobre os tegumentos de *C. ensiformis* diminuiu ao longo do tempo, apresentando uma redução de aproximadamente 25 % no 17º DAO e de cerca de 95 % no 19º DAO (Figura 8D). Larvas que se desenvolveram sobre o tegumento de *V. unguiculata*, por volta do 7º DAO já haviam penetrado totalmente o tegumento enquanto no 17º DAO larvas que se desenvolveram sobre o tegumento de *C. ensiformis* ainda tentavam a penetração.

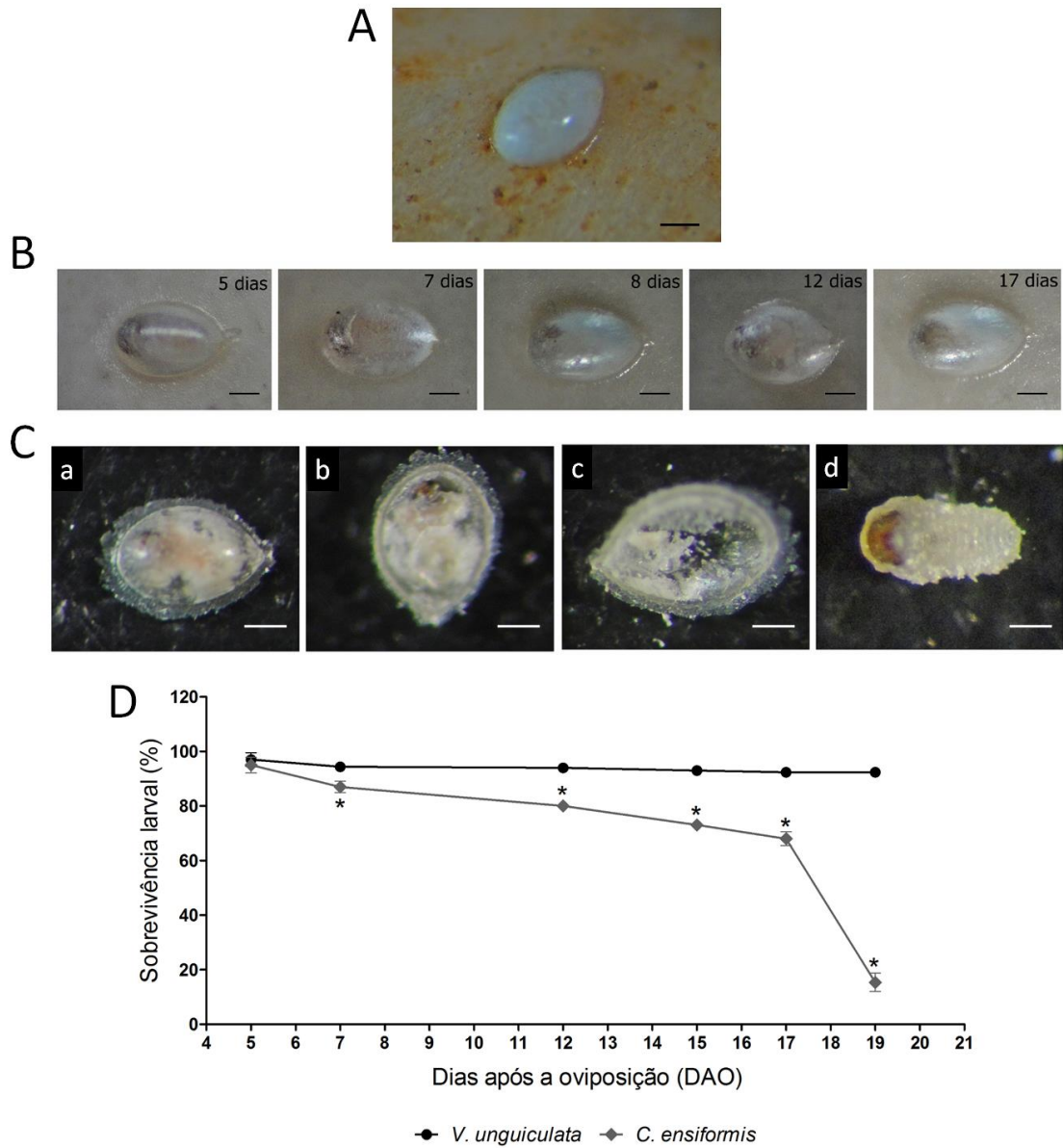


Figura 8: Penetração e sobrevivência de larvas de *Callosobruchus maculatus* em sementes de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. **A: Ovo de *C. maculatus* com sete dias após a oviposição (DAO) sobre o tegumento de *V. unguiculata*; **B:** Acompanhamento da tentativa de travessia do tegumento de *C. ensiformis* por larvas de *C. maculatus*; **C:** Ovo de *C. maculatus* 17 dias após a oviposição (DAO) extraído do tegumento natural de *C. ensiformis*. **a:** Ovo na visão dorsal, **b:** Ovo na visão ventral **c:** Ovo na visão ventral sem a larva **d:** Larva extraída de dentro do ovo. Barras brancas ou pretas= 0,1 mm. **D:** Interferência dos tegumentos naturais de *Canavalia ensiformis* e *Vigna unguiculata* na sobrevivência larval. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).**

4.2- Morfologia dos embriões de *Callosobruchus maculatus* desenvolvidos sobre tegumentos de sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*

Embriões do inseto *C. maculatus* desenvolvidos sobre sementes de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* foram marcados com DAPI e analisados por microscopia de fluorescência (Figura 9).

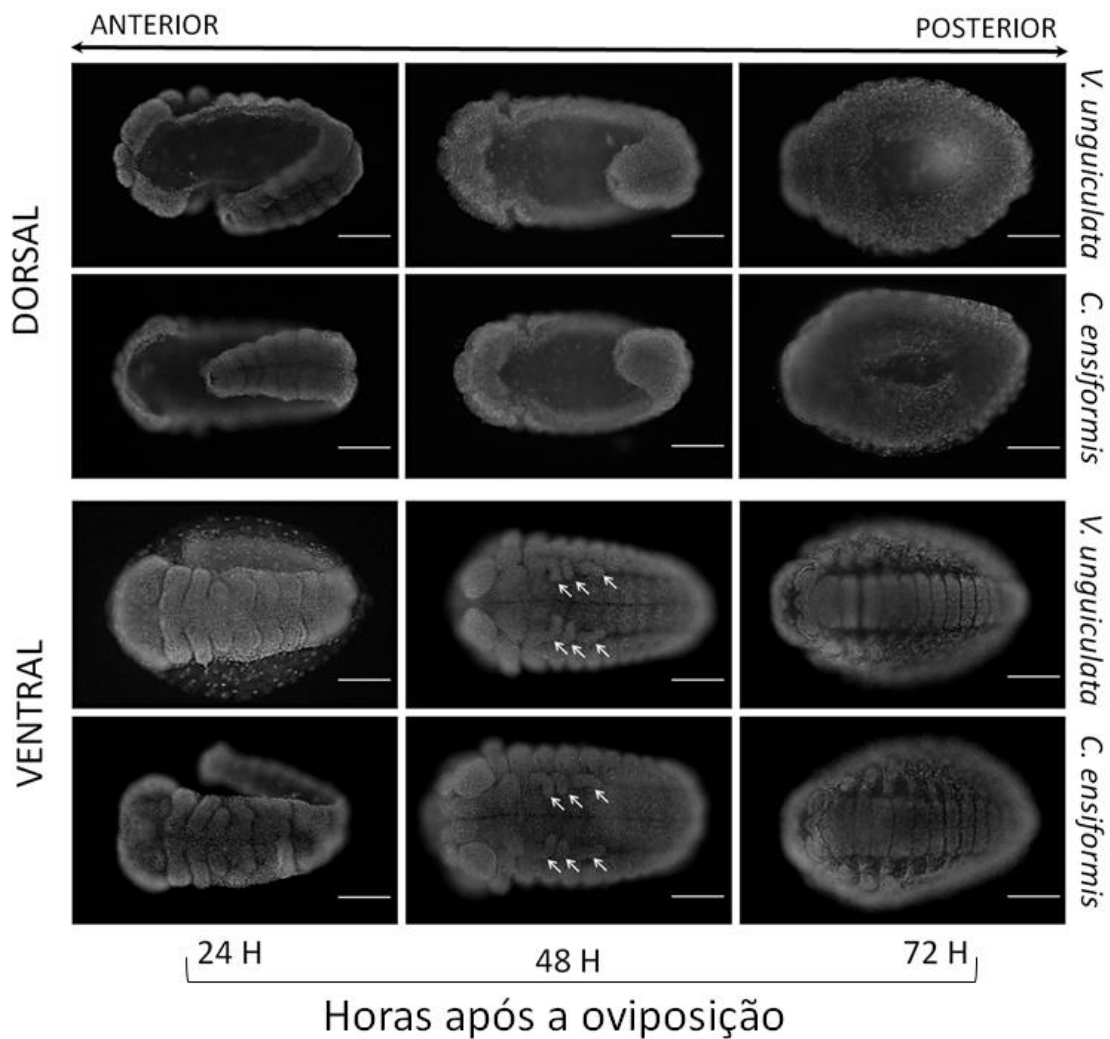


Figura 9: Desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre os tegumentos das sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Microscopia ótica de fluorescência, usando DAPI como corante, do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a oviposição (HAO). Setas brancas apontam os apêndices de patas. Barra de escala = 50 μ m.

A morfologia dos embriões foi comparada com a embriogênese do *C. maculatus* previamente descrita por De Sá et al., (2014) (Figura 5). Sobre o tegumento de *V. unguiculata*, no período de 24 e 48 HAO, os embriões estavam no processo de início e final da retração da banda germinal, respectivamente. O fechamento dorsal ainda incompleto foi visualizado em embriões com 72 HAO (Figura 9-visão dorsal). Ventralmente, durante os processos de extensão/retração da banda germinal e fechamento dorsal, os segmentos torácicos tornaram-se gradualmente mais definidos, onde em 48 HAO os apêndices das patas são perceptíveis (Figura 9-visão ventral). Quando comparadas as morfologias dos embriões de *C. maculatus* sobre os tegumentos de *V. unguiculata* (semente hospedeira) e *C. ensiformis*, nenhuma alteração morfológica foi observada (Figura 9). Esses resultados indicam que o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* observado nesse trabalho está de acordo com o previamente descrito (DE SÁ et al., 2014) e que o tegumento de *C. ensiformis* não interferiu na morfologia do embrião.

4.3- Dinâmica energética de embriões de *Callosobruchus maculatus* desenvolvidos sobre sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*

Inicialmente foi feita a visualização do perfil proteico de ovos de *C. maculatus* durante o desenvolvimento embrionário através de eletroforese em gel de poli-acrilamida 10 % (Figura 10). Em ambos os ovos, sobre tegumentos de *V. unguiculata* (Figura 10A) ou *C. ensiformis* (Figura 10B) foram observados perfis proteicos similares, com duas bandas principais de aproximadamente 150 e 45 kDa, que estiveram presentes em todos os intervalos de tempo analisados, diminuindo de intensidade progressivamente até o final da embriogênese em 96 HAO (Figura 10).

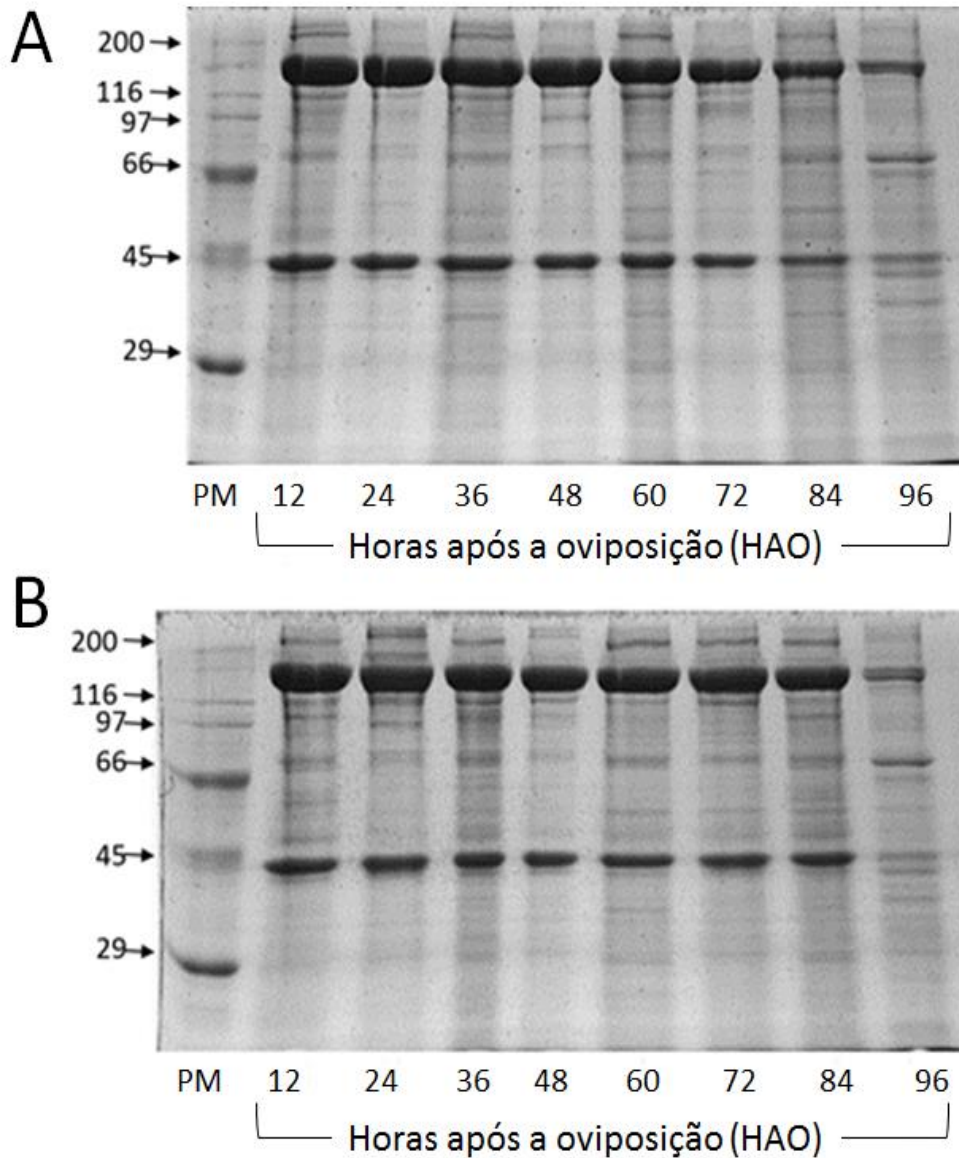


Figura 10: Perfil proteico de embriões de *Callosobruchus maculatus* desenvolvidos sobre tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Visualização por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) de proteínas totais solúveis durante o desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes naturais de *Vigna unguiculata* (A) e *Canavalia ensiformis* (B). Pesos moleculares em kilodaltons (PM): Miosina (200), β -Galactosidase (116), Fosforilase b (97), Albumina Bovina (66), Albumina de ovo (45) e Anidrase Carbônica (29).

Para a avaliação mais detalhada do possível consumo de proteínas, foi feita a quantificação dos níveis de proteínas totais solúveis nos ovos durante o desenvolvimento do embrião sobre ambas as sementes (Figura 11). Os resultados mostraram um perfil de degradação proteica similar em embriões que se desenvolveram sobre tegumentos de *V. unguiculata* e *C. ensiformis*. Nas primeiras 48 HAO ocorreu uma forte redução ($\approx 80\%$) nos níveis proteicos. Esses níveis se mantiveram constantes até 84 HAO, voltando a cair em 96 HAO. No final do processo em 96 HAO, restaram apenas aproximadamente 15% dos níveis proteicos iniciais (Figura 11).

Os resultados das análises de aminoácidos livres em embriões desenvolvidos sobre os tegumentos de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* (Figura 12) também mostraram não haver diferenças no perfil. Em embriões sobre ambos os tegumentos, nas primeiras 48 HAO, os níveis de aminoácidos livres decresceram aproximadamente 50 %. Após esse período, os valores apresentaram um aumento até 60 HAO e novamente sofreram uma redução até 96 HAO (Figura 12).

Quando os aminoácidos foram analisados individualmente, os resultados mostraram que 17 aminoácidos proteicos foram detectados na sua forma livre durante a embriogênese de *C. maculatus*, independente da semente sobre a qual o embrião se desenvolveu. A concentração de muitos desses aminoácidos oscilou durante o desenvolvimento, sendo glutamato o aminoácido majoritário, enquanto prolina, metionina e fenilalanina apresentam as menores concentrações. No período de 4 a 96 HAO os aminoácidos alanina, glicina, histidina e tirosina tiveram seus níveis aumentados, enquanto asparagina, glutamina, treonina, serina e lisina diminuíram durante o mesmo período (Tabela 1).

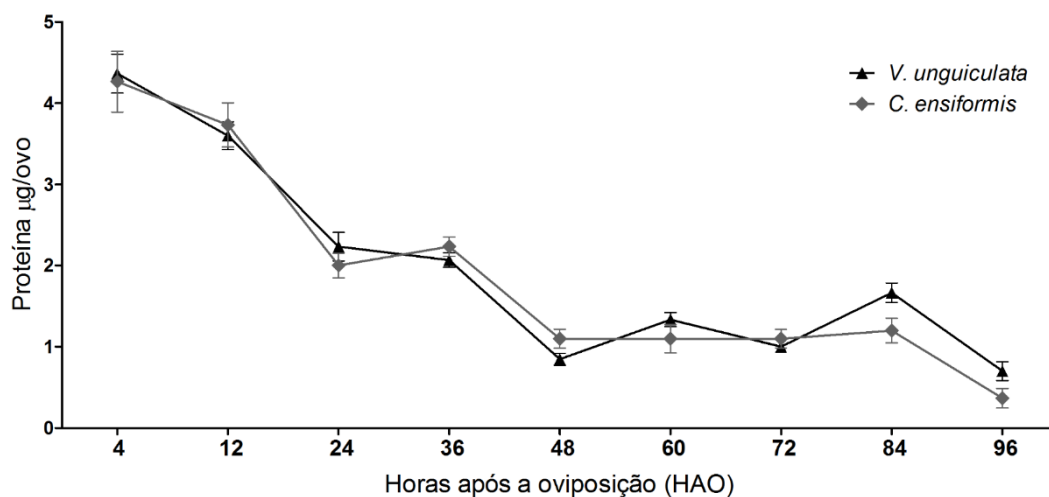


Figura 11: Níveis de proteínas durante a embriogênese de *Callosobruchus maculatus* sobre tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Quantificação dos níveis totais de proteínas solúveis durante o desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes naturais. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

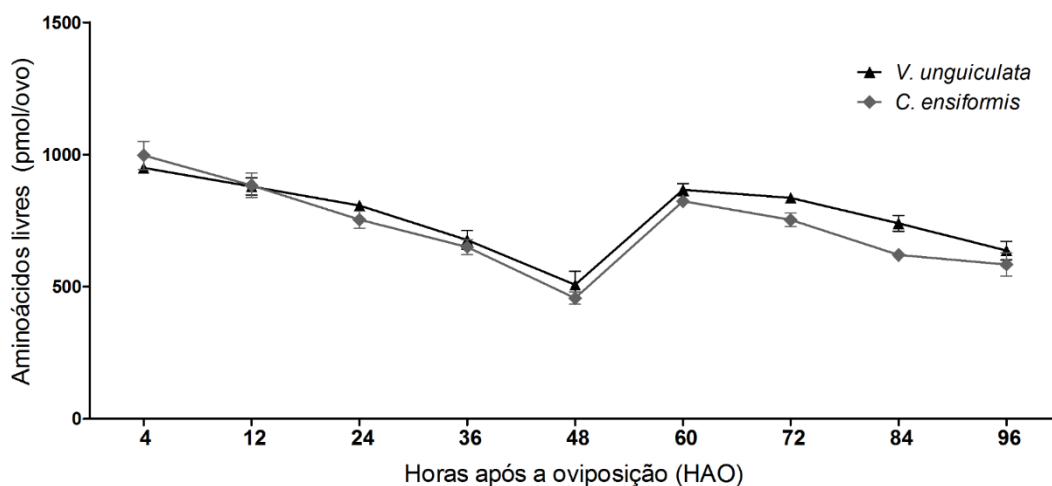


Figura 12: Níveis de aminoácidos livres durante a embriogênese de *Callosobruchus maculatus* sobre tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Quantificação dos níveis de aminoácidos livres totais em sistema de HPLC em embriões desenvolvimento sobre sementes naturais. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

Tabela 1: Porcentagem de cada aminoácido proteico dentro do quantitativo dos aminoácidos livres durante o desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes naturais de *Vigna unguiculata* ou *Canavalia ensiformis*. Os valores são expressos em porcentagem. *= aminoácidos não detectados.

