



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

**Proteínas com potencial inseticida de sementes de  
*Clitoria fairchildiana***

MARIA APARECIDA ARIDE BERTONCELI

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Valevski Sales Fernandes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO DE 2018

**MARIA APARECIDA ARIDE BERTONCELI**

**Proteínas com potencial inseticida de sementes de  
*Clitoria fairchildiana***

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Centro de Biociências e Biotecnologia  
da UENF como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestre  
em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Kátia Valevski Sales Fernandes

**Campos dos Goytacazes - RJ  
Fevereiro de 2018**

# **Proteínas com potencial inseticida de sementes de *Clitoria fairchildiana***

MARIA APARECIDA ARIDE BERTONCELI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em: 26 /02 /2018

Aprovada por:

---

Drº. André de Oliveira Carvalho (UENF)

---

Drº Francisco José Alves Lemos (UENF)

---

Drª. Luciana Belarmindo da Silva (IFF)

---

Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes (orientadora) (UENF)

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me mantido forte para superar todos os obstáculos pelo caminho para chegar até aqui;

À minha querida orientadora Dr<sup>a</sup>. Kátia Valevski Sales Fernandes por todo estímulo, paciência, carinho e atenção durante a minha formação. Agradeço também pela sua valiosa amizade e pelos momentos felizes que vivemos;

À Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio de Oliveira, por todo o tempo, suporte e atenção dispensados a mim. Sua atenção foi de grande valia na minha formação;

À Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol Gaspar de Matos, por todo incentivo, carinho, apoio e amizade, foi muito importante para minha formação;

À Dr<sup>a</sup>. Nathalia Bastos Lima de Andrade, por ter me dado a oportunidade de conhecer o LQFPP, a minha orientadora, por todo incentivo, apoio e amizade;

À Dr<sup>a</sup>. Érica Mello por ter aceitado revisar essa dissertação, por todo apoio sempre prestado e pela sua amizade;

Ao Dr<sup>o</sup>. Francisco José Alves Lemos, ao Dr<sup>o</sup>. André Teixeira Ferreira e a Dr<sup>a</sup>. Luciana Belarmindo da Silva, por aceitarem fazer parte da banca examinadora e contribuir para enriquecer meu trabalho;

Aos professores, alunos e técnicos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) e do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), pela boa vontade e presteza em me auxiliar em tudo que precisei;

À minha amiga Fernanda Silva Coelho, por ter estado sempre comigo durante essa caminhada, dando apoio e incentivo nos momentos difíceis e brindando os momentos felizes;

Agradeço também a todos os meus amigos de laboratório, que tornaram meus dias mais felizes e fazem do LQFPP um local agradável de trabalhar;

Aos meus pais Marlene e Sebastião pelo amor, apoio e incentivo de sempre. E por me ensinarem a correr sempre atrás dos meus objetivos e a escolher sempre o caminho certo;

Ao meu querido irmão Alexandre, pelo incentivo, carinho e amor;

À UENF, ao LQFPP e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte proporcionado.

# Sumário

Resumo .....	VIII
Abstract .....	IX
1 Introdução .....	1
1.1 Aspectos Gerais.....	1
1.2 Mecanismos de defesa de sementes contra insetos.....	2
1.2.1 Proteínas de sementes com ação inseticida .....	2
1.3 Insetos pestes de relevância agrônômica .....	4
1.3.1 <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	5
1.3.2 <i>Tribolium castaneum</i> .....	7
1.4 <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	9
1.4.1 Potencial biotecnológico das sementes do gênero <i>Clitoria</i> .....	10
2 Objetivos .....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3 Materiais e Métodos .....	13
3.1 Materiais Biológicos .....	13
3.1.1 <i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard (Fabaceae) .....	13
3.1.2 <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	13
3.1.3 <i>Tribolium castaneum</i> .....	13
3.2 Extração de proteínas das sementes de <i>C. fairchildiana</i> .....	14
3.3 Dosagem de proteínas .....	15
3.4 Visualização das proteínas por SDS-PAGE .....	15
3.5 Incorporação das frações proteicas em sementes artificiais.....	17
3.6 Incorporação de farinha e frações proteicas na alimentação de <i>T. castaneum</i> .....	18
3.7 Isolamento das proteínas tóxicas aos insetos .....	18
3.8 Caracterização de frações proteicas tóxicas aos insetos .....	19
3.8.1 Ensaio de atividade inibitória de proteases cisteínicas .....	19