Aminoácidos (%)	Horas após a oviposição sobre <i>V. unguiculata</i>								
	4	12	24	36	48	60	72	84	96
Alanina	4,0	4,4	5,1	5,8	5,8	5,3	6,0	7,4	9,7
Arginina	5,3	2,1	1,7	1,6	1,6	1,6	1,9	1,5	1,2
Asparagina	7,4	10,2	16,5	12,7	12,7	7,8	8,3	7,5	4,4
Fenilalanina	1,5	1,7	2,8	2,3	2,3	1,3	1,4	1,5	2,8
Glicina	0,6	0,9	2,0	4,12	4,12	4,3	3,4	3,5	3,6
Glutamato	28,6	29,5	25,9	24,6	24,6	28,4	28,4	29,8	30,4
Glutamina	7,8	5,4	3,6	3,3	3,3	2,9	2,0	1,9	0,9
Histidina	3,1	3,9	4,8	5,3	5,3	6,3	6,2	9,3	7,8
Isoleucina	1,9	1,7	1,5	1,2	1,2	1,5	1,5	1,7	1,7
Leucina	3,3	2,8	2,1	2,3	2,3	3,0	2,7	3,4	4,4
Lisina	7,7	8,2	7,2	5,9	5,9	3,7	2,5	2,2	3,5
Metionina	2,0	1,9	1,8	2,5	2,5	2,2	1,2	1,4	1,5
Prolina	0 *	0 *	0 *	1,3	1,3	1,1	0,7	0,6	0,9
Serina	10,6	10,4	7,7	6,0	6,0	6,6	4,6	3,9	3,8
Tirosina	6,7	9,8	11,3	15,8	15,8	19,4	24,6	18,5	19,2
Treonina	6,2	4,3	2,9	2,8	2,8	1,9	1,6	1,2	0,3
Valina	3,3	2,8	3,1	2,5	2,9	3,4	3,0	3,8	4,8
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Aminoácidos (%)	Horas após a oviposição sobre <i>C. ensiformis</i>								
	4	12	24	36	48	60	72	84	96
Alanina	4,7	4,1	5,6	6,1	5,2	5,9	6,7	7,1	10,1
Arginina	5,8	3,7	2,5	1,9	1,8	1,7	1,4	1,6	1,1
Asparagina	7,9	10,5	18,5	11,3	16,0	9,8	12,7	9,3	3,9
Fenilalanina	2,1	1,9	2,1	2,0	2,6	1,7	0,9	1,1	2,2
Glicina	0,9	1,0	2,4	4,0	4,7	4,3	3,2	5,9	3,2
Glutamato	26,8	27,5	26,9	29,0	25,8	26,2	24,2	30,1	28,4
Glutamina	6,4	3,4	3,9	3,1	3,0	0,9	2,3	1,5	1,1
Histidina	3,5	3,2	4,2	5,1	5,0	6,7	6,0	9,9	9,1
Isoleucina	1,2	1,6	1,1	1,1	1,0	1,2	1,3	1,7	3,2
Leucina	3,9	2,9	2,0	2,2	2,1	3,5	2,9	2,7	3,9
Lisina	7,3	10,0	7,1	5,2	5,1	3,2	2,3	2,0	5,1
Metionina	2,5	1,2	1,1	2,3	2,1	2,7	1,1	1,9	1,3
Prolina	0 *	0 *	0,1	1,9	1,1	1,0	0,8	0,4	0,2
Serina	10,9	13,0	7,2	6,1	6,2	6,1	4,9	3,3	3,1
Tirosina	5,4	9,0	12,9	15,9	15,2	19,1	24,2	18,2	19,9
Treonina	6,9	4,8	2,1	2,3	2,2	1,1	1,2	1,1	0,6
Valina	3,9	3,2	1,1	1,5	1,9	4,9	3,9	3,2	4,1
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Com relação aos níveis de triacilgliceróis, observou-se uma degradação até o intervalo de 48 HAO, seguido de um aumento até 72 HAO e nova queda até 96 HAO. No final da embriogênese, a concentração desse lipídeo era de aproximadamente 70 % dos níveis iniciais. Esse perfil não mostrou alteração quando comparados os níveis de triacilgliceróis em embriões desenvolvidos sobre *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* (Figura 13).

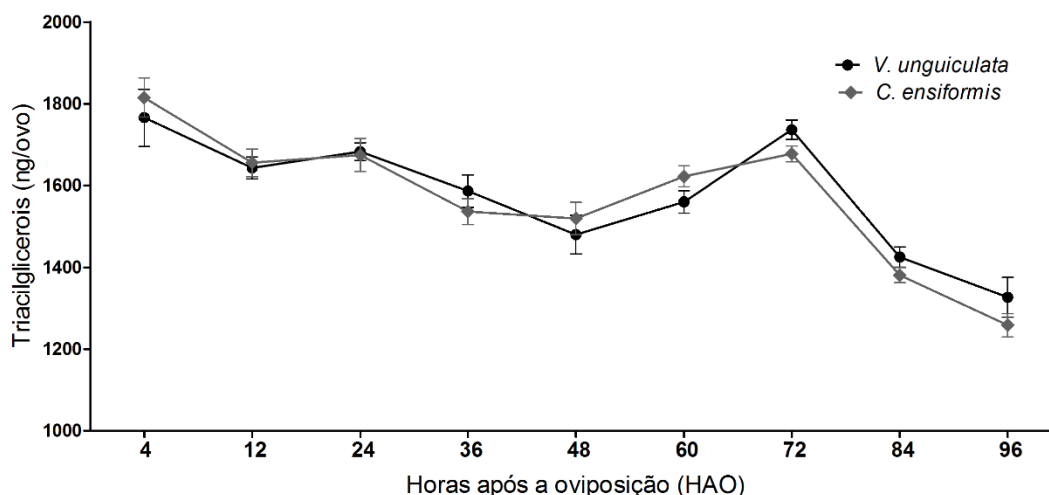


Figura 13: Níveis de triacilgliceróis durante a embriogênese de *Callosobruchus maculatus* sobre tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. A quantificação dos níveis totais de triacilgliceróis foi feita durante o desenvolvimento embrionário sobre sementes naturais utilizando o kit Triglicérides 120 (DOLES). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

Nas concentrações de glicose livre, pode-se observar um aumento próximo a 100 % nas primeiras 24 HAO. Posteriormente, ocorreu um forte consumo de 85 % até 48 HAO e, em seguida, um crescimento gradual dos valores dessa reserva até 96 HAO, chegando a aproximadamente 0,53 $\mu\text{g}/\text{ovo}$ no final da embriogênese (Figura 14A). De maneira contrária, nas primeiras 24 HAO, ocorreu um consumo de aproximadamente 50 % do glicogênio, seguido de um aumento de quase 100 % até 48 HAO. Após esse intervalo de tempo, o consumo de glicogênio foi gradual, restando em 96 HAO, 40 % dos níveis iniciais dessa reserva energética (Figura 14B). Para os conteúdos de glicose e glicogênio também não foram observadas alterações entre os embriões que se desenvolveram sobre nas diferentes sementes.

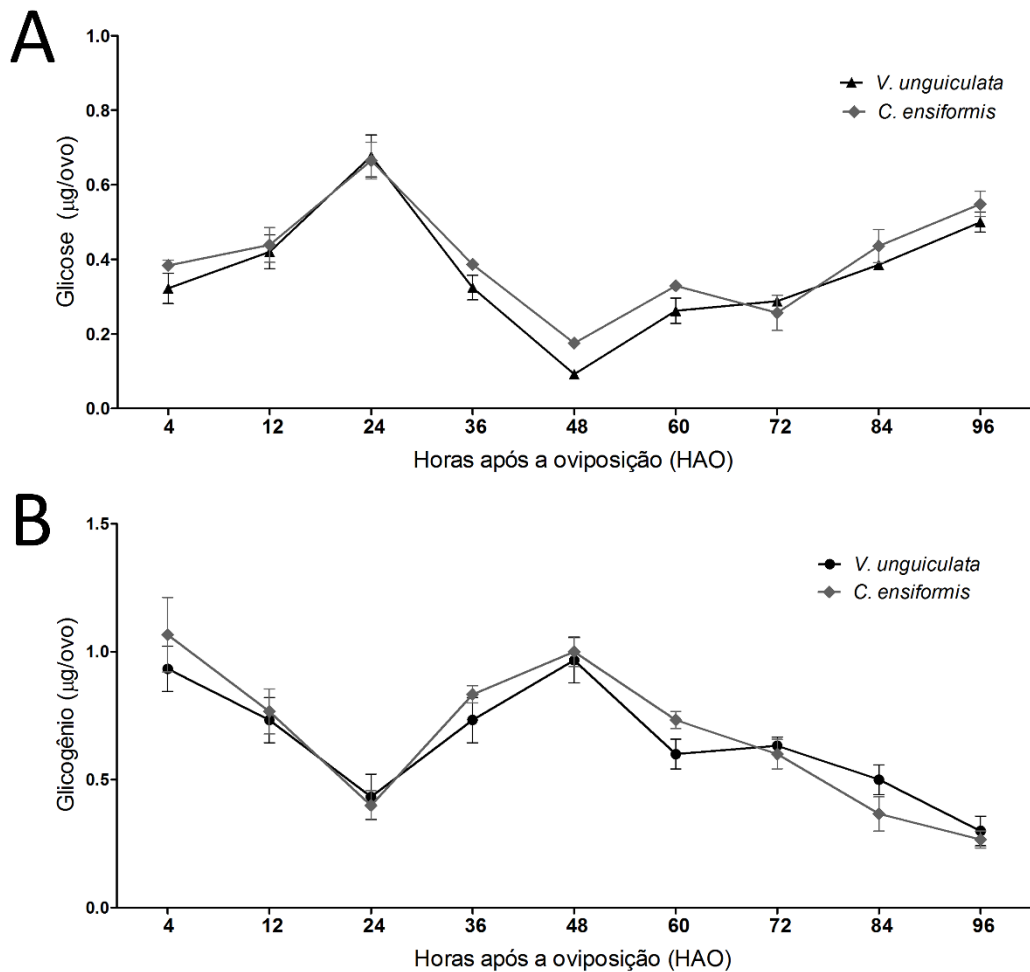


Figura 14: Níveis de glicose livre e glicogênio durante a embriogênese de *Callosobruchus maculatus* sobre tegumentos naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Quantificação dos níveis totais de glicose (A) e glicogênio (B) durante o desenvolvimento embrionário sobre sementes naturais. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

4.4- Desenvolvimento de larvas de *Callosobruchus maculatus* em sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*

Posteriormente, larvas com 5, 12, 15 e 17 DAO sobre os tegumentos de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* foram retiradas de suas respectivas sementes e pesadas. As larvas que se desenvolveram em sementes de *V. unguiculata* tiveram um acentuado ganho de peso, partindo de massas próximas a 0,01 mg no 5º DAO e alcançando valores próximos a 10 mg no 17º DAO (Figura 15). Para as larvas oriundas de ovos postos sobre os tegumentos de *C. ensiformis*, não foram observadas diferenças significativas na massa corporal durante os intervalos de tempo analisados (Figura 15), lembrando que essas larvas não

atravessaram os tegumentos, conseqüentemente não alcançaram os cotilédones. Por outro lado, larvas desenvolvidas em sementes de *V. unguiculata* já estavam se alimentando dos cotilédones desde 7º DAO.

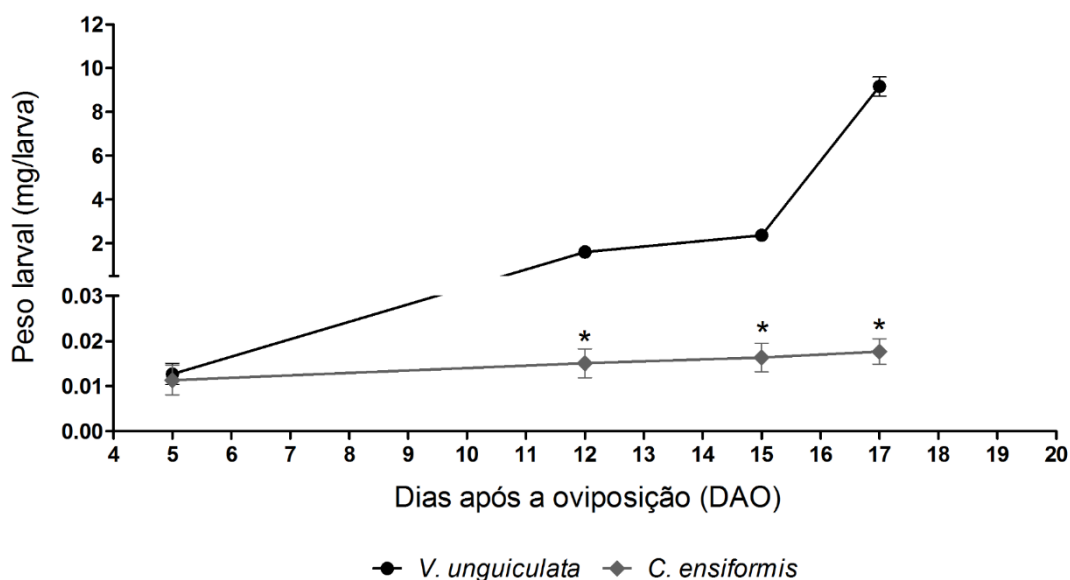


Figura 15: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* na massa de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Massa das larvas que se desenvolveram em sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* de 5 até 17 dias após a oviposição (DAO). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4.5- Dinâmica energética de larvas de *Callosobruchus maculatus* durante o desenvolvimento em sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*

Como demonstrado nos resultados anteriores, o tegumento de *C. ensiformis* não permite a travessia das larvas de *C. maculatus* e subsequente ataque aos cotilédones, entretanto a grande maioria das larvas sobrevive até o 17º DAO. Essa sobrevivência larval, independente da alimentação dos cotilédones, sugere que as larvas possam estar utilizando reservas energéticas próprias para manutenção da vida. Sendo assim os níveis de proteínas, triacilglicerois, glicose e glicogênio larval foram avaliados.

Em larvas que se desenvolveram em sementes de *V. unguiculata*, os níveis proteicos apresentaram um aumento progressivo ao longo do desenvolvimento, iniciando em 70 µg/mg de larva no 5º DAO até 420 µg/mg em

larvas de 17 DAO. As larvas que se desenvolveram sobre as sementes de *C. ensiformis* apresentaram níveis decrescentes de proteínas, restando no 17º DAO aproximadamente 50 % dos níveis iniciais de proteínas das larvas (Figura 16).

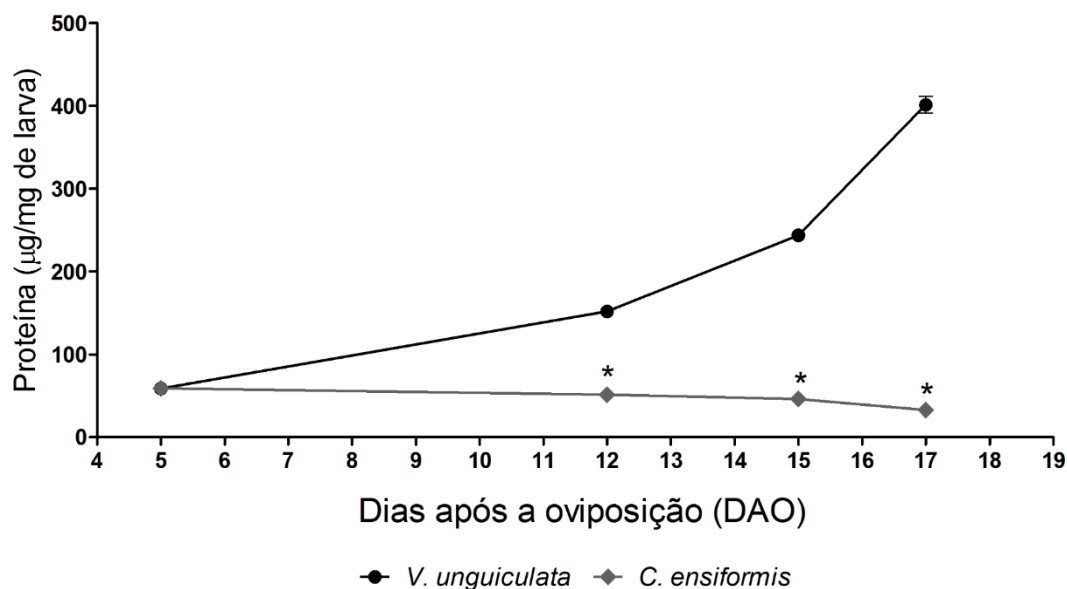


Figura 16: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* nos níveis de proteína de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Quantificação dos níveis de proteína em larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram em sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* em 5, 12, 15 e 17 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

De maneira similar, os níveis de triacilgliceróis em larvas que se desenvolveram em *V. unguiculata* aumentaram ao longo do desenvolvimento larval, principalmente a partir de 12 DAO. Ao longo do tempo estudado, os níveis passaram de 0,32 ng/µg de larva no 5º DAO para próximos de 45 ng/µg de larva nos tempos finais de 15 e 17 DAO. Nas larvas desenvolvidas sobre os tegumentos de *C. ensiformis* os níveis de triacilgliceróis foram sendo consumidos gradualmente até o 17º DAO, restando aproximadamente 30 % dos níveis iniciais no final do desenvolvimento larval (Figura 17).

Quando analisados os níveis de glicose e glicogênio (Figura 18) pode-se observar que durante o desenvolvimento larval em sementes de *V. unguiculata*, ambas as reservas aumentaram continuamente, principalmente a partir de 12 DAO. Durante o período analisado, do 5º ao 17º DAO, os níveis de glicose e

glicogênio aumentaram 8,7 e 2,5 vezes, respectivamente. Por outro lado, em larvas que se desenvolveram sobre os tegumentos de *C. ensiformis*, os níveis de glicose foram consumidos gradativamente do 5º (31,5 µg/mg de larva) ao 17º (11,51 µg/mg de larva) DAO (Figura 18A), enquanto aproximadamente 70 % da reserva de glicogênio foi rapidamente degradada do 5º (72,7 µg/mg de larva) ao 12º (21,8 µg/mg de larva) DAO, se mantendo constante até o 17º dia após a oviposição (Figura 18B).

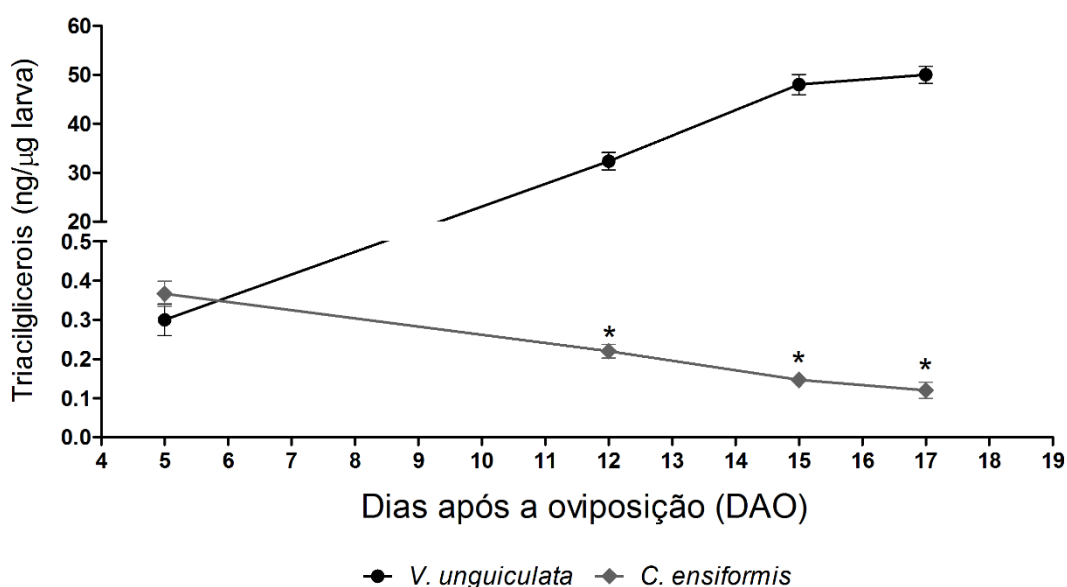


Figura 17: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* nos níveis de triacilgliceróis de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Quantificação dos níveis de triacilgliceróis em larvas de *C. maculatus* que se desenvolveram em sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* em 5, 12, 15 e 17 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

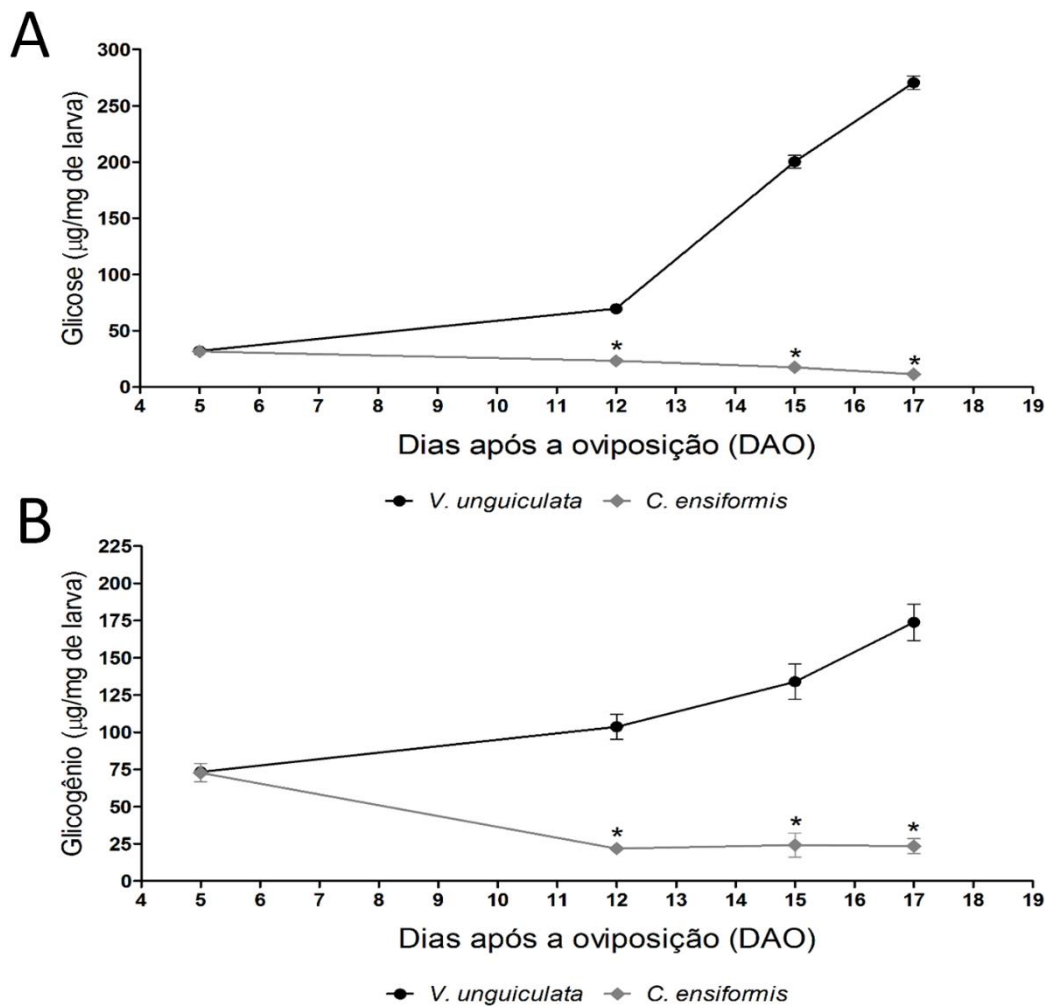


Figura 18: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* nos níveis de glicose e glicogênio de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Quantificação dos níveis totais de glicose (A) e glicogênio (B) em larvas de *C. maculatus* que se desenvolveram em sementes naturais de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis* em 5, 12, 15 e 17 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

As atividades de importantes enzimas digestivas, como proteases cisteínicas, proteases aspárticas, α -amilases e α -glucosidases, também foram medidas em larvas de *C. maculatus* que se desenvolveram em ambas as sementes (Figuras 19 e 20).

Os níveis de proteases cisteínicas e aspárticas em larvas desenvolvidas em sementes de *V. unguiculata* aumentaram progressivamente durante o tempo de desenvolvimento, principalmente a partir de 12 DAO, com um máximo de atividade em 17 DAO. Ao longo do desenvolvimento larval, a atividade de proteases cisteínicas aumentou aproximadamente 2,5 vezes, dos iniciais 0,69 $\mu\text{g}/\text{mg}$ larva para 1,73 $\mu\text{g}/\text{mg}$ larva no tempo final (Figura 19A). Já o aumento da atividade de proteases aspárticas foi ainda mais acentuado, cerca de 7 vezes, de 2,4 U/mg de larva para 16,9 U/mg de larva (Figura 19B).

Ambas as atividades foram bem inferiores em larvas que se desenvolveram em ovos postos sobre *C. ensiformis*, principalmente a partir do 12 DAO. A atividade de proteases cisteínicas nessas larvas se mostrou inferior às das larvas do grupo controle desde o tempo inicial analisado de 5 DAO. Essa atividade continuou diminuindo ao longo do desenvolvimento, apresentando os menores valores no 17º DAO (Figura 19A). Em contraste, a atividade de proteases aspárticas no tempo inicial de 5 DAO foi similar em ambas as larvas, tornando-se inferior em larvas desenvolvidas em ovos sobre *C. ensiformis* a partir de 12 DAO. Embora a atividade tenha aumentado um pouco nessas larvas, ela foi sempre inferior a atividade detectada nas larvas do grupo controle ao longo do desenvolvimento (Figura 19B).

Quando analisadas as atividades das carboidrases, os padrões de atividades de α -amilases e α -glucosidases foram bastante semelhantes em larvas que se desenvolveram em sementes de *V. unguiculata* (Figura 20 A e B). As atividades de ambas as enzimas inicialmente apresentaram valores muito baixos e aumentaram gradativamente até o 17º DAO, principalmente a partir do 12º DAO. Já nas larvas que se desenvolveram sobre as sementes de *C. ensiformis*, embora os níveis de atividade de α -amilases e α -glucosidases iniciais (5 DAO) tenham sido similares aos das larvas controle, esses níveis se mantiveram baixos durante todo o desenvolvimento larval, comportamento diferente das atividades observadas nas larvas do grupo controle (Figura 20 A e B).

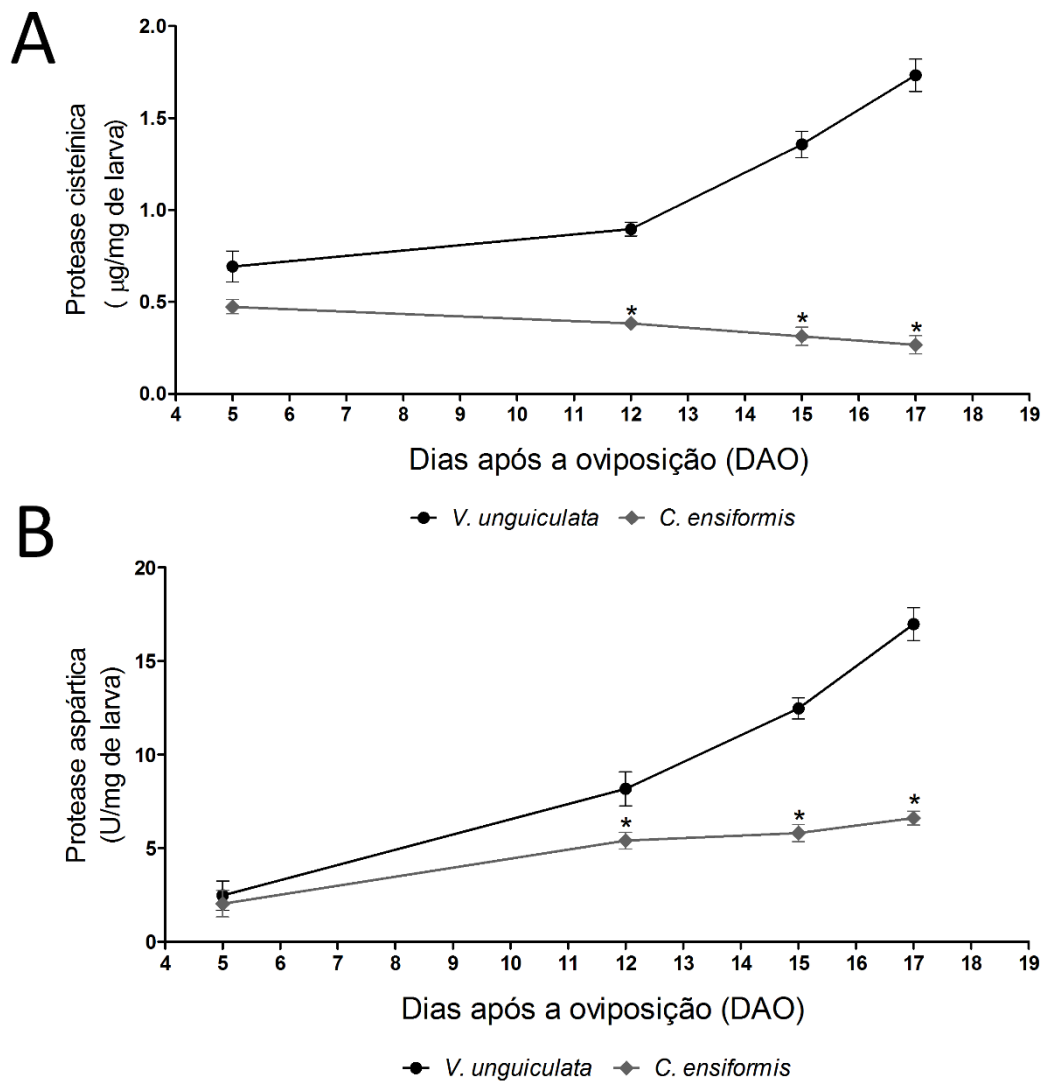


Figura 19: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas em larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de proteases cisteínicas (A) e aspárticas (B) em larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram em sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* em 5, 12, 15 e 17 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

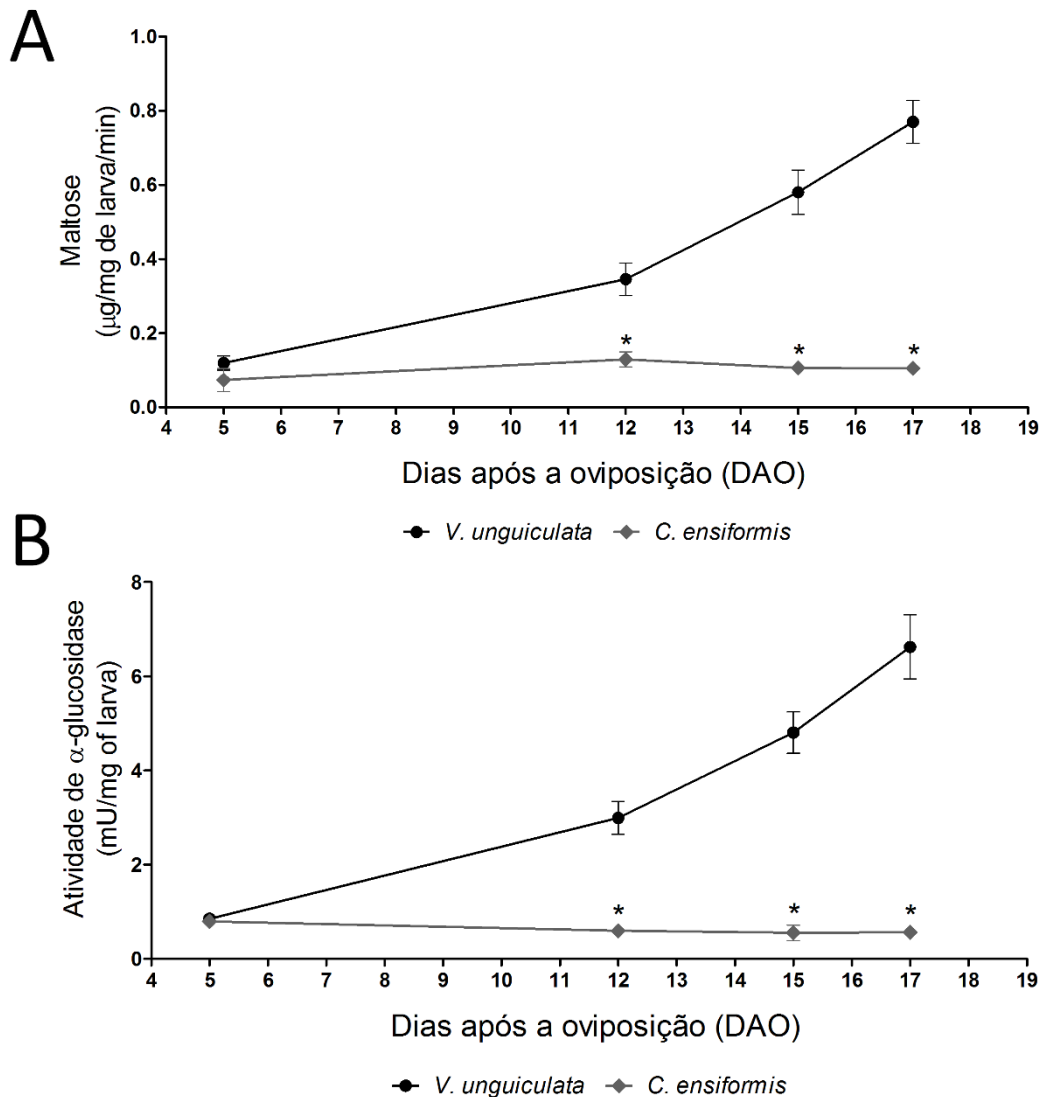


Figura 20: Interferência do tegumento natural de *Canavalia ensiformis* na atividade de α-amilases e α-glucosidases em larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de α-amilases (A) e α-glucosidases (B) em larvas de *Callosobruchus maculatus* que se desenvolveram em sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis* em 5, 12, 15 e 17 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4.6- Performance de *Callosobruchus maculatus* durante a infestação de sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais de *Canavalia ensiformis*

A fim de avaliar se a interferência dos tegumentos de *C. ensiformis* no desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* estava relacionada às suas propriedades físicas como dureza e espessura ou a presença de compostos químicos, inicialmente foram determinadas as espessuras dos tegumentos de *V.*

unguiculata e *C. ensiformis*. Como pode ser observado, o tegumento de *C. ensiformis* é quase três vezes mais espesso que o tegumento de *V. unguiculata* (Figura 21), sugerindo um possível efeito desse tegumento como uma barreira física contra a penetração de *C. maculatus*.

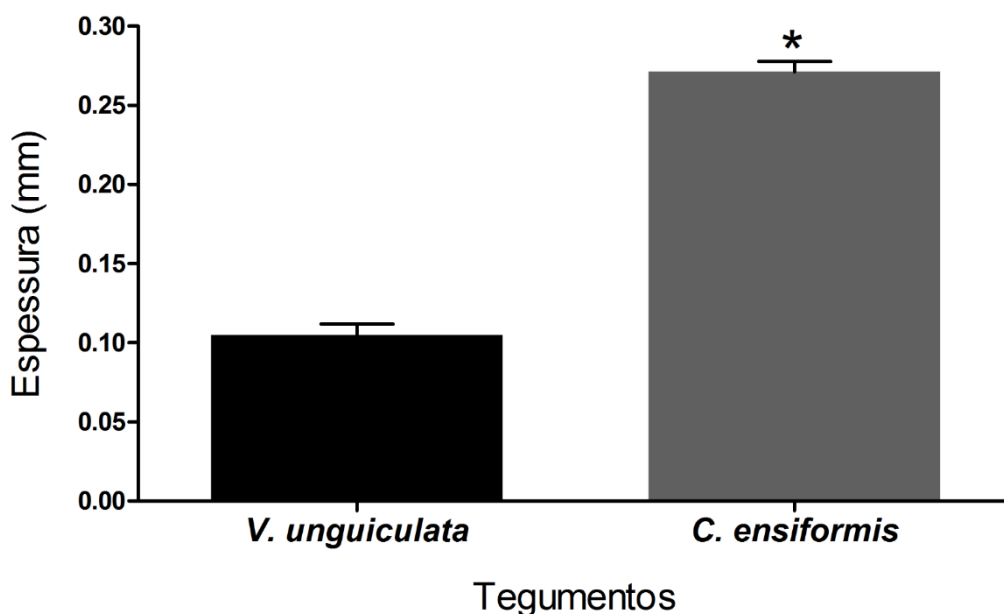


Figura 21: Espessura dos tegumentos de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Para avaliar a existência de fatores relacionados a defesa química, como a presença de compostos tóxicos, os tegumentos de *C. ensiformis* foram triturados e a farinha foi usada para a confecção de tegumentos artificiais com diferentes concentrações (0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 %). Após 24 horas de infestação, foi observado que em todas as concentrações testadas houve redução na oviposição. Um efeito mais acentuado foi mostrado nas concentrações de 60, 80 e 100 %, com reduções superiores a 50 % (Figura 22 A).

Quando avaliada a penetração, foi observado que aproximadamente 100 % das larvas conseguiram atravessar os tegumentos artificiais, independente da concentração de farinha de tegumento de *C. ensiformis* (Dados não mostrados). Esses dados sugerem que a interferência na penetração está relacionada com as defesas físicas como espessura e dureza do tegumento.

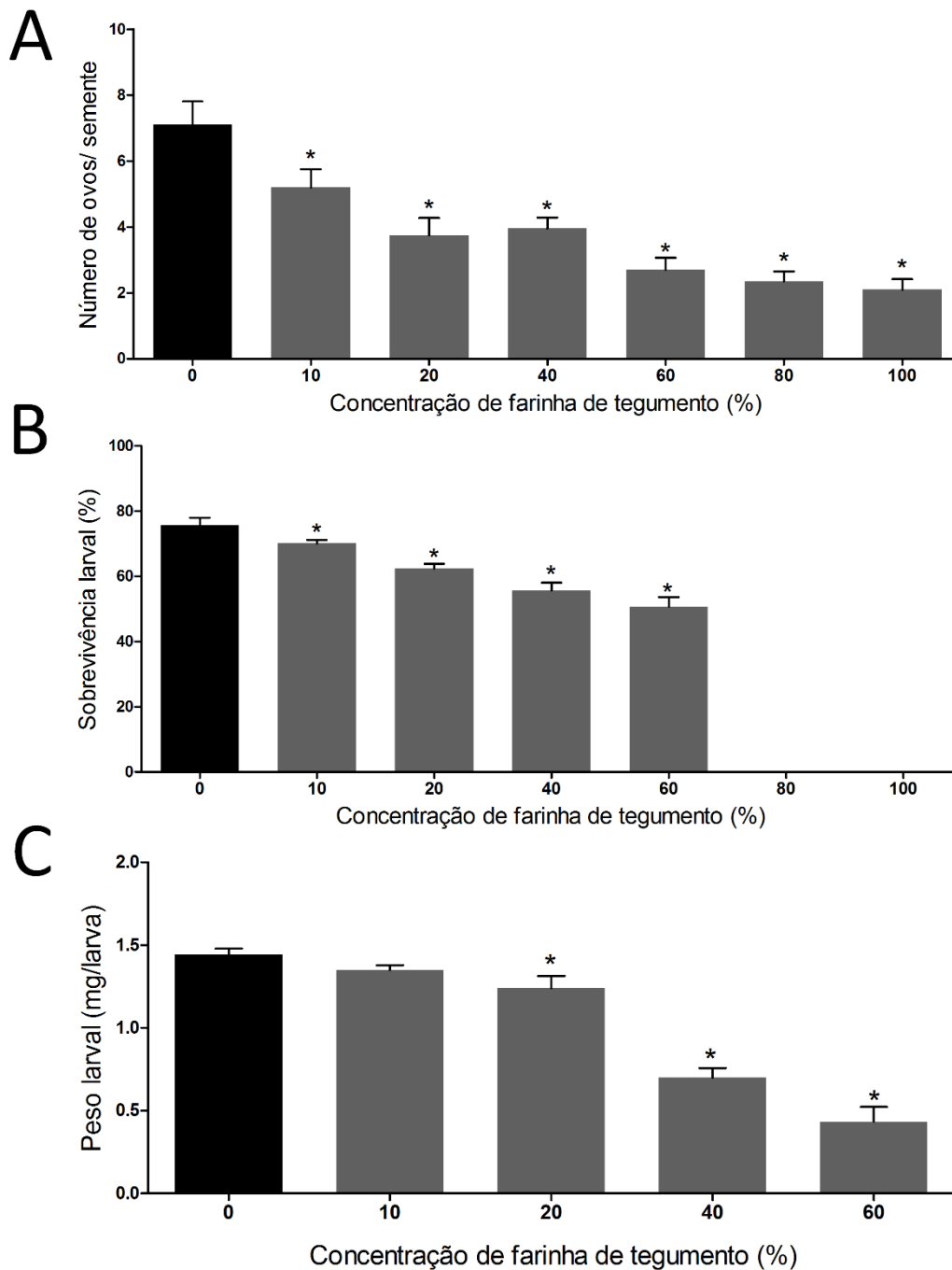


Figura 22: Interferência do tegumento artificial de *Canavalia ensiformis* na oviposição, sobrevivência e massa de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Oviposição de fêmeas após 24 horas(A), sobrevivência larval 15 DAO (B) e massa das larvas 15 DAO (C) de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumento de sementes de *C. ensiformis*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

A sobrevivência de larvas com 15 DAO que atravessaram os tegumentos artificiais mostrou uma diminuição gradativa com o aumento nas concentrações de farinha. Tegumentos artificiais contendo 10, 20, 40 e 60 % de farinha de tegumento de *C. ensiformis*, refletiram em taxas de sobrevivência de 70, 62, 55 e 50 %, respectivamente. As concentrações de 80 e 100 % de farinha de tegumento foram letais para 100 % das larvas de *C. maculatus* (Figura 22 B). A massa corporal das larvas que sobreviveram após atravessarem tegumentos artificiais contendo 20, 40 e 60 % de farinha de tegumento de *C. ensiformis* foi inferior a massa das larvas controle, com reduções de 15, 50 e 70 % respectivamente (Figura 22 C).

4.7- Efeito dos tegumentos artificial de *Canavalia ensiformis* na atividade de enzimas digestão das larvas de *Callosobruchus maculatus*

Dada a acentuada redução na massa corporal das larvas que atravessaram tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *C. ensiformis*, foi avaliada a interferência dessas sementes na alimentação e/ou digestão larval. Assim, inicialmente foram dosadas as atividades das enzimas proteolíticas, proteases cisteínicas e proteases aspárticas, e das carboidrases α -amilases e α -glucosidases. Em larvas que atravessaram tegumentos artificiais com concentrações de 20, 40 e 60 % as atividades de proteases cisteínicas foram inibidas em torno de 14, 24 e 41 %, respectivamente (Figura 23 A). De forma inversa, a atividade de proteases aspárticas de larvas que atravessaram os mesmos tegumentos artificiais foi aumentada em aproximadamente 13, 20 e 31 %, respectivamente (Figura 23 B).