3.8.2	Ensaio de atividade inibitória de proteases serínicas .....	20
3.9	Métodos de análises estatísticas realizadas .....	20
4	Resultados .....	20
4.1	Extração e dosagem proteica das frações obtidas de cotilédones de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	20
4.2	Visualização do perfil proteico das frações previamente extraídas por SDS-PAGE .....	21
4.3	Efeito de diferentes concentrações das frações proteicas de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> sobre o desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	23
4.4	Separação cromatográfica por exclusão molecular das proteínas tóxicas.....	27
4.5	Efeito de diferentes concentrações das frações cromatográficas sobre o desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	28
4.6	Visualização eletroforética das frações cromatográficas .....	30
4.7	Efeito de diferentes concentrações da farinha e das frações proteicas de cotilédones de <i>Clitoria fairchildiana</i> sobre o desenvolvimento de <i>Tribolium castaneum</i> .....	32
4.8	Determinação de atividade inibitória de papaína e tripsina nas frações proteicas de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> .....	38
4.8.1	Inibidores de papaína .....	38
4.8.2	Inibidores de tripsina .....	39
5	Discussão.....	39
	Conclusão .....	46
7	Referências.....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>C. maculatus</i> . .....	6
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>T. castaneum</i> . .....	8
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática de diferentes fases do ciclo de vida de <i>C. fairchildiana</i> . .....	10
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da extração das seis classes de proteínas de acordo com sua solubilidade. ....	14
<b>Figura 5:</b> Visualização gráfica da quantificação de proteínas das diferentes frações pelo método de BCA, descrito por Smith (1985). ....	21
<b>Figura 6:</b> Visualização eletroforética do perfil proteico das frações de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> . ....	22
<b>Figura 7:</b> Média do peso das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com as frações proteicas F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> , em sistema de sementes artificiais. ....	24
<b>Figura 8:</b> Sobrevivência (figura 6A) e média do peso (figura 6B) das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com as frações proteicas F1 e F3 de <i>C. fairchildiana</i> , em sistema de sementes artificiais. ....	26
<b>Figura 9:</b> Cromatografia da fração 1 (albuminas) em coluna de exclusão molecular Sephadex G50 (eluente tampão fosfato de sódio 100 mM NaCl 100 mM, pH 7,6). ....	27
<b>Figura 10:</b> Cromatografia da fração 3 (albuminas) em coluna de exclusão molecular Sephadex G50 (eluente tampão fosfato de sódio 100 mM NaCl 100 mM, pH 7,6) ....	28
<b>Figura 11:</b> Média do peso das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com os picos cromatográficos da fração proteica F1 de <i>C. fairchildiana</i> , em sistema de sementes artificiais. ....	29
<b>Figura 12:</b> Média do peso das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com os picos da fração proteica F3 de <i>C. fairchildiana</i> , em sistema de sementes artificiais. ....	30
<b>Figura 13:</b> Visualização eletroforética do perfil proteico dos picos da fração F1 de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> . ....	31
<b>Figura 14:</b> Visualização eletroforética do perfil proteico dos picos da fração F3 de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> . ....	32
<b>Figura 15:</b> Sobrevivência (A) e peso de larvas (B) de <i>T. castaneum</i> , após 15 dias de consumo de farinha de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> . ....	33

<b>Figura 16:</b> Efeito da incorporação da farinha de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> sobre a sobrevivência de <i>T. castaneum</i> .....	34
<b>Figura 17:</b> Efeito da incorporação das frações proteicas de sementes de <i>C. fairchildiana</i> na sobrevivência de <i>T. castaneum</i> .....	35
<b>Figura 18:</b> Efeito da incorporação das frações proteicas de sementes de <i>C. fairchildiana</i> nos estágios de vida de <i>T. castaneum</i> . .....	37
<b>Figura 19:</b> Ensaio de atividade de inibição da papaína. O eixo X representa as frações proteicas e o eixo Y representa os valores de UIP (Unidades de Inibição da Papaína).....	38