A atividade de α -amilases e α -glucosidases também diminuíram com o aumento de concentração de farinha de tegumento de *C. ensiformis* nos tegumentos artificiais. Nas larvas que atravessaram os tegumentos artificiais contendo concentrações de 20, 40 e 60 %, as atividades de α -amilases diminuíram aproximadamente 26, 64 e 87 %, respectivamente (Figura 24 A), enquanto a atividade de α -glucosidases foi reduzida em torno de 18, 35 e 49 % (Figura 24 B), respectivamente.

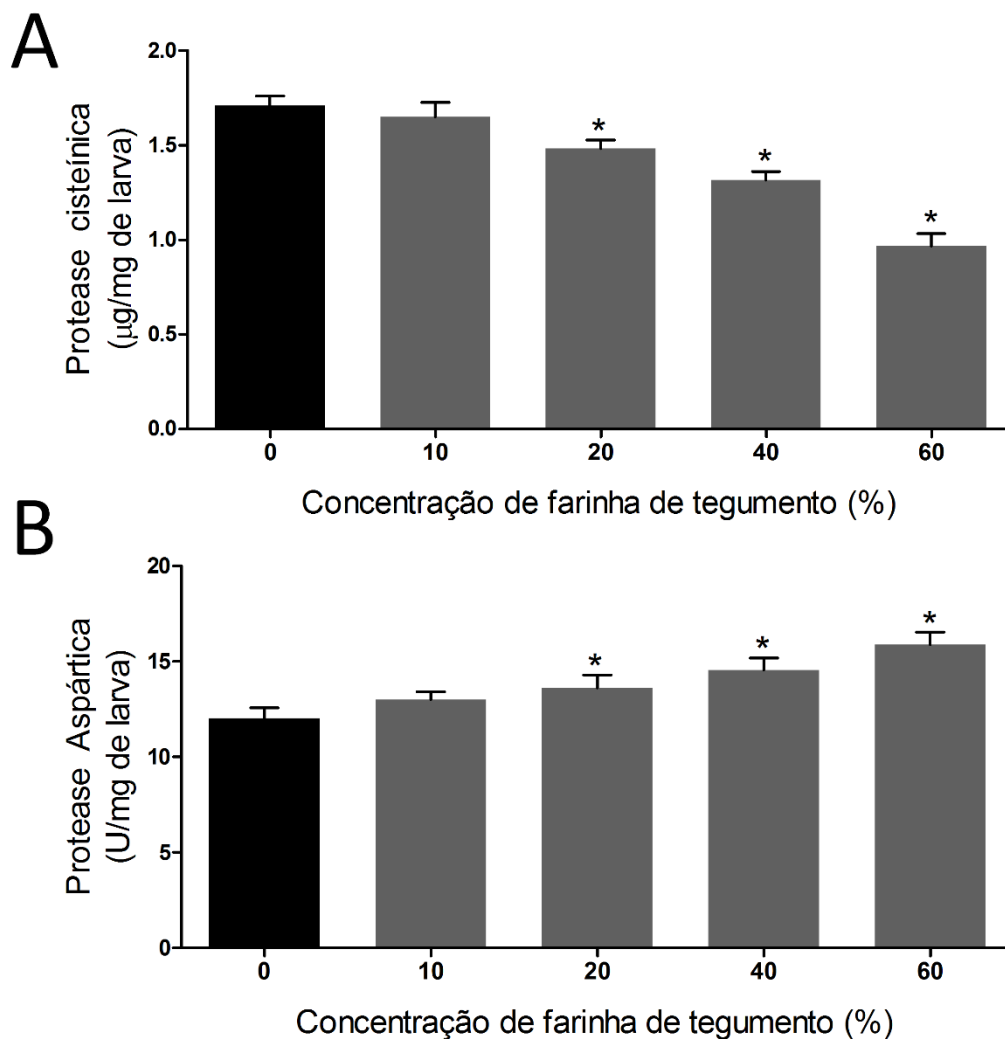


Figura 23: Interferência do tegumento artificial de *Canavalia ensiformis* na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas em larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de proteases cisteínicas (**A**) e aspárticas (**B**) em larvas (15 DAO) de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumento de sementes de *C. ensiformis*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

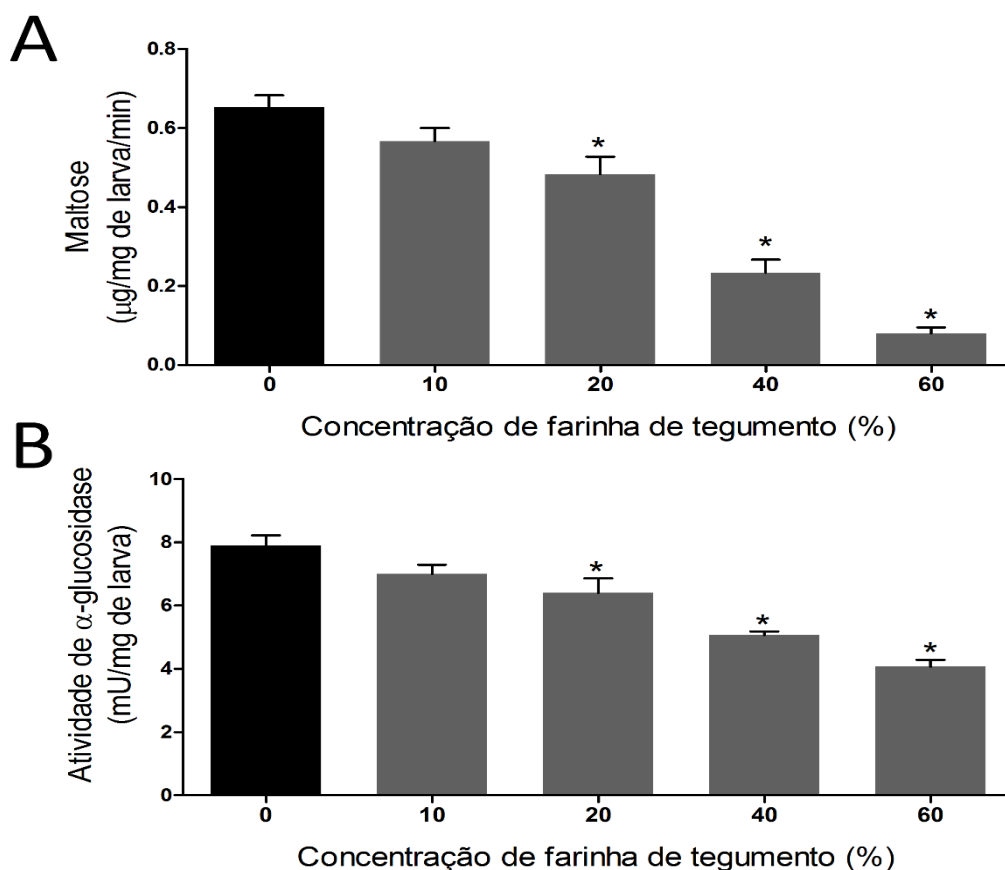


Figura 24: Interferência do tegumento artificial de *Canavalia ensiformis* nas atividades de α-amilases e α-glucosidases em larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de α-amilases (A) e α-glucosidases (B) em larvas (15 DAO) de *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumento de sementes de *C. ensiformis*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Como os tegumentos artificiais em concentrações de 40 e 60 % afetaram o ganho de peso e a atividade digestiva das larvas, foram feitos experimentos para comprovar a ingestão de proteínas dos tegumentos de *C. ensiformis* por larvas de *C. maculatus*. Para isso, proteínas dos tegumentos complexadas com FITC foram incorporadas em 40 e 60 % em novos tegumentos artificiais e os efeitos avaliados em larvas de 15 DAO, que foram dissecadas e seus intestinos analisados por microscopia de fluorescência (Figura 25). Os resultados mostraram que larvas que penetraram esses tegumentos artificiais apresentaram um forte sinal de fluorescência ao longo do trato intestinal (Figura 25D e F), enquanto em intestinos de larvas controle, que se alimentaram de uma semente artificial composta por 100 % de farinha de cotilédone de *V. unguiculata*, não foram observados sinais de fluorescência (Figura 25 B). Esses resultados

comprovam a ingestão das proteínas pelas larvas e a permanência dessas proteínas no intestino de larvas 15 DAO. Visto que as larvas em média 6 DAO já atravessaram os tegumentos, nossos resultados mostraram que mesmo no 15º DAO, ou seja 14 dias após a larva ter entrado em contato com o tegumento, essas proteínas ainda são encontradas no intestino, indicando uma possível retenção.

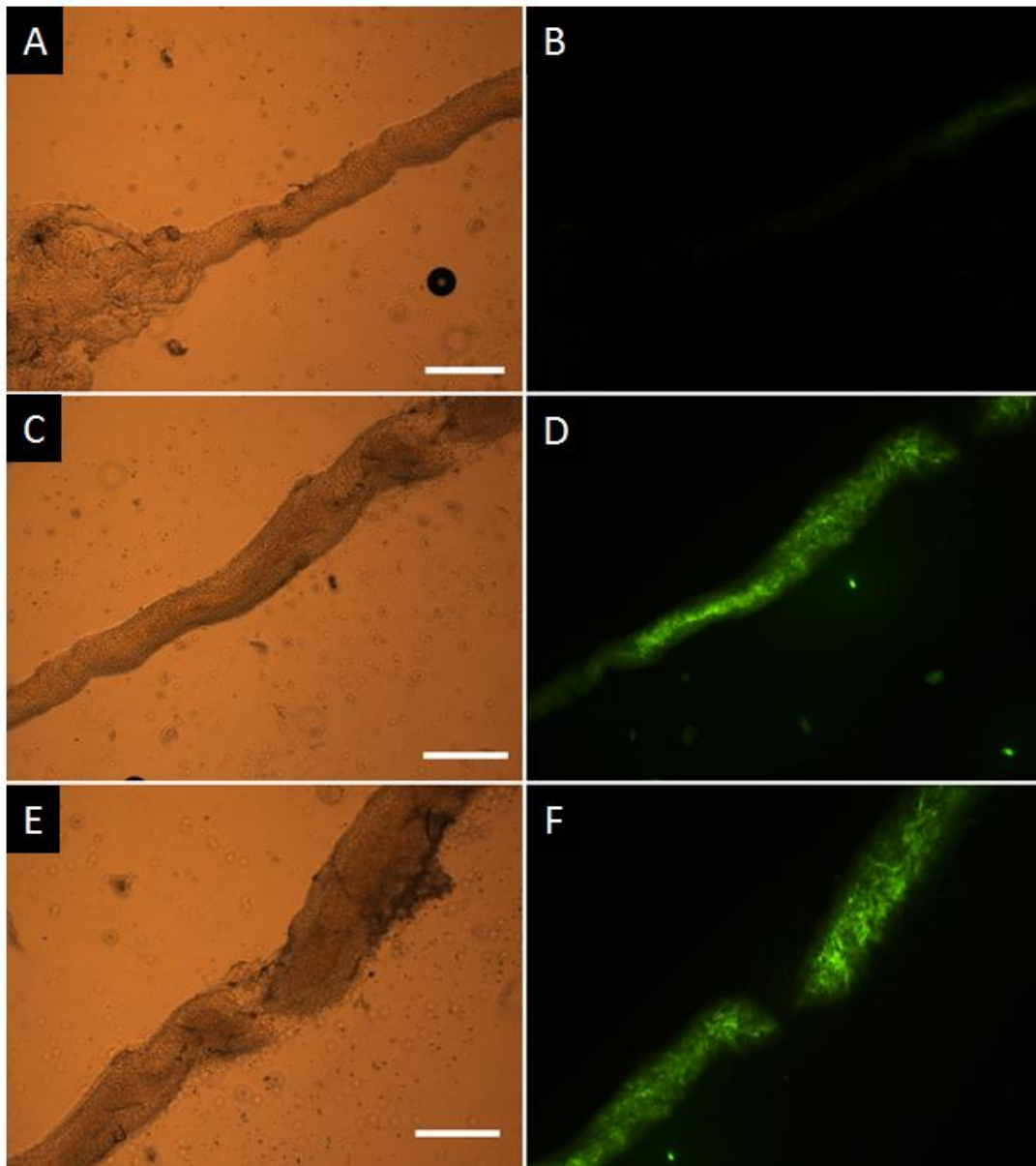


Figura 25: Detecção de proteínas de tegumento de *Canavalia ensiformis* no intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Microscopia ótica de fluorescência de intestinos médios de larvas (15 DAO) de *C. maculatus* que atravessaram os tegumentos artificiais contendo proteínas do tegumento de *C. ensiformis* marcadas com FITC. **A e B:** intestinos de larvas que se desenvolveram em sementes artificiais controle (farinha de *V. unguiculata* sem fluorescência). **C e D:** intestinos de larvas que se desenvolveram após atravessarem tegumentos artificiais contendo 40 % de farinha de tegumento de *C. ensiformis* fluorescente. **E e F:** intestinos de larvas que se desenvolveram após atravessarem tegumentos artificiais contendo 60 % de farinha de tegumento de *C. ensiformis* fluorescente. **A, C e D:** campo claro. **B, D e F:** fluorescência. Barras = 100 μ m.

4.8- Isolamento da fração rica em vicilinas do tegumento de *C. ensiformis* e toxicidade para larvas de *C. maculatus* quando incorporada em tegumentos artificiais

Um trabalho realizado pelo nosso grupo mostrou a presença de vicilinas em tegumento de *C. ensiformis* e que essas proteínas foram tóxicas para as larvas de *C. maculatus* quando incorporadas em cotilédones artificiais (OLIVEIRA et al., 1999), entretanto os efeitos dessas proteínas para as larvas, quando incorporadas só em tegumentos e o mecanismo de toxicidade permanecem desconhecidos. Assim, a fração rica em vicilinas (F 70-90) foi isolada através de precipitação com sulfato de amônia e o perfil proteico e a imunorreação com anticorpo anti-vicilina foram avaliados por SDS-PAGE e *Western blotting*, respectivamente (Figura 26). Um extrato salino de cotilédones de *V. unguiculata*, conhecido por ser rico em vicilinas, foi usado como controle positivo. O perfil eletroforético da fração F70-90 e do extrato de *V. unguiculata* mostrou uma multiplicidade de bandas de pouca intensidade e duas a três bandas majoritárias com massas moleculares entre 43 e 55 KDa (Figura 26 A). Essas proteínas majoritárias, pelo menos duas bandas, de cada uma das frações, reagiram com o anticorpo de anti-vicilinas de cotilédones de *V. unguiculata* (Figura 29 B). A análise densitométrica (Figura 26 C e D) das bandas proteicas visualizadas na fração F70-90 de tegumentos de *C. ensiformis*, realizada pelo programa Image J, mostrou que a região de bandas com massas moleculares entre 43 e 55 KDa (banda 5) é a região do gel com maior intensidade (Figura 26 C) e representa cerca de 60 % da área relativa da raia (Figura 26 C).

A fração F70-90 com as proteicas marcadas com FITC teve sua toxicidade avaliada através da incorporação em tegumentos artificiais em uma concentração de 2 %, concentração de referência como WD_{50} (Dose que reduz 50 % a massa das larvas de 20 DAO) para vicilinas tóxicas. Para esse conjunto de experimentos foram utilizados como controle, tegumentos artificiais contendo farinha de cotilédone de *V. unguiculata* sem marcação (controle 1) e marcadas com FITC (controle 2). A média do número de ovos postos sobre tegumentos contendo a F 70-90 foi 50 % menor que a observada nas sementes controle (Figura 27). Com 20 dias após a oviposição, a sobrevivência das larvas controle

foi de 100 % e apenas 55 % para as larvas que atravessaram os tegumentos contendo 2 % da fração F 70-90 (Figura 28).

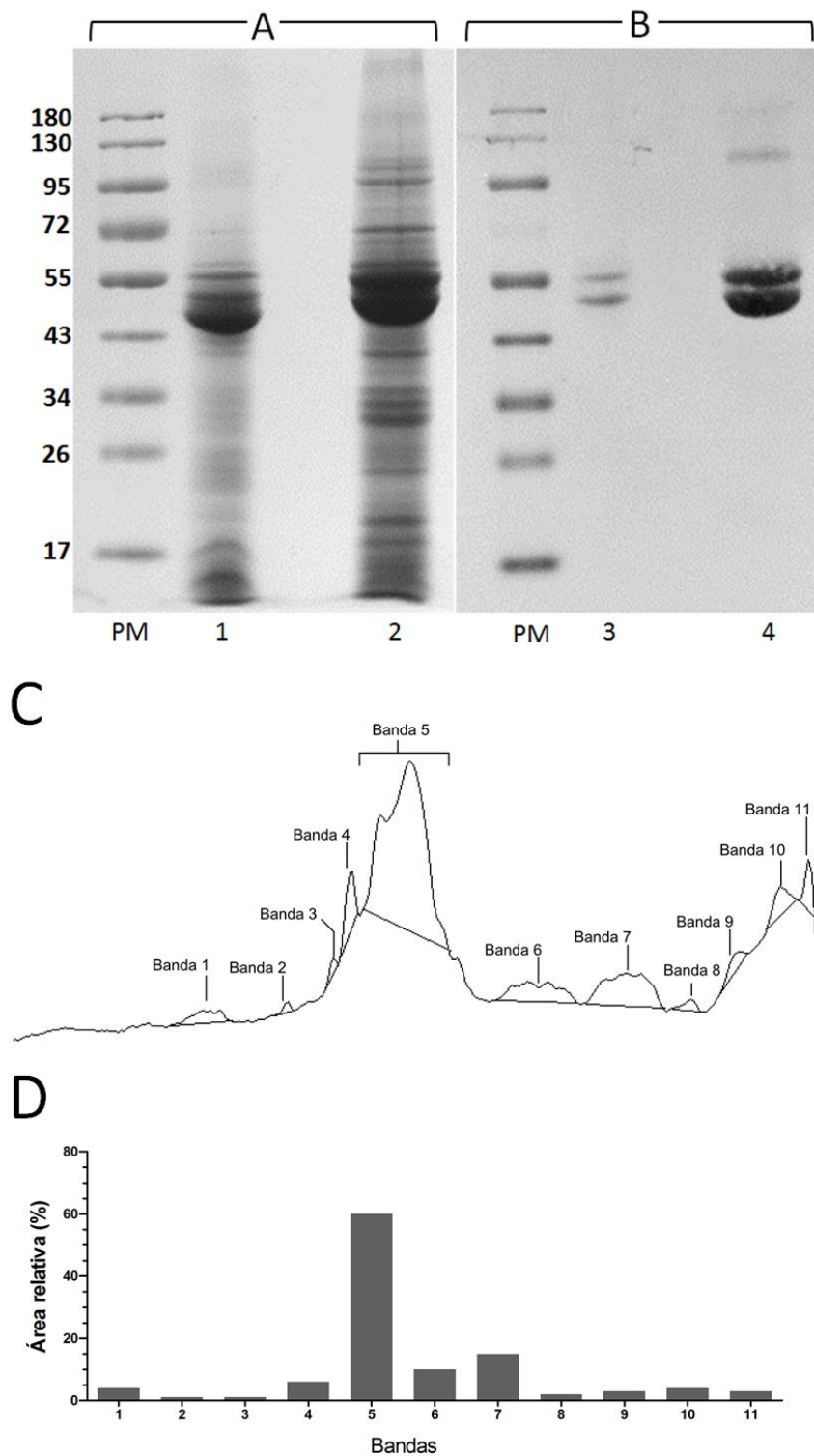


Figura 26: Visualização do perfil proteico da fração F70-90 e detecção de vicilinas por *Western Blotting*. Visualização do perfil proteico em SDS-PAGE (A) e detecção de vicilinas por *Western blotting* (B) na fração F70-90 (A1 e B3) e no extrato de cotilédone de *V. unguiculata* (A2 e B4). PM= Peso Molecular. (C) Densitometria da fração F70-90 visualizada por SDS-PAGE (A1) usando o programa Image J. (D) Representação da área relativa do conjunto de bandas observadas na fração F70-90.

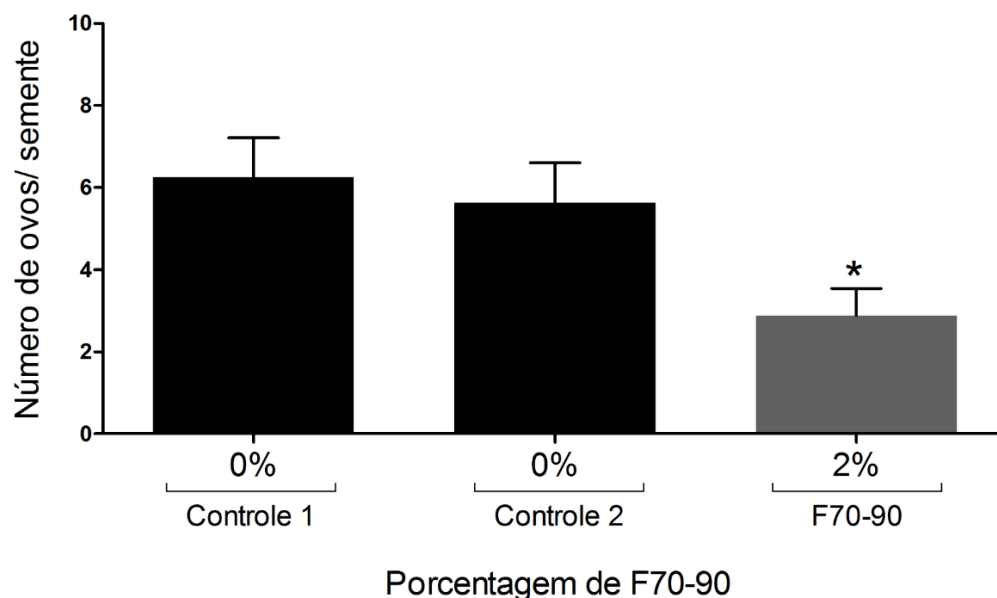


Figura 27: Interferência da fração F70-90 na oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*. Oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*, após 24 horas de infestação, em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais compostos de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* sem FITC (controle 1), com FITC (controle 2) e 2 % da fração F70-90 marcada com FITC. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

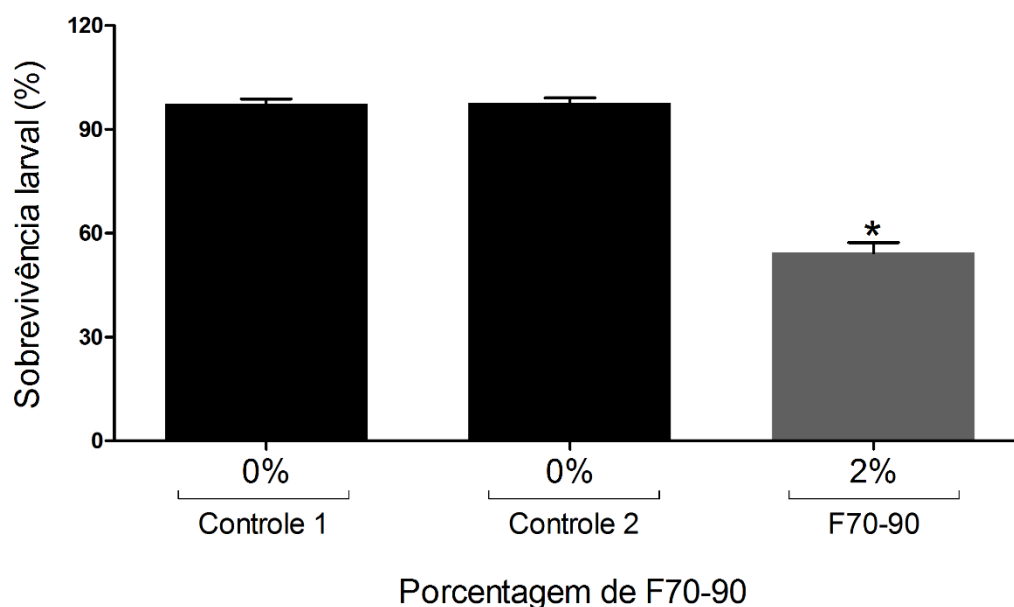


Figura 28: Interferência da fração F70-90 na sobrevivência de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Sobrevivência de larvas (20 DAO) que desenvolveram após atravessarem tegumento artificiais compostos de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* sem FITC (controle 1), com FITC (controle 2) ou 2 % da fração F70-90 de tegumentos de *C. ensiformis* marcada com FITC. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Um efeito ainda mais acentuado da fração F70-90 foi observado sobre a massa das larvas sobreviventes com 20 DAO (Figura 29). Enquanto as larvas controle apresentaram uma média de massa de 9 mg/larva, as larvas que atravessaram tegumentos artificiais contendo 2 % da fração F70-90 apresentaram uma média de aproximadamente 3,2 mg/larva, refletindo em uma redução de 65 % na massa corporal (Figura 29 A). Apesar de inferiores no tamanho, essas larvas não apresentaram alterações morfológicas macroscópicas (Figura 29 B).

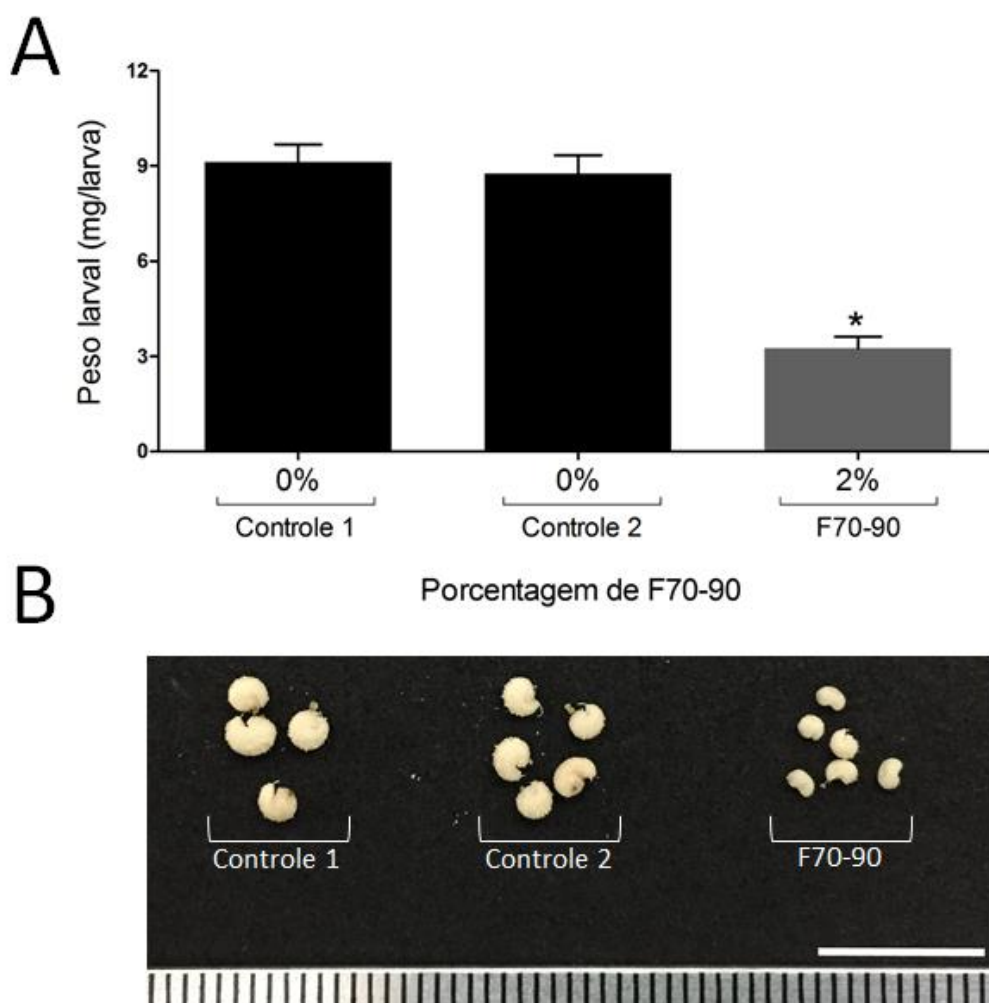


Figura 29: Interferência da fração F70-90 na massa das larvas de *Callosobruchus maculatus*. **A:** Massa das larvas (20 DAO) que desenvolveram em sementes artificiais após atravessarem tegumentos artificiais compostos de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* sem FITC (controle 1), com FITC (controle 2) ou 2 % da fração F70-90 marcada com FITC. **B:** Larvas (20 DAO) retiradas das sementes artificiais: controle 1, controle 2 e F70-90. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$). Barra = 1cm.

As atividades das enzimas digestivas dessas larvas também foram avaliadas e os resultados mostraram que em larvas (20 DAO) que atravessaram o tegumento artificial contendo 2 % de F70-90 as atividades das proteases cisteínicas e aspárticas foram reduzidas em aproximadamente 57 e 28%, respectivamente (Figura 30 A e B). Essas larvas também apresentaram atividades reduzidas de α -amilases e α -glucosidases, reduções de 50 e 57 %, respectivamente (Figura 31 A e B).

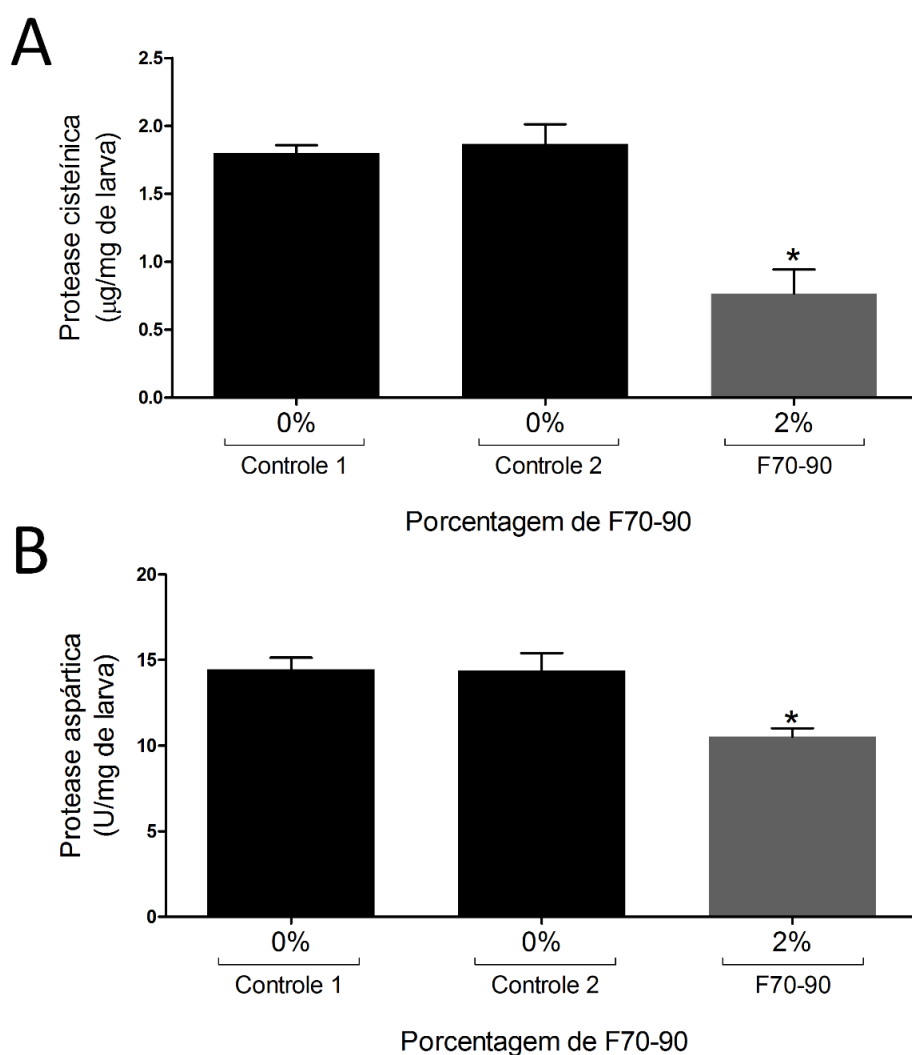


Figura 30: Interferência da fração F70-90 de *Canavalia ensiformis* na atividade de proteases cisteínicas e aspárticas de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de proteases cisteínicas (A) e aspárticas (B) em larvas (20 DAO) que desenvolveram em sementes artificiais após atravessarem tegumentos artificiais compostos de farinha de cotilédono de *V. unguiculata* sem FITC (controle 1), com FITC (controle 2) ou 2 % da fração F70-90 marcada com FITC. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

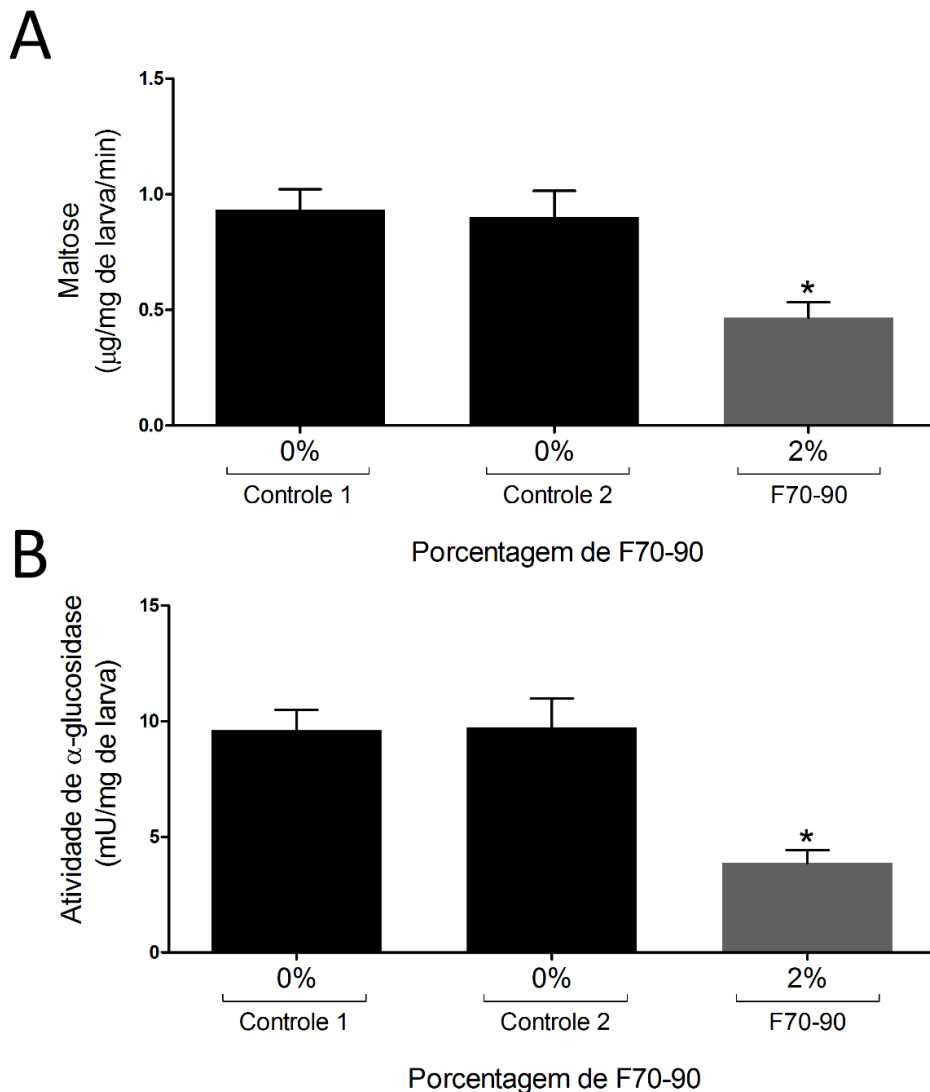


Figura 31: Interferência da fração F70-90 na atividade de α -amilases e α -glucosidasas de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Atividade de α -amilases (**A**) e α -glucosidasas (**B**) em larvas (20 DAO) que desenvolveram em sementes artificiais após atravessarem tegumentos artificiais compostos de farinha de cotilédono de *V. unguiculata* sem FITC (controle 1), com FITC (controle 2) ou 2 % da fração F70-90 de tegumento de *C. ensiformis* marcada com FITC. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Quando os intestinos dessas larvas foram avaliados por microscopia de fluorescência (Figura 32), os resultados mostraram que nas larvas que atravessaram o tegumento artificial contendo 2 % de F70-90 havia uma forte fluorescência ao longo de todo o trato intestinal mesmo 20 DAO (Figura 32 H), enquanto nas fezes os sinais de fluorescência foram quase imperceptíveis (Figura 32 I), indicando a pouca ou nenhuma excreção desse material. Para as

larvas controle, que não se alimentaram de proteínas marcadas (controle 1), não foram observados sinais de fluorescência em seus intestinos e fezes (Figura 32 B e C). Já nas larvas do controle 2 (alimentadas com farinha de *V. unguiculata* marcada com FITC) foi observada uma fraca fluorescência no intestino e uma forte marcação nas fezes (Figura 32 E e F, respectivamente). Esses resultados indicam que as proteínas da fração F70-90 foram ingeridas pelas larvas, ainda permaneciam no trato intestinal das larvas 20 DAO e pouca ou quase nenhuma dessas proteínas estava sendo excretada pelas fezes nesse período.

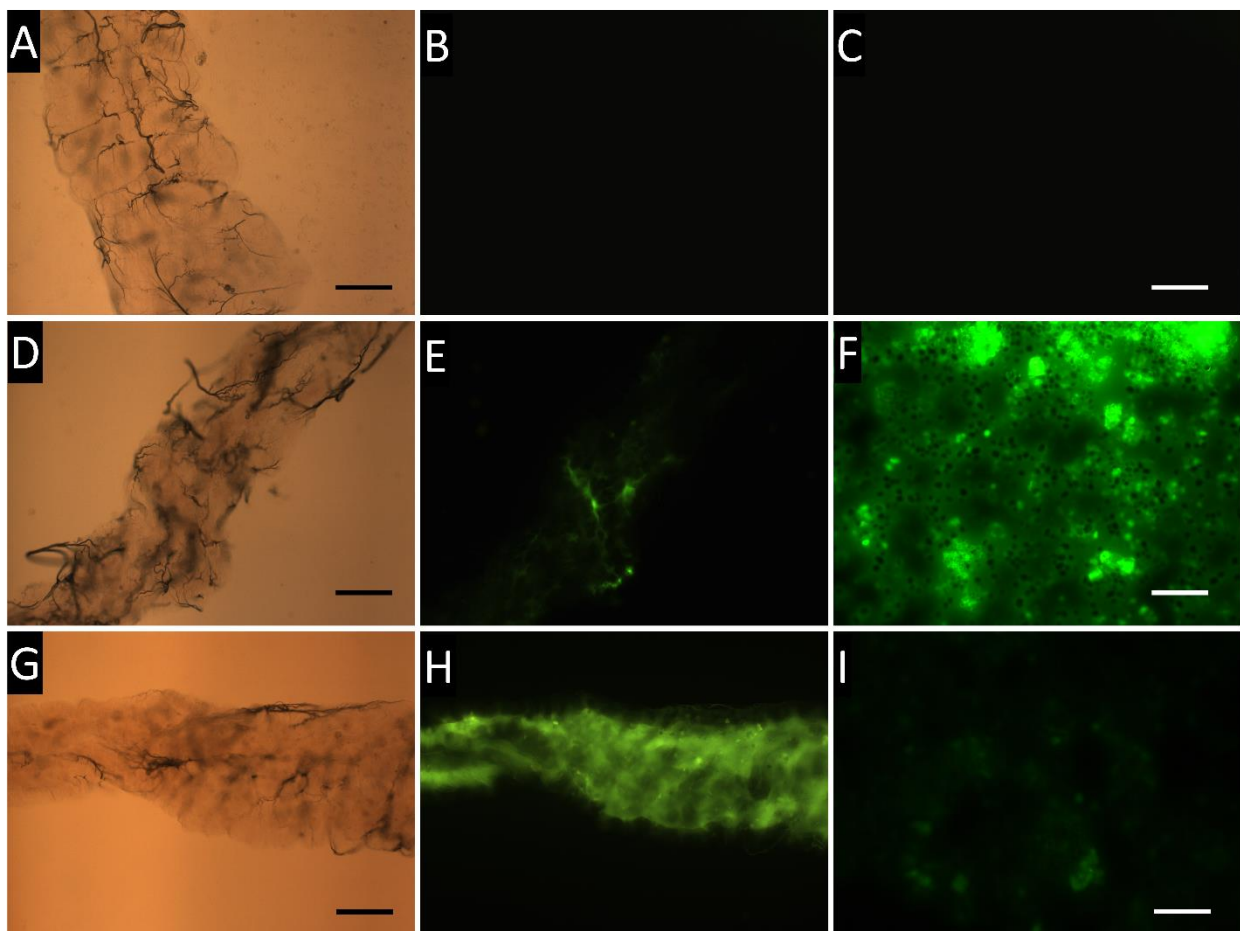


Figura 32: Detecção de proteínas da fração F70-90 no intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus*. Microscopia de fluorescência de intestinos médios e fezes de larvas (20 DAO) de *C. maculatus* que atravessaram os tegumentos artificiais contendo farinha de cotilédone de *V. unguiculata* não marcada (controle 1) ou marcada com FITC (controle 2) ou 2 % da fração F70-90 marcada com FITC. **A e B:** intestinos de larvas que se desenvolveram em sementes artificiais do controle 1. **D e E:** intestinos de larvas que se desenvolveram em sementes artificiais do controle 2. **G e H:** intestinos de larvas que se desenvolveram em sementes artificiais contendo F70-90. **C, F e I:** fezes das larvas que se desenvolveram em sementes controle 1, 2 e F70-90, respectivamente. **A, D e G:** campo claro. **B, C, E, F, H e I:** campo claro. Barra= 100 µm

4.9- Análise *in silico* das interações de vicilinas com N-acetilglicosamina

Dados da literatura relacionam a toxicidade de vicilinas para larvas de *C. maculatus* com a capacidade de ligação a quitina presente no gel peritrófico que reveste o trato intestinal dessas larvas (SALES et al., 2001; UCHÔA et al., 2009). Em nossos resultados foi mostrado que, além de tóxica para as larvas, proteínas presentes numa fração enriquecida com vicilinas de tegumento de *C. ensiformis* ainda estavam retidas no intestino de larvas com 20 DAO.