## **Abreviaturas**

APS – *Amonium persulfate*

BAPNA – *N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida*

BCA - *Bicinconic acid*

CaCl<sub>2</sub> - *Cloreto de cálcio*

DMSO - *Dimetilsulfóxido*

DTT - *Ditiotreitol*

NaCl – *Cloreto de sódio*

NaOH – *Hidróxido de sódio*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

TEMED - *N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina*

UIP - *Unidade de atividade inibitória de papaína*

RIPs – *ribosome inactivating proteins*

## Resumo

*Clitoria fairchildiana* é uma leguminosa nativa da Amazônia, frequentemente utilizada em programas de arborização urbana e rural. Na literatura, não tem estudos sobre a predação destas sementes por insetos. Por esta razão, hipotetizamos que estas contêm um arsenal defensivo inexplorado, com elevado potencial inseticida, e pretendemos investigar a natureza proteica de tais defesas. A estratégia experimental foi fracionar a farinha de cotilédones em grupos de proteínas de acordo com sua solubilidade; foram obtidas albuminas – solúveis em água (F1), globulinas – solúveis em NaCl 0,5 M (F2), kafirinas – solúveis em 2-propanol a 60% (F3), glutelinas – solúveis em tampão borato 0,1 M, pH 10,8 (F4), kafirinas com ligações cruzadas – solúveis em 2-propanol a 60% com 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (F5) e glutelinas com ligações cruzadas – solúveis em tampão borato 0,1 M, pH 10,8, contendo 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (F6). Todas as frações proteicas foram quantificadas e visualizadas por SDS-PAGE. Para avaliar o potencial inseticida, utilizaram-se os modelos de insetos *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*. As frações proteicas foram incorporadas na dieta de ambos os insetos em diferentes concentrações (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%) para *Callosobruchus maculatus* e 5% para *T. castaneum*, somente para este último a farinha de cotilédones foi diretamente testada, nas concentrações de 10%, 20% e 30%. As larvas alimentadas com dietas controle e dietas testes foram contadas e pesadas. As frações mais tóxicas a *C. maculatus* (F1 - albuminas e F3 - kafirinas) foram submetidas a processos de sub-fractionamento de suas proteínas, por cromatografia de exclusão molecular, de onde obtiveram-se os picos – F1P1, F1P2, F1P3 e F1P4 e as F3P1, F3P2 e F3P3. Todos os picos cromatográficos foram novamente testados contra *C. maculatus*, em ensaios de sementes artificiais. Todos os picos da fração F1 causaram redução significativa do peso larval, especialmente a F1P1, que foi capaz de reduzir em 86,6% o peso larval, quando presente na concentração de 0,05% na semente artificial. F1/P1 apresenta três bandas majoritárias com massas moleculares de aproximadamente 100, 40 e 12 kDa. O pico F3P1 foi o mais tóxico dentre os picos provenientes de F3, causando uma redução de 66,1% do peso das larvas de *C. maculatus* na concentração de 0,05%. F3/P1

revelou-se com uma única banda de cerca de 13 kDa. A incorporação de farinha de cotilédone na dieta de *T. castaneum* causou um atraso significativo no desenvolvimento larval. As frações F1, F2 e F3 causaram a morte e atraso no desenvolvimento larval de *T. castaneum*, enquanto F4, F5 e F6 causaram a morte de todos os indivíduos após 10 dias, na concentração de 5% do total da alimentação. Foram detectadas atividades de inibição de proteases cisteínicas do tipo papaína, para isso uma unidade de atividade inibitória de papaína (UIP) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,05 na absorbância nas frações, obtivemos que F2 (2,64 UIP), F3(3,3 UIP), F4 (7,1 UIP) e F5 (7,76 UIP), e na fração cromatográfica F1/P1 (1,8 UIP). Não foram detectadas atividades inibitórias de proteases sérnicas em nenhuma das frações proteicas testadas.

**Palavras-chave:** proteínas de defesa, cromatografia, bioinseticida, *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*.

## **Abstract**

*Clitoria fairchildiana* is a native legume, often used in urban and rural afforestation and landscaping programs. In the literature, there are no reports on the predation of its seeds by insects. For this reason, we hypothesize that they contain an unexplored defensive arsenal with high insecticidal potential, and we intend to investigate the protein nature of such defenses. The experimental strategy was to fractionate the meal of cotyledons in groups of proteins according to their solubility; (F1), globulins (F2), kaffirins (F3), glutelins (F4), crosslinked kaffirins (F5) and crosslinked glutelins (F6) were obtained. All protein fractions were quantified and visualized by SDS-PAGE. To evaluate insecticidal potential, the insect models *Callosobruchus maculatus* and *Tribolium castaneum* were used. The protein fractions were incorporated into the diet of both insects at different concentrations (0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5%) for *Callosobruchus maculatus* and 5 % for *T. castaneum*, only for the latter the cotyledons meal was directly tested at the concentrations of 10%, 20% and 30%. The larvae fed on control and tests diets were counted and weighed. The most toxic fractions to *C. maculatus* (F1 - albumins and F3 -

kaffirins) were subjected to sub-fractionation of their proteins by size exclusion chromatography, from which the peaks F1P1, F1P2, F1P3 and F1P4 and F3P1, F3P2 and F3P3 were obtained. All chromatographic peaks were again tested against *C. maculatus* in artificial seed trials. All F1 peaks caused a significant reduction in larval weight