Sendo assim fomos investigar, *in silico*, as possíveis interações de vicilinas com o monômero de quitina, N-acetilglicosamina (NAG). Para isso, inicialmente usamos a sequência do peptídeo SLREEEESQDNDFYF obtido da vicilina de tegumentos de *C. ensiformis* por (OLIVEIRA et al., 1999). Essa sequência peptídica de 15 aminoácidos foi submetida a análise por BLASTp contra o banco de dados do Protein Data Bank (PDB) e alinhou 100 % com três subunidades idênticas de faseolina 2PHL (vicilina de cotilédones de *Phaseolus vulgaris*). Embora essa sequência tenha sido obtida a partir de uma proteína isolada de tegumentos de *C. ensiformis*, ela apresentou baixa identidade, menor que 40 % com uma cavanalina (vicilina de cotilédones de *C. ensiformis*) (Figura 33). Utilizando a ferramenta Template Identification do SWISS-MODEL selecionamos as estruturas previamente depositadas da faseolina 2PHL (LAWRENCE et al., 1994) e também da canavalina 1CAV (KO et al., 1993). Os *motifs* de interação das sequências 2PHL e 1CAV com NAG foram identificados pelo ELM (Eukaryotic Linear Motif) e estão apresentados na Figura 33, marcados nas três subunidades de 2PHL (cor magenta) e na subunidade A de 1CAV (cor azul). Foram encontrados na faseolina dois sítios de interação com NAG, compostos pelos aminoácidos NEFGN (224-228) e EME (245-247), enquanto que na canavalina foram encontrados três pontos de interação compostos pelos aminoácidos S (260) e K (383) e pelo sítio ESYF (415-418) (Figura 33).

Apesar das sequências primárias de 2PHL e 1CAV apresentarem uma baixa homologia (Figura 33), quando suas estruturas tridimensionais foram sobrepostas observou-se conformações bem semelhantes e uma proximidade entre os sítios de interação com NAG (Figura 34 regiões coloridas de magenta para 2PHL e azul 1CAV).

As análises de *docking* realizadas pelo programa Autodock v4.2.6 mostraram que as proteínas 2PHL (Figura 35) e 1CAV (Figura 36) tem um potencial de interação com NAG. A avaliação visual dos resultados do docking evidenciou que a molécula de NAG utilizada foi capaz de formar uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gly-227 de 2PHL (Figura 35 C) e com os resíduos Glu-415, Ser-416, Tyr-417, Ser-259 e Asn-260 de 1CAV (Figura 36 C). É importante destacar que ambas as soluções incluíram quase todos os resíduos dos motivos de interação com NAG detectados. Este é um forte indicador de que essas regiões são capazes de interagir com a quitina e corroboram as previsões *in silico*. Além disso, os outros resíduos envolvidos contribuem com as interações de Van der Waals, que ajudam a estabilizar a molécula no interior do local de ligação.

```

Canavalina_(1CAV_A)241-424      241 -----TLSSQDKPFNLRSDP---IYSNNYGKL-----YEITPEKNSQLR---- 277
Canavalina_(1CAV_B)44-224      44 -----AQNNPYLFRS-NKFLTLFKNQHGSLRLLQRFNEDTEKLENLRDYRVLVEYCSKPNTLLLPHHSDDLLVVLVEGQAILVLVNPDGRD TYKLDQGD A-----IKIQAGTPFYLINPDNNQNLRI LKF 162
Faseolina_(2PHL_A)1-397       1 SLREEEESQDNPFYFNSDNSWNTLFKNQYGHIRVLQRFDQQSKRLQNLLEDYRLVEFRSKPETLLLQQQADAELLVVRSGSAI LVLVKPDDRREYFFL TSDNP I FSDHQK I PAGT I FYLVNPDPKEDLR I IQL 134
Faseolina_(2PHL_B)1-397       1 SLREEEESQDNPFYFNSDNSWNTLFKNQYGHIRVLQRFDQQSKRLQNLLEDYRLVEFRSKPETLLLQQQADAELLVVRSGSAI LVLVKPDDRREYFFL TSDNP I FSDHQK I PAGT I FYLVNPDPKEDLR I IQL 134
Faseolina_(2PHL_C)1-397       1 SLREEEESQDNPFYFNSDNSWNTLFKNQYGHIRVLQRFDQQSKRLQNLLEDYRLVEFRSKPETLLLQQQADAELLVVRSGSAI LVLVKPDDRREYFFL TSDNP I FSDHQK I PAGT I FYLVNPDPKEDLR I IQL 134
PEPTIDEQ1-15                  1 SLREEEESQDNPFYF----- 15

Canavalina_(1CAV_A)241-424      278 -----DLDILLNCLQMNNEGALFVPHYNSRATVILVAN 309
Canavalina_(1CAV_B)44-224      163 AITFRRPGTVEDFFLSSTKRLPSYLSAFSKNFLEASYDSPYDEIEQTLLQEE--QEGVIVKMPK----- 224
Faseolina_(2PHL_A)1-397       135 AMPVNNP-QIHEFFLSSTEAAQSYLQEFASKHILEASFNSKFEEINRVLFE EEGQEGVIVNIDSEQIKELSKHAKSSSRKSLSKQDNTIGNEFGNLTERTDNSLNVLISSIEMEEGALFVPHYYSKAIIVILVVN 267
Faseolina_(2PHL_B)1-397       135 AMPVNNP-QIHEFFLSSTEAAQSYLQEFASKHILEASFNSKFEEINRVLFE EEGQEGVIVNIDSEQIKELSKHAKSSSRKSLSKQDNTIGNEFGNLTERTDNSLNVLISSIEMEEGALFVPHYYSKAIIVILVVN 267
Faseolina_(2PHL_C)1-397       135 AMPVNNP-QIHEFFLSSTEAAQSYLQEFASKHILEASFNSKFEEINRVLFE EEGQEGVIVNIDSEQIKELSKHAKSSSRKSLSKQDNTIGNEFGNLTERTDNSLNVLISSIEMEEGALFVPHYYSKAIIVILVVN 267
PEPTIDEQ1-15                  -----

Canavalina_(1CAV_A)241-424      310 EGRAEVELVGLQQQQGLGLESMLRRYAATLSEGDIVIPSSFPVALKAASDLNMVIGVNAENNERNFLAGHSENVIRQIPR----QVSDLTFPGSGEEVEELLEENQKESYFVDGQPR----- 424
Canavalina_(1CAV_B)44-224      268 EGEAHVELVGPKGKNGK----ETLEYESYRAELSKDDVFVIPAAYPVAIKATSNVNF TGFGINANNNNRNLLAGKTDNVISSIGRALDGKDVGLGLTFSGSGDEVKMLINKQSGSYFVDAHHHQEQQKGRKGAFVY 397
Faseolina_(2PHL_A)1-397       268 EGEAHVELVGPKGKNGK----ETLEYESYRAELSKDDVFVIPAAYPVAIKATSNVNF TGFGINANNNNRNLLAGKTDNVISSIGRALDGKDVGLGLTFSGSGDEVKMLINKQSGSYFVDAHHHQEQQKGRKGAFVY 397
Faseolina_(2PHL_B)1-397       268 EGEAHVELVGPKGKNGK----ETLEYESYRAELSKDDVFVIPAAYPVAIKATSNVNF TGFGINANNNNRNLLAGKTDNVISSIGRALDGKDVGLGLTFSGSGDEVKMLINKQSGSYFVDAHHHQEQQKGRKGAFVY 397
Faseolina_(2PHL_C)1-397       268 EGEAHVELVGPKGKNGK----ETLEYESYRAELSKDDVFVIPAAYPVAIKATSNVNF TGFGINANNNNRNLLAGKTDNVISSIGRALDGKDVGLGLTFSGSGDEVKMLINKQSGSYFVDAHHHQEQQKGRKGAFVY 397
PEPTIDEQ1-15                  -----

```

Figura 33: Alinhamento das sequências primárias das proteínas canavalina (1CAV) e faseolina (2PHL) com a sequência do peptídeo SLREEEESQDNDFYF de tegumento de *Canavalia ensiformis* (Oliveira et al 1999). Alinhamento das sequências de 1CAV (subunidades A e B) e 2PHL (subunidades A, B e C) com o peptídeo 1-15. Os resíduos que compõe os sítios de interação com N-acetilglicosamina identificados pelo ELM estão marcados nas três subunidades de 2PHL (magenta) e na subunidade A de 1CAV (azul). A região marcada de vermelho destaca os 100% de identidade do peptídeo 1-15 com as três subunidade de 2PHL.

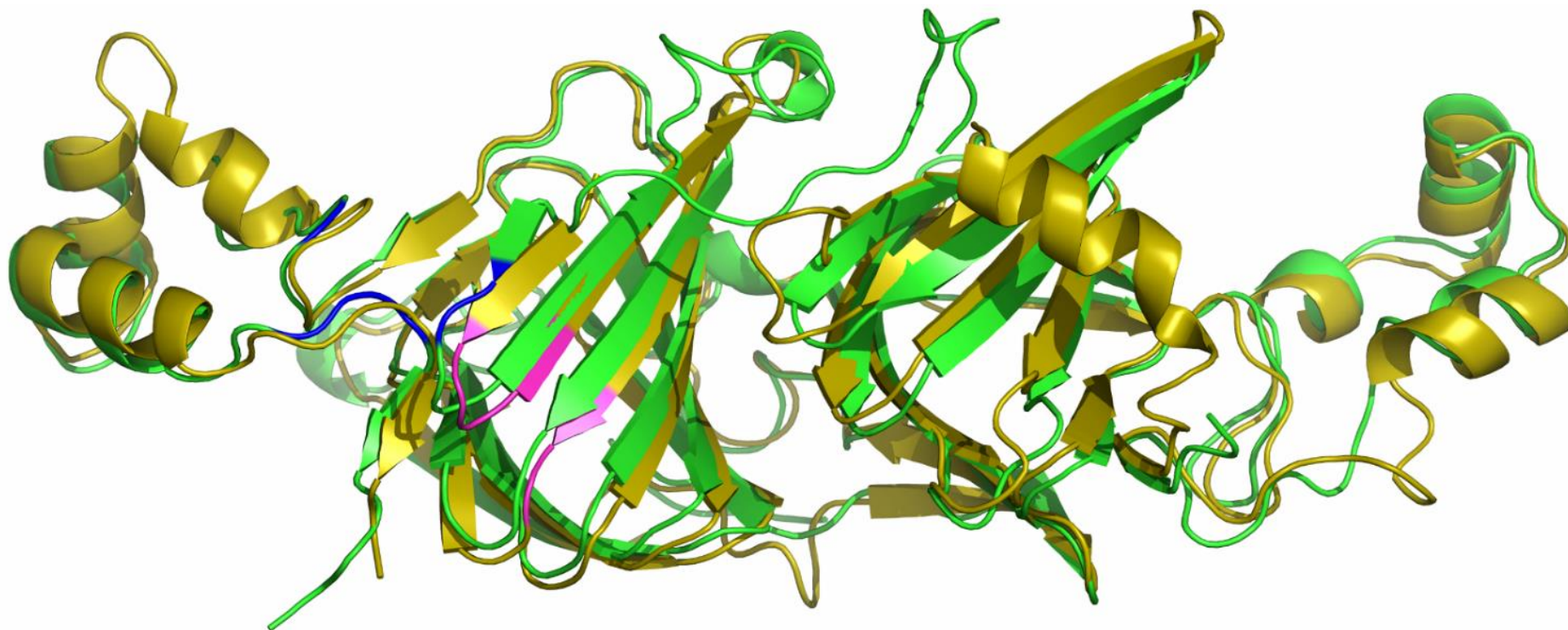


Figura 34: Sobreposição dos modelos estruturais tridimensionais de 2PHL e 1CAV. Sobreposição das estruturas tridimensionais de 2PHL (amarelo) e 1CAV (verde). Regiões coloridas de magenta e azul são os sítios de interação com N-acetilglicosamina em 2PHL e 1CAV, respectivamente.

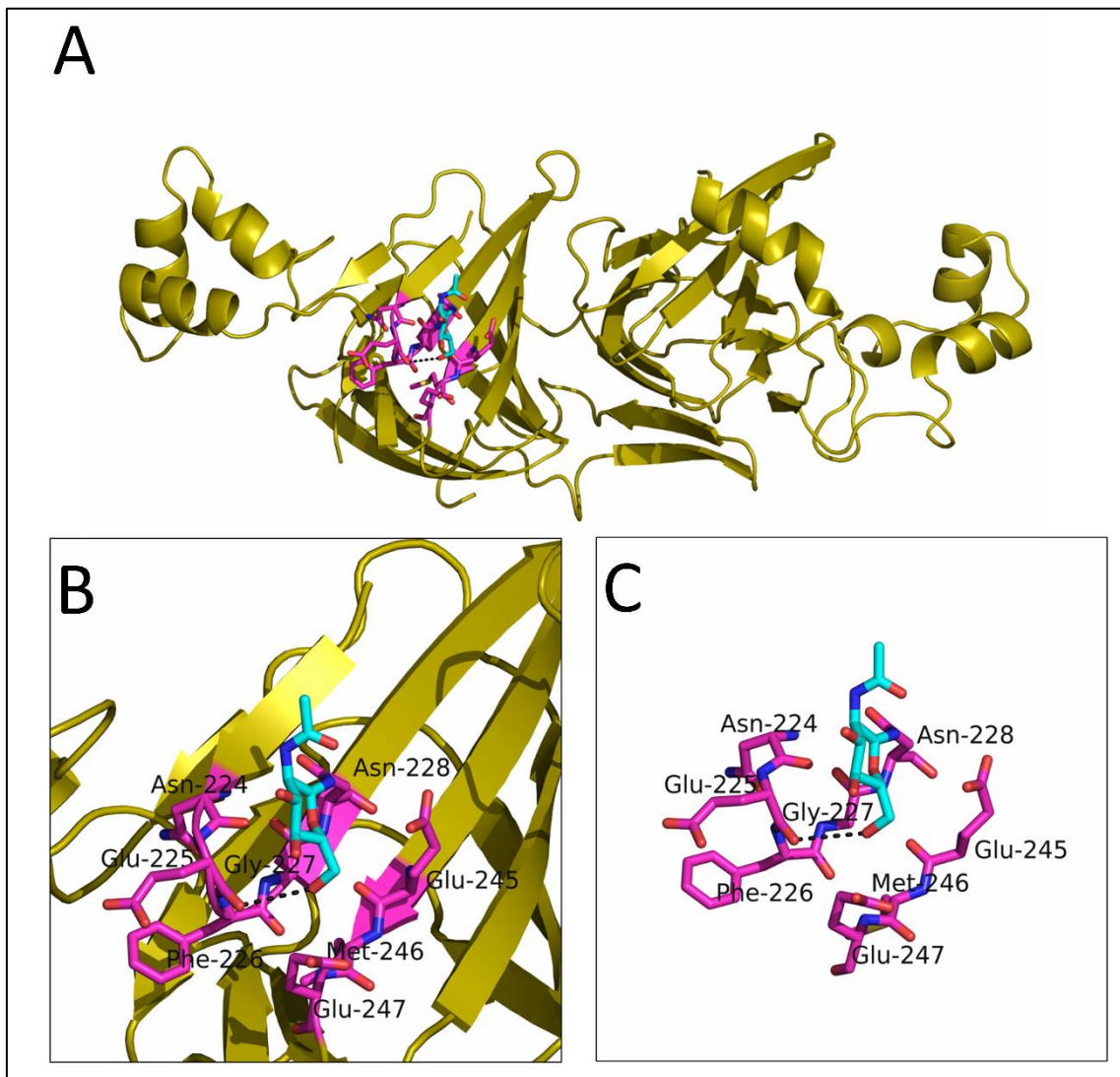


Figura 35: Experimento de *docking* molecular entre N-acetilglicosamina (NAG) e a proteína 2PHL. Docking molecular para o potencial de ligação de NAG com 2PHL. **A:** Visão geral do posicionamento do ligante em relação a estrutura inteira. **B e C:** Visão detalhada da melhor posição do ligante e das ligações de Hidrogênio (linha pontilhada preta) entre NAG e aminoácidos específicos de 2PHL.

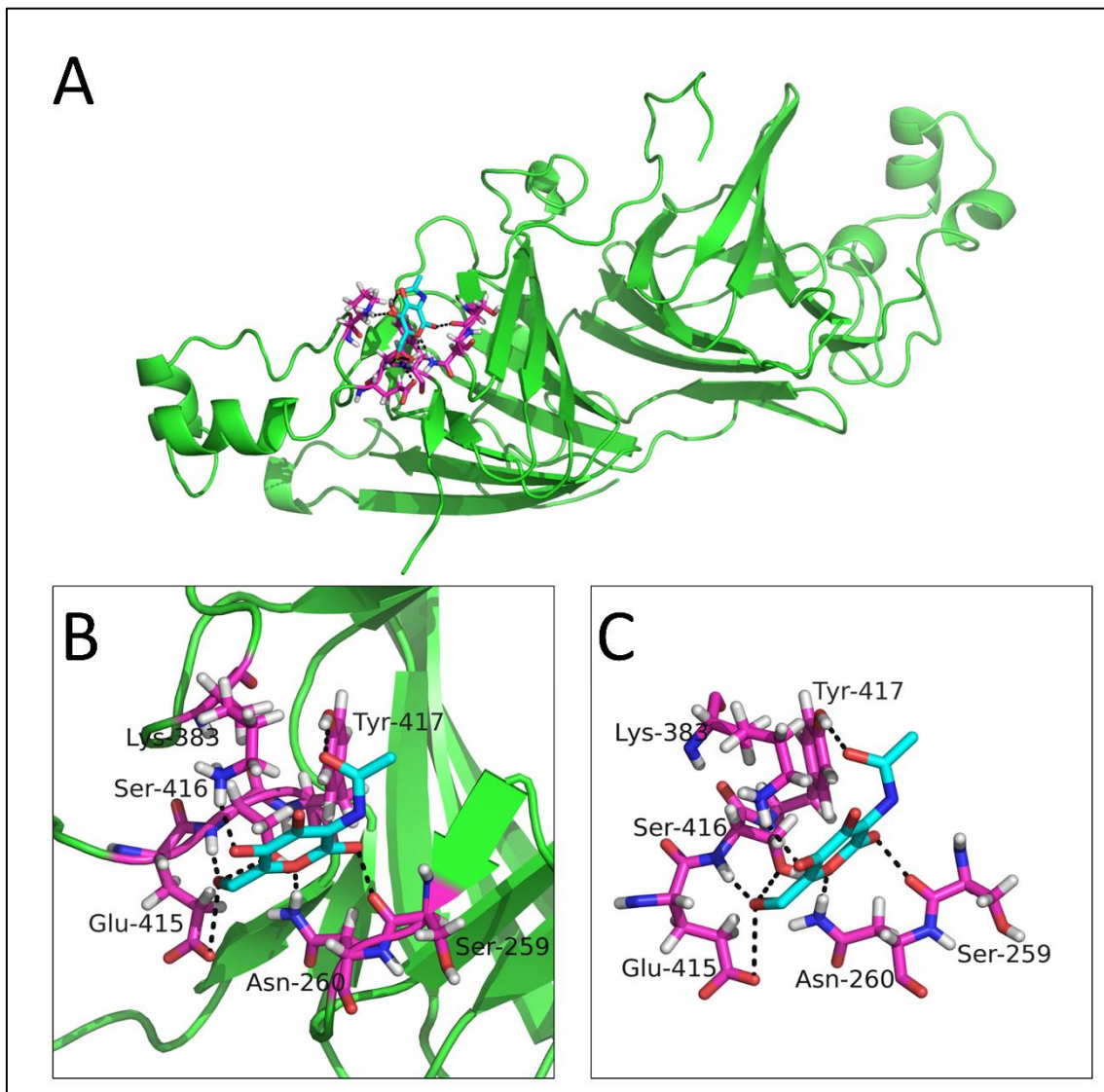


Figura 36: Experimento de *docking* molecular entre N-acetilglicosamina (NAG) e a proteína 21CAV. Docking molecular para o potencial de ligação de NAG com 1CAV. **A:** Visão geral do posicionamento do ligante em relação a estrutura inteira. **B e C:** Visão detalhada da melhor posição do ligante e das ligações de hidrogênio (linha pontilhada preta) entre NAG e aminoácidos específicos de 1CAV.

5- Discussão

O tegumento é a primeira barreira protetora das sementes contra a penetração de espécies de bruquídeos e por isso, o estudo da relação de tegumentos de sementes não hospedeiras e esses insetos pode ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de técnicas mais eficientes no controle dos mesmos (SOUZA et al., 2011).

A *Canavalia ensiformis*, também conhecida como feijão de porco ou “*Jack bean*”, em inglês, é uma planta arbustiva e pertence à família Fabaceae (RODRIGUES, 2004). É uma planta com hábito de crescimento espesso e relativamente livre do ataque de pestes (OLIVEIRA et al., 1999). Suas sementes possuem uma variedade de compostos tóxicos a pragas e patógenos, tais como o aminoácido não proteico canavanina, e várias proteínas como a vicilina canavalina, a lectina concanavalia A (Con A), inibidores de proteases, canatoxina, ureases e outros (CARLINI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1999). (OLIVEIRA et al., 1999) mostraram a presença de proteínas do tipo vicilina, proteínas tipicamente de reservas de cotilédones, nos tegumentos de *C. ensiformis*. Essa proteína foi altamente tóxica às larvas de *C. maculatus* quando incorporada em cotilédones artificiais. Posteriormente, foi observado que larvas neonatas de *C. maculatus* não foram capazes de atravessar o tegumento de sementes naturais de *C. ensiformis* (SOUZA et al., 2011). Embora esses trabalhos anteriores tenham avançado no sentido de confirmar o poder protetor dos tegumentos de *C. ensiformis* contra a penetração desse inseto e ainda a presença de moléculas tóxicas nesse tecido, ainda não foi possível identificar os mecanismos de toxicidade desses tegumentos para esse inseto e nem caracterizar as alterações morfológicas e bioquímicas sofridas pelas larvas que consumiram esses tecidos. Assim, esse trabalho estudou a toxicidade dos tegumento de *C. ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *C. maculatus*.

Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade dos tegumentos para insetos pode fornecer uma nova abordagem para o desenvolvimento de métodos de controle. O reforço dos mecanismos de defesa química dos tegumentos pode representar uma barreira mais eficiente de proteção, pois a toxicidade seria antecipada para estruturas mais externas das

sementes, minimizando a entrada do agressor e conseqüentemente os danos ao embrião.

Inicialmente, nesse trabalho, foi demonstrado que os tegumentos de *C. ensiformis* interferiram na oviposição de fêmeas, na penetração e na sobrevivência de larvas neonatas de *C. maculatus*. Entretanto, quando avaliamos o desenvolvimento embrionário, nossos resultados mostraram que este ocorreu simultaneamente e sem alterações morfológicas aparentes sobre os tegumentos da semente hospedeira *V. unguiculata* e não hospedeira *C. ensiformis*. Foram analisados os principais eventos do desenvolvimento embrionário de insetos, tais como, extensão e retração da banda germinal e o fechamento dorsal sobre ambos os tegumentos e nenhuma anormalidade foi constatada. Esses resultados estão de acordo com os observados por (DE SÁ et al., 2014), onde foi demonstrado que o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* não foi morfológicamente afetado pelo tegumento de sementes não hospedeiras de *Phaseolus vulgaris* (cultivar vermelho), embora a penetração dessas larvas tenha sido bloqueada em parte por esses tegumentos.

A eclosão e penetração de larvas neonatas de *C. maculatus* sobre o tegumento de sementes hospedeiras e não hospedeiras vêm sendo estudadas por vários trabalhos (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2011, 2012). Um estudo com sete cultivares diferentes de soja, *Glycine max*, mostrou uma grande influência de alguns desses tegumentos na capacidade de infestação das sementes pelo inseto *C. maculatus*. A oviposição e a eclosão larval sobre os tegumentos foram drasticamente reduzida, chegando a até 100 % e 80 %, respectivamente. O tempo que as larvas levaram para atravessar os tegumentos de soja foi bem superior quando comparados com os dados de sementes hospedeiras de *V. unguiculata*, aumentando em mais de 100 % (OLIVEIRA et al., 2009). Quando comparadas as influências de tegumentos de sementes domesticadas, como feijões e sementes selvagens observou-se que essa toxicidade é independente da domesticação (SOUZA et al., 2011). Para sementes de ambas as denominações, selvagens ou domesticadas, foram observados efeitos tóxicos dos tegumentos causando a morte de larvas ainda dentro dos ovos, problemas de aderência dos ovos sobre os tegumentos, retardos na penetração e reduções nas massas larvais (SOUZA et al., 2011).

Estudando de forma mais detalhada, foi descrito o perfil das reservas energéticas durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre os tegumentos de sementes *V. unguiculata* e *C. ensiformis*. Em relação ao perfil proteico, nossos resultados mostraram uma riqueza de bandas com massas moleculares variadas, sendo duas bandas aparentemente majoritárias de 150 e 40 kDa que diminuíram de intensidade durante o desenvolvimento, principalmente no último tempo estudado. Essa diminuição de proteínas foi confirmada pela dosagem das proteínas solúveis que mostrou uma redução durante a embriogênese, restando apenas 15% dos níveis proteicos iniciais no tempo final de 96 HAO. Não foram observadas diferenças significativas entre o perfil ou níveis de proteínas em embriões desenvolvidos sobre tegumentos de *V. unguiculata* ou *C. ensiformis*. Diferentes classes de proteases são descritas como relacionadas com a degradação de proteínas do vitelo tais como proteases serínicas, cisteínicas (Catepsinas B e L) e aspárticas (catepsina D) (ABREU et al., 2004; MEDINA; LEON; VALLEJO, 1988; TAKAHASHI et al., 1993).

Dados preliminares do nosso grupo mostraram a presença de proteases aspártica do tipo catepsina D e proteases cisteínica do tipo catepsina L, em ovos de *C. maculatus* durante a embriogênese (BAPTISTA, 2015), indicando que essas proteases possam estar relacionadas com essa diminuição acentuada dos conteúdos de proteína durante o desenvolvimento embrionário.

Os custos metabólicos do desenvolvimento embrionário, ou seja a quantidade total de energia consumida por um embrião durante seu desenvolvimento, incluindo as demandas por crescimento, biossíntese e manutenção dos tecidos são consideradas altas (THOMPSON; STEWART, 1997). Em animais ovíparos, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do organismo materno. Assim, durante a embriogênese, é necessário o uso sistêmico das reservas energéticas depositadas nos ovócitos pela mãe, para que não ocorra nenhum comprometimento do embrião em formação (MATOVA; COOLEY, 2001; NIELSEN; BORCHERT, 2000). É sabido que ovos de artrópodes mobilizam grandes quantidades de proteínas do vitelo durante o desenvolvimento embrionário. Essas proteínas são consideradas reservas de aminoácidos, para a síntese de novas proteínas, e reserva energética para suportar o crescimento dos embriões (ABREU et al., 2004; LEAL et al., 2006; LOGULLO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1993).

Vários autores têm investigado a dinâmica metabólica durante a embriogênese de outras espécies. Durante o desenvolvimento embrionário dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Hyalomma dromedarii*, os níveis de proteínas totais se mantiveram constantes (CAMPOS et al., 2006; KAMEL; SHALABY; GHAZY, 1982). No coleóptera *Rhynchophorus palmarum* também não foram observadas alterações nos níveis proteicos durante a embriogênese (SANTANA et al., 2014a). Por outro lado, em *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria*, foi observado um aumento sutil dos níveis proteicos durante o desenvolvimento embrionário (NEMEC, 2002). De forma semelhante ao observado em nossos resultados, em *Drosophila melanogaster* os níveis proteicos decrescem aproximadamente 40% dos níveis iniciais (MEDINA; LEON; VALLEJO, 1988). Essa redução pode estar relacionada com a degradação dos grânulos de vitelo durante a embriogênese.

Uma das funções da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos (LOGULLO et al., 1998; YAMAMOTO; TAKAHASHI, 1993). Aminoácidos são necessários para a produção de energia ou de novas proteínas que desempenham funções vitais relacionadas ao metabolismo, estruturas, transporte e armazenamento (CHAPMAN, 2013). Em nossos resultados, foi demonstrado que durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, sobre ambos os tegumentos, os níveis totais de aminoácidos livres reduziram pela metade nas primeiras 48 HAO, seguido de um aumento até 60 HAO e uma nova redução até 96 HAO. Quando comparados os níveis de proteínas e aminoácidos livres durante as primeiras 48 HAO pode-se observar um sincronismo nas reduções. Esses resultados sugerem que no começo da embriogênese assim que os aminoácidos são disponibilizados já são encaminhados para suas rotas metabólicas, não ficando livres. Quando os aminoácidos foram analisados separadamente foi observado, sobre ambas as condições, que os níveis de glutamato, alanina, glicina, histidina, tirosina e prolina tiveram seu níveis aumentados, enquanto os níveis de asparagina, glutamina, treonina, serina e lisina diminuíram durante o período de 4-96 HAO. Alguns aminoácidos em insetos são envolvidos em processos de morfogênese, como a tirosina que possui um papel essencial na esclerotização cuticular (AHMED; HOPKINS; KRAMER, 1983). Outros ainda, como o glutamato, originam neurotransmissores (CHAPMAN, 2013) ou como a prolina livre que é

considerada fonte de α -cetogluturato para o ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração (FAHMY et al., 2004).

Avaliando outras reservas energéticas como os triacilgliceróis, observou-se que os seus conteúdos durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, sobre ambos os tegumentos, foi consumido em duas fases. Foi observada uma degradação pequena de aproximadamente 17 % até 48 HAO, seguida de um aumento do níveis até 72 HAO e então uma nova degradação até 96 HAO. Mesmo assim, foi observado que no final da embriogênese ainda restavam aproximadamente 70% dos níveis iniciais de triacilgliceróis. No carrapato *Boophilus microplus* os níveis de lipídeos são consumidos rapidamente a partir do sétimo dia de desenvolvimento, atingindo uma estabilização no final. Os altos índices de celularização durante esse período inicial de desenvolvimento justificaria o rápido consumo dos níveis lipídicos (CAMPOS et al., 2006). Durante o desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila melanogaster* foi demonstrado que em 5 HAO os níveis de lipídeos aumentaram, caindo posteriormente de maneira contínua até a eclosão larval. Em *Antheraea mylitta* os conteúdos lipídicos decresceram logo no primeiro dia, porém no segundo dia já apresentaram um aumento que permaneceu até o sexto dia da embriogênese e voltaram a cair no final do desenvolvimento (PANT; KUMAR; SINGH, 1979).

O metabolismo de carboidratos é indispensável para o correto desenvolvimento embrionário, uma vez que embriões com os níveis de carboidratos baixos têm uma interrupção no seu desenvolvimento (LAHNSTEINER; PATARNELLO, 2004). Em nossos resultados, foi demonstrado que durante o desenvolvimento embrionário sobre ambos os tegumentos os níveis de glicose foram similares. Subiram abruptamente durante as primeiras 24 HAO e após esse período ocorreu um forte consumo de glicose até 48 HAO, seguido de um aumento contínuo e gradual até 96 HAO. Possivelmente o rápido consumo de parte dos níveis de glicose de 24 a 48 HAO pode estar relacionado com o processo de retração da banda germinal e/ou produção de quitina usada na organogênese e síntese da cutícula larval (REZENDE et al., 2008). De maneira contrária, também sobre ambos os tegumentos, os níveis de glicogênio foram degradados intensamente nas primeiras 24 HAO, aumentados quase que aos níveis iniciais até 48 HAO e novamente consumidos até 96 HAO. Esses

resultados indicam que os aumentos dos níveis de glicose durante o desenvolvimento de *C. maculatus* podem estar diretamente relacionados com a degradação de glicogênio. Em embriões de *Aedes aegypti*, os níveis de glicose e glicogênio aumentaram fortemente nas primeiras 15 horas de desenvolvimento (transição entre extensão e retração da banda germinal), sofrendo em seguida, uma redução contínua até o final do desenvolvimento embrionário (VITAL et al., 2010). No besouro *Rhynchophorus palmarum*, os níveis de glicose aumentaram aproximadamente 70 % até 48 horas de desenvolvimento embrionário e se mantiveram estáveis até 96 h. Na mesma proporção de aumento de glicose, também foi observada uma diminuição nos níveis de glicogênio (SANTANA et al., 2014a). Redução nos níveis de glicogênio também foi observada em embriões de *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria* durante o desenvolvimento embrionário (NEMEC, 2002). No besouro *Tribolium castaneum* os níveis de glicose permaneceram baixos durante as primeiras 20 horas de desenvolvimento e entre 20-24 horas ocorreu um grande aumento dos níveis de glicose, que foram reforçados nos próximos dois dias de desenvolvimento. Por outro lado, semelhante ao observado em *C. maculatus*, o glicogênio foi degradado em duas fases durante a embriogênese (FRAGA et al., 2013).

As análises dos conteúdos de proteína, triacilgliceróis e glicogênio durante a embriogênese de *C. maculatus* sobre os tegumentos de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* indicam que parte dessas reservas foram depositadas nos ovos pela mãe durante a ovogênese e foram clivadas desde o início do desenvolvimento, durante os processos de formação do blastoderma e extensão/retração da banda germinal. Tomados juntos, esses resultados apontam que o metabolismo energético dos embriões de *C. maculatus* seja um processo dinâmico que varie com a progressão dos estádios morfológicos e que o sucesso da embriogênese e dessa dinâmica metabólica independem do tegumento sobre o qual os ovos foram ovipositados.

Avaliando então o desenvolvimento de larvas em sementes naturais de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* nos tempos de 5, 12, 15 e 17 DAO notamos que enquanto as larvas do grupo controle tiveram um acentuado ganho de peso, as larvas dos experimentos com tegumentos de *C. ensiformis*, que permaneceram dentro dos ovos e não atravessaram os tegumentos, apresentaram massas que pouco variaram durante o desenvolvimento. No ciclo de vida de *C. maculatus*,

as larvas após a eclosão, alcançam os cotilédones das sementes e passam a ter uma intensa alimentação, consumindo as reservas energéticas estocadas nesse tecido (BASTOS, 1981; DE SÁ et al., 2014).

No ciclo de vida de insetos holometábolos, o nível de reservas estocadas é fundamental, já que, as reservas acumuladas durante a alimentação na fase larval são utilizadas nos processos de metamorfose e irão prover nutrientes principalmente para o inseto adulto (MIRTH; RIDDIFORD, 2007). Em larvas que se desenvolveram em sementes de *V. unguiculata* foi observado o aumento progressivo dos níveis de proteína, triacilgliceróis, glicose e glicogênio no período de 5 a 17 DAO. Por outro lado, durante a tentativa de atravessar o tegumento de *C. ensiformis* as larvas de *C. maculatus* não tiveram aumentos nos níveis dessas moléculas, onde para algumas delas as concentrações ainda diminuíram. A variação nas concentrações dessas reservas relacionadas a mudanças na alimentação foram vistas em larvas de *Rhynchophorus palmarum* que quando alimentadas com dietas artificiais tiveram taxas de acúmulo de reservas energéticas alteradas, refletindo no ganho de peso e na sobrevivência ao longo do desenvolvimento (SANTANA et al., 2014b).

O sucesso do desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* durante a infestação das sementes hospedeiras de feijão, está relacionado, dentre outros fatores, a capacidade da utilização dos nutrientes estocados nos cotilédones. Para os feijões do gênero *Vigna*, essas reservas são constituídas principalmente de proteínas e carboidratos, logo a utilização das reservas proteicas dos alimentos por esses insetos é dependente da ação coordenada de enzimas digestivas, principalmente proteases e carboidrases (PEDRA et al., 2003; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015).

Para algumas espécies de bruquídeos, inclusive *C. maculatus*, proteases aspárticas e cisteínicas além das carboidrases como α -amilases e α -glucosidases foram descritas por desempenharem papéis importantes na digestão (LEMOS et al., 1990; MURDOCK et al., 1987; PEDRA et al., 2003; SILVA; XAVIER-FILHO, 1991; TERRA; CRISTOFOLETTI, 1996). Através de análises transcriptômicas foram identificados aproximadamente 20 genes que codificam enzimas potencialmente envolvidas na digestão de larvas de *C. maculatus*, incluindo proteases cisteínicas e aspárticas e amilases (PEDRA et al., 2003).

Nesse trabalho nós observamos que durante o desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* em sementes de *V. unguiculata* as atividades de proteases aspárticas, cisteínicas, α -amilases e α -glucosidases aumentaram progressivamente, principalmente a partir do 12^o DAO, já nas larvas desenvolvidas sobre os tegumentos de *C. ensiformis* as atividades dessas enzimas digestivas foram bem inferiores. As atividade de proteases cisteínicas α -amilases e α -glucosidases diminuíram ainda mais ao longo do desenvolvimento, já a atividade das proteases aspárticas embora apresentassem um aumento, se mantiveram inferiores aos níveis observados nas larvas controle. (DE SÁ et al., 2014), mostraram que o tegumento natural de sementes não hospedeiras de *Phaseolus vulgaris* influenciou negativamente o desenvolvimento de *C. maculatus* e que sua toxicidade foi relacionada com a inibição nas atividades das enzimas digestivas α -amilases, α -glucosidases e proteases cisteínicas. Alguns cultivares de *V. unguiculata* relativamente resistentes à infestação por *C. maculatus* também tiveram essa resistência relacionada a interferência das atividade de enzimas digestivas das larvas. A atividade de proteases cisteínicas foi dramaticamente reduzida em larvas que se desenvolveram em sementes dos cultivares BRS Pajeú, BRS Guariba, BRS Tucumaque e BRS Xiquexique. Além disso, a atividade de α -glucosidases foi reduzida em aproximadamente 60 % em larvas que se desenvolveram no cultivar BRS Tucumaque (CRUZ et al., 2016). Alterações nas atividades de enzimas digestivas em resposta a dietas contendo diferentes compostos vegetais têm sido observadas em outros insetos e associadas com estratégias de defesa de plantas. As atividades de carboidrases e proteases de insetos podem sofrer alterações de acordo com o conteúdo de proteínas e carboidratos na dieta, sugerindo que insetos possuam mecanismos de modulação dos níveis de enzimas digestivas em resposta à composição da dieta (BOUAYAD et al., 2008; FABRES et al., 2014; NASERI et al., 2010). (FABRES et al., 2014) mostraram que as atividades de enzimas digestivas de larvas do besouro *Tribolium castaneum* variaram de acordo com diferentes dietas. A atividade de α -amilases de larvas alimentadas com farinha de *V. unguiculata* aumentou cerca de 50 % quando comparada à de larvas alimentadas com farinha de trigo, comportamento oposto ao da atividade de proteases serínicas que diminuiu em larvas alimentadas com farinha de *V. unguiculata*. A transcrição de genes relacionados

aos processos digestivos de larvas de *C. maculatus* variou em resposta a trocas alimentares. Após uma alimentação artificial contendo uma cistatina de soja (inibidor de proteases cisteínicas) foi observada a redução da transcrição de genes que codificam proteases do tipo cisteínicas, α -amilases e β -glicosidases e o aumento da transcrição de genes que codificam proteases aspárticas (CHI et al., 2009). Adicionalmente, foi mostrado o papel de uma protease aspártica do tipo catepsina D (CmCatD) como uma potencial defesa de larvas de *C. maculatus* contra fitocistatinas. O número de transcritos de CmCatD foi mais abundante em larvas que se alimentaram de uma dieta contendo fitocistatina que no grupo controle (AHN; ZHU-SALZMAN, 2009). A análise do proteoma intestinal de larvas que se alimentaram de uma dieta também contendo uma fitocistatina de soja revelou a diminuição da tradução de enzimas relacionadas a digestão como proteases cisteínicas, amilases e glicosidases. Também foram responsivas a alimentação, proteínas relacionadas com transcrição/tradução e reações anti-estresse (NOGUEIRA et al., 2012).

Devido às suas propriedades de dureza e espessura, o tegumento sempre esteve relacionado com a proteção física das sementes. Nesse trabalho, nós mostramos que o tegumento de *C. ensiformis* é aproximadamente três vezes mais espesso que o de *V. unguiculata*. Assim, para avaliar a relação entre espessura e dureza com os efeitos causados no desenvolvimento de *C. maculatus* nós utilizamos um sistema de sementes artificiais feitas com tegumentos artificiais compostos por diferentes concentrações de farinha de tegumento de *C. ensiformis*. Foi observado um efeito dose-dependente do tegumento de *C. ensiformis* refletindo em reduções na oviposição de fêmeas, sobrevivência e peso larval. Concentrações de 80 e 100% de tegumento de *C. ensiformis* foram letais para as larvas de *C. maculatus*. Dessa forma, nossos resultados sugerem a presença de substâncias tóxicas no tegumento de *C. ensiformis*.

Essa técnica de tegumentos artificiais vem sendo útil em nossos estudos para comprovar que os efeitos deletérios apresentados por alguns tegumentos estão também relacionados a composição dos tegumentos e não só a sua dureza e espessura. Com essa técnica comprovou-se que sementes cobertas com tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *Phaseolus vulgaris* (DE SÁ et al., 2014) foram extremamente tóxicas para *C. maculatus*.

Tegumentos artificiais contendo 2 e 3 % de farinha de tegumento de *Albizia lebbbeck* causaram mortalidades larvais de aproximadamente 90 e 100 %, respectivamente (SILVA et al., 2016).

Larvas de *C. maculatus* que se desenvolveram após atravessarem os tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *C. ensiformis* também apresentaram alterações na atividade de enzimas digestivas. Nas concentrações de 40 e 60 % foram observadas reduções nas atividades de proteases cisteínicas, α -amilases e α -glucosidasas. De maneira contraditória, a atividade de proteases aspárticas aumentou nessas larvas. Esse aumento na atividade de proteases aspárticas sugere um possível mecanismo de efeito compensatório da larva para burlar os prejuízos da inibição das proteases cisteínicas, e reforça a ideia de que larvas de *C. maculatus* podem dispor de um mecanismo de rearranjo genômico/proteômico em resposta a diferentes dietas (CHI et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2012). Nossos resultados com tegumentos artificiais ainda comprovaram a ingestão de proteínas dos tegumentos de *C. ensiformis* por larvas e a possível retenção dessas proteínas no trato intestinal. Mesmo 14 dias após a larva ter atravessado o tegumento artificial contendo proteínas de tegumento de *C. ensiformis* marcadas com FITC uma fluorescência ainda foi detectada no intestino, reforçando a ideia de uma possível retenção. Resultados semelhantes foram observados em sementes cobertas com tegumentos contendo 10 % de farinha de tegumento de *P. vulgaris* marcadas com FITC (DE SÁ et al., 2014).

Para a proteção contra possíveis injúrias e penetração de microrganismos, o intestino de muitas espécies de insetos é revestido por uma camada acelular, composta principalmente por quitina e proteínas. Dependendo da consistência essa estrutura é denominada membrana peritrófica (MP) ou gel peritrófico (GP).

A MP e GP estão ainda relacionados com a reciclagem de enzimas digestivas durante a alimentação (CHAPMAN, 2013; TERRA, 2001). Muitos trabalhos sugerem que a ligação de proteínas do alimento à quitina presente nessas estruturas, pode interferir nas funções da MP ou GP que são vitais para os insetos (MOTA et al., 2003; PAES et al., 2000; SALES et al., 2001).

Assim, uma possível ligação de proteínas dos tegumentos de *C. ensiformis* no gel peritrófico de *C. maculatus* pode justificar essa retenção de

proteínas no intestino e pode estar relacionada, pelo menos em parte com os efeitos tóxicos desse tecido para *C. maculatus*.

Dentre as proteínas cujas toxicidades contra insetos estão relacionadas com a ligação a quitina, destacam-se as vicilinas por serem abundantes em sementes. Vicilinas são proteínas com função primária de reserva, mas também relacionadas com a defesa das sementes contra pragas e patógenos (MACEDO et al., 1993; SALES et al., 2000). Trabalhos mostraram que vicilinas tóxicas são pouco digeridas por proteases do intestino do inseto *C. maculatus* (SALES; MACEDO; XAVIER-FILHO, 1992). Além disso, algumas vicilinas apresentam afinidade por matrizes de quitina e a estruturas que contêm quitina do intestino médio de insetos como MP e GP (MOTA et al., 2003; PAES et al., 2000; SALES et al., 1996; YUNES et al., 1998). Peptídeos obtidos após a hidrólise de vicilinas por quimotripsina mantiveram suas propriedades tóxicas para o inseto *C. maculatus* e sua capacidade de ligação a quitina (UCHÔA et al., 2009). Os autores sugerem que a digestão dessas vicilinas no trato intestinal das larvas de *C. maculatus* esteja gerando peptídeos tóxicos que podem ser absorvidos no trato intestinal. Dados anteriores já haviam mostrado a presença de vicilinas na hemolinfa, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi de larvas de *C. maculatus* (UCHÔA et al., 2006).

Vicilinas também foram detectadas nos tegumentos de sementes como *Canavalia ensiformis* (OLIVEIRA et al., 1999), *Phaseolus lunatus* (MORAES et al., 2000), *Phaseolus vulgaris* (SILVA et al., 2004) e *Albizia lebbek* (SOUZA et al., 2012) e essas proteínas foram tóxicas ao inseto *C. maculatus* quando incorporadas em cotilédones artificiais, entretanto seus efeitos sobre o desenvolvimento do inseto, quando concentradas apenas nos tegumentos artificiais permanecem desconhecidos.

Com o intuito de investigarmos se as vicilinas de tegumento de *C. ensiformis* são tóxicas para *C. maculatus* quando incorporadas aos tegumentos artificiais, isolamos uma fração rica nessas vicilinas, denominada F 70-90 e observamos que 60 % dessa fração é composta por proteínas imunorrelacionadas a vicilinas. Quando essa fração foi incorporada em tegumentos artificiais na concentração de 2 %, fortes reduções na oviposição, na sobrevivência e no peso de larvas de *C. maculatus* foram observadas. Além disso, larvas que atravessaram esses tegumentos apresentaram reduções nas

atividades das enzimas digestivas: proteases cisteínicas, proteases aspárticas, α -amilase e α -glucosidase. Proteínas da F70-90, marcadas com FITC foram detectadas no trato intestinal das larvas com 20 DAO e pouca ou quase nenhuma marcação foi observada nas fezes, sugerindo uma retenção dessas proteínas no intestino das larvas.

Visto que trabalhos da literatura sugerem que os mecanismos de toxicidade das vicilinas para larvas de *C. maculatus* estejam relacionados com a afinidade a quitina (SALES et al., 2001; UCHÔA et al., 2009), fizemos_a análise *in silico* das possíveis interações de vicilinas com o monômero de quitina, N-acetilglicosamina (NAG). Baseados na similaridade de proteínas depositadas no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) com a sequência primária SLREEEESQDNDYF de vicilina de tegumento de *C. ensiformis* (OLIVEIRA et al., 1999) foram selecionadas duas proteínas de referência, a faseolina 2PHL e a cavanalina 1CAV, ambas com estruturas previamente resolvidas (KO et al., 1993; LAWRENCE et al., 1994). *Motifs* de interação com NAG foram identificados em ambas as sequências 2PHL e 1CAV, sendo dois na faseolina e três da canavalina. As análises de *docking* confirmaram o potencial de interação dessas proteínas com NAG. A vicilina 2PHL provavelmente interage com NAG através da formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Gly-227, enquanto a vicilina 1CAV forma uma ligação de hidrogênio com NAG através dos resíduos Glu-415, Ser-416, Tyr-417, Ser-259 e Asn-260. Embora esses resultados sejam bastante promissores para o entendimento das interações entre NAG e as vicilinas, é preciso lembrar que a quitina é um polímero constituído por dezenas de monômeros de N-acetilglicosamina, logo variações nessas interações podem acontecer.

Tomados em conjunto, nossos resultados mostraram que o efeito do tegumento de *C. ensiformis* para o inseto *C. maculatus* está relacionado com o desenvolvimento pós-embrionário e que proteínas do tipo vicilinas desse tecido estão envolvidas com essa toxicidade, provavelmente através da ligação à quitina presente no gel peritrófico dessas larvas. Essa ligação interfere com as funções normais do intestino reduzindo a atividade das principais enzimas digestivas.

6- Conclusões

- ✓ O tegumento natural de *C. ensiformis* influenciou na oviposição e impediu 100 % a penetração das larvas de *C. maculatus*;
- ✓ Embriões desenvolvidos sobre tegumentos naturais de *C. ensiformis* e da semente hospedeira *V. unguiculata* mostraram similaridade na morfologia e no perfil das principais reservas metabólicas;
- ✓ O tegumento natural de *C. ensiformis* interferiu no desenvolvimento larval, diminuindo a sobrevivência em 95 % no 19º dia após a oviposição e reduzindo drasticamente a massa das larvas;
- ✓ Larvas que se desenvolveram sobre tegumentos naturais de *C. ensiformis* apresentaram reduções nos níveis de proteínas, glicose livre, glicogênio, triacilglicerois e na atividade das enzimas digestivas;
- ✓ Compostos dos tegumentos de *C. ensiformis* interferiram nos parâmetros de desenvolvimento do inseto, diminuindo a oviposição, a massa e sobrevivência das larvas e a atividade de enzimas digestivas;
- ✓ Proteínas do tegumento de *C. ensiformis* foram ingeridas pelas larvas e se mantiveram no intestino mesmo 15 dias após a oviposição, indicando uma retenção;
- ✓ Fração rica em vicilinas, isolada do tegumento de *C. ensiformis*, foi tóxica para larvas de *C. maculatus*, quando incorporada em tegumentos artificiais, reduzindo a oviposição, a massa e sobrevivência das larvas e a atividade de enzimas digestivas;
- ✓ Proteínas da fração rica em vicilinas ficaram retidas no intestino e foram detectadas nas larvas 20 dias após a oviposição.
- ✓ Análises *in silico* identificaram sítios de interação entre vicilinas e o monômero de quitina, N-acetilglicosamina. Essas interações moleculares, envolvem a formação de ligações de hidrogênio com aminoácidos específicos.

7- Referências Bibliográficas

ABREU, L. A. et al. Proteolytic activity of Boophilus microplus Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 5, p. 443–449, 2004.

AHMED, R. F.; HOPKINS, T. L.; KRAMER, K. J. Tyrosine and tyrosine glucoside titres in whole animals and tissues during development of the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.). **Insect Biochemistry**, v. 13, n. 4, p. 369–374, 1983.

AHN, J.-E. et al. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect molecular biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, dez. 2004.

AHN, J.-E.; ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 8, p. 678–685, ago. 2009.

BAPTISTA, K. E. V. **Mudanças bioquímicas e morfológicas em ovos de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) ovipositados sobre tegumentos de *Vigna unguiculata* e *Canavalia ensiformis*.** [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, 2015.

BASTOS, J. A. M. **Principais pragas de cultivares e seus controles.** São Paulo: Editora Nobel, 1981.

BEWLEY, J. D. Breaking down the walls — a role for endo- α -mannanase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 12, p. 464–469, 30 mar. 2017.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination.** 2. ed. New York: Pl. Press, 1992.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252-8, jul. 2014.

BOUAYAD, N. et al. Effects of different food commodities on larval development and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 4, p. 373–378, 2008.

BRIEGEL, H.; GUT, T.; LEA, A. O. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 3, p. 249–260, mar. 2003.

BRUNELLE et al. Protein hydrolysis by colorado potato beetle, *leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 42, n. 1, p. 88–98, set. 1999.

BRUSCA, R.C . BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

CAMPOS, E. et al. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 3–4, p. 349–357, 2006.

CARLINI, C. R. et al. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. **Journal of economic entomology**, v. 90, n. 2, p. 340–348, abr. 1997.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 11, p. 1515–1539, nov. 2002.

CASTRO, M. S.; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 13–18, jan. 2005.

CHAPMAN, R. F. **The Insects Structure and Function**. 5º ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

CHI, Y. H. et al. Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin--costs and benefits of counter-defence. **Insect molecular biology**, v. 18, n. 1, p. 97–110, fev. 2009.

CRUZ, L. P. et al. Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 1, p. 117–128, 29 mar. 2016.

DA FONSECA, R. N.; GOMES, H.; ARAÚJO, H. Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes . In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. [s.l.] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. p. 1–34.

DE SÁ, L. F. R. et al. Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 60, n. 1, p. 50–57, 2014.

DINKEL, H. et al. The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D259-66, jan. 2014.

ERTHAL, M. J.; PERES SILVA, C.; SAMUELS, R. I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. **Journal of insect physiology**, v. 50, n. 10, p. 881–891, out. 2004.

FABRES, A. et al. Comparative performance of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) on different plant diets. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 3, p. 495–506, 2014.

FAHMY, A. S. et al. Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 137, n. 2, p. 159–168, fev. 2004.

FIELDS, P. G.; XIE, Y. S.; HOU, X. Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. **Journal of stored products research**, v. 37, n. 4, p. 359–370, out. 2001.

FRAGA, A. et al. Glycogen and Glucose Metabolism Are Essential for Early Embryonic Development of the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

GALLO, D. et al. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002.

GATEHOUSE, A. M. R. et al. Presence and partial characterisation of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, n. 3, p. 279–286, 1985.

GILBERT, L. I. **INSECT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY**. 1. ed. London: Elsevier Ltd, 2012.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. . **Developmental Biology**. 11. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2013.

GILLOTT, C. **Entomology**. 3^o ed. Dordrecht: Springer, 2005.

GOMES, V. M.; XAVIER-FILHO, J. Biochemical defenses of plants. **Arq. Biol. Technol.**, v. 37, n. 2, p. 371–383, 1994.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal of insect physiology**, v. 53, n. 8, p. 760–773, ago. 2007.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 431, n. 1, p. 145–159, nov. 2004.

HILDEBRANDT, A.; BICKMEYER, I.; KÜHNLEIN, R. P. Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

JANZEN, D. H. How Southern Cowpea Weevil Larvae (*Bruchidae*: *Callosobruchus Maculatus*) Die on Nonhost Seeds. **Ecological Society of America**, v. 58, n. 4, p. 921–927, 1977.

KAMEL, M. Y.; SHALABY, F. Y.; GHAZY, A. E.-H. M. Biochemical studies of tick embryogenesis DNA, RNA, haemoprotein, guanosine and guanine in developing eggs of *Hyalomma dromedarii*. **Insect Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 15–23, 1982.

KAUFMANN, C.; BROWN, M. R. Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 2, p. 367–377, fev. 2008.

KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L. Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* F. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 3, n. 6, p. 561–575, 1986.

KO, T.-P. et al. Determination of three crystal structures of canavalin by molecular replacement. **Acta Crystallographica Section D**, v. 49, n. 5, p. 478–489, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LAHNSTEINER, F.; PATARNELLO, P. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. **Aquaculture**, v. 237, n. 1–4, p. 443–459, 2 ago. 2004.

LAWRENCE, J.F. BRITTON, E. . **The Insects of Australia**. Melbourne: Editora Victoria, 1991.

LAWRENCE, M. C. et al. Structure of Phaseolin at 2.2 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, n. 5, p. 748–776, 1994.

LEAL, A. T. et al. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 45, n. 1, p. 107–114, jan. 2006.

LEMOS, F. J. A. et al. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 56, n. 3, p. 219–227, 1990.

LIM, E. H. et al. Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosphatidyl domain. **Gene**, v. 277, n. 1–2, p. 175–186, out. 2001.

LOGULLO, C. et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116 (Pt 6, p. 525–532, jun. 1998.

MACEDO, M. L. R. et al. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 105, n. 1, p. 89–94, 1993.

MARANHÃO, Z. C. **Entomologia Geral**. 2º ed. São Paulo: Editora Nobel, 1977.

MATOVA, N.; COOLEY, L. Comparative Aspects of Animal Oogenesis. **Developmental Biology**, v. 231, n. 2, p. 291–320, 15 mar. 2001.

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 145–149, 2003.

MEDINA, M.; LEON, P.; VALLEJO, C. G. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 263, n. 2, p. 355–363, jun. 1988.

MICHAUD, D. et al. Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 3, p. 497–503, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MIRTH, C. K.; RIDDIFORD, L. M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 4, p. 344–355, abr. 2007.

MOÏSE, J. A. et al. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 5, p. 620–644, 2005.

MOON, J. et al. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. **Insect molecular biology**, v. 13, n. 3, p. 283–291, jun. 2004.

MORAES, J. et al. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 528–533, abr. 2007.

MORAES, R. A. et al. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 33, n. 2, p. 191–198, fev. 2000.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOTA, A. C. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 9, p. 873–880, set. 2003.

MOURA, F. T. et al. Effects of a chitin-binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 2, p. 260–266, jan. 2007.

MURDOCK, L. L. et al. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 783–787, 1987.

NASERI, B. et al. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest management science**, v. 66, n. 12, p. 1316–1323, dez. 2010.

NEMEC, V. Quantitative changes in protein, glycogen and fat content in the eggs of the locusts, *Locusta migratoria migratorioides* and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), during embryogenesis. **EJE**, v. 99, n. 4, p. 557–559, 2002.

NIELSEN, J. E.; BORCHERT, T. V. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1543, n. 2, p. 253–274, dez. 2000.

NOGUEIRA, F. C. S. et al. Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2704–2715, ago. 2012.

OERKE, E.-C., DEHNE, H.-W., SCHONBECK, F., WEBER, A. **Crop Production and Crop Protection—Estimated Losses in Major Food and Cash Crops**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994.

OLIVEIRA, A. E. A. et al. The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 3, p. 249–255, 1999.

OLIVEIRA, A. E. A. et al. Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 101, n. 3, p. 225–231, 2001.

OLIVEIRA, A. E. A. et al. Influence of the soybean seed coat upon seed infestation and development of *Callosobruchus maculatus* larvae. In: **Soybean and Wheat Crops: Growth, Fertilization, and Yield: Soybean crops: growth, fertilization and yield**. New York: Nova Science Publishers, 2009.

OVERGAARD, J. et al. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. **Journal of insect physiology**, v. 53, n. 12, p. 1218–1232, dez. 2007.

PAES, N. S. et al. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **Journal of insect physiology**, v. 46, n. 4, p. 393–402, abr. 2000.

PANIZZI, A.R. PARRA, J. R. . **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Editora Manole, 1991.

PANT, R.; KUMAR, S.; SINGH, S. D. Changes in carbohydrates and lipids during embryonic development of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera). **Journal of Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 27–33, 1979.

PEDRA, J. H. F. et al. Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and alpha-amylases associated with food breakdown. **Insect molecular biology**, v. 12, n. 4, p. 405–412, ago. 2003.

PEREIRA, P. R. V. S.; ALMEIDA, L. M. Chaves para a identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 1, p. 271–283, 2001.

POWELL, R. G. Plant Seeds as Sources of Potential Industrial Chemicals, Pharmaceuticals, and Pest Control Agents. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 516–523, 27 mar. 2009.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. London: Academic Press, 2012.

REID, C. A. M. Invertebrate Taxonomy. **Invertebrate Taxonomy**, v. 14, p. 589–665, 2000.

REZENDE, G. L. et al. **Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle** BMC Developmental Biology, 2008.

RODRIGUES, J. E. L. F. A importância do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) como cultura intercalar em rotação de milho e feijão caupi em cultivo de coqueirais no município de Ponta de Pedras/Marajó-PA. v. 1, p. 96, 2004.

SALES, M. P. et al. Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 29, n. 3, p. 319–326, mar. 1996.

SALES, M. P. et al. Do Legume Storage Proteins Play a Role in Defending Seeds against Bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 515–522, 2000.

SALES, M. P. et al. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 27–34, 2001.

SALES, M. P.; MACEDO, M. L.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 130, n. 4, p. 945–950, 1992.

SANTANA, C. C. et al. Embryonic development of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae): dynamics of energy source utilization. **Journal of insect science (Online)**, v. 14, 2014a.

SANTANA, C. C. et al. Avaliação do desenvolvimento e reservas energéticas de larvas de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) em diferentes dietas. **grária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 2, p. 205–209, 2014b.

SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (Coleoptera: bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 529–533, 1991.

SILVA, L. B. et al. The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 1, p. 57–65, 2004.

SILVA, N. C. M. et al. *Albizia lebbek* Seed Coat Proteins Bind to Chitin and Act as a Defense against Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3514–3522, 2016.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

SMITH, C. M.; CLEMENT, S. L. Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual review of entomology**, v. 57, p. 309–328, 2012.

SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. **Annual Reviews of Entomology**, v. 24, n. 1, p. 449–473, 1979.

SOUZA, A. J. et al. Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Crop Protection**, v. 30, n. 6, p. 651–657, jun. 2011.

SOUZA, A. J. et al. Identification of *Albizia lebbek* seed coat chitin-binding vicilins (7S globulins) with high toxicity to the larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 118–124, 2012.

STEWART, J. R.; THOMPSON, M. B. a Novel Pattern of Embryonic Nutrition in a Viviparous Reptile. **Journal of experimental biology**, v. 174, n. 1993, p. 97–108, 1993.

STROBL, S. et al. The alpha-amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. **FEBS letters**, v. 409, n. 1, p. 109–114, jun. 1997.

STROBL, S. et al. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 278, n. 3, p. 617–628, maio 1998.

TAKAHASHI, S. Y. et al. No Title Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro. **J. Biochem.**, v. 114, p. 267–272, 1993.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 47, n. 2, p. 47–61, jun. 2001.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 725–730, 1996.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 4, p. 174–224, 2005.

THIERY, D.; JARRY, M.; POUZAT, J. To penetrate or not to penetrate? A behavioral choice by bean beetle first-instar larvae in response to *Phaseolus vulgaris* seed surface quality. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 8, p. 1867–1875, ago. 1994.

THOMPSON, M. B.; STEWART, J. R. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 3, p. 647–654, 1997.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, set. 1979.

TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 467–500, 2002.

UCHÔA, A. F. et al. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 169–178, fev. 2006.

UCHÔA, A. F. et al. Toxicity of Hydrolyzed Vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and Phytopathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 8056–8061, 9 set. 2009.

VANIN, S.; BUBACCO, L.; BELTRAMINI, M. Seasonal variation of trehalose and glycerol concentrations in winter snow-active insects. **Cryo letters**, v. 29, n. 6, p. 485–491, 2008.

VITAL, W. et al. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. **BMC Developmental Biology**, v. 10, p. 25, 2010.

VLECK, D. **Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual review of plant biology**, v. 56, p. 253–279, 2005.

WHITING, M. F. Phylogeny of the holometabolous insect orders: Molecular evidence. **Zoologica Scripta**, v. 31, n. 1, p. 3–15, 2002.

WILIAMS, J. O. Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. **Tropical Grain Legume Bulletin**, v. 26, p. 5–10, 1980.

XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimento. Organização dos Estados Americanos (OEA)**. 1º ed. [s.l.] Editora Universitária – UFC, 1993.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, S. Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 35–45, set. 1993.

YOUSEF, M. I. et al. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. **Toxicology**, v. 189, n. 3, p. 223–234, ago. 2003.

YUNES, A. N. A. et al. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 1, p. 111–116, 1998.

ZHU-SALZMAN, K. et al. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect molecular biology**, v. 12, n. 2, p. 135–145, abr. 2003.

ZHU-SALZMAN, K.; SALZMAN, R. A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of economic entomology**, v. 94, n. 5, p. 1280–1284, out. 2001.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual review of entomology**, v. 60, n. October 2014, p. 233–52, 2015.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 4, p. 264–272, abr. 2006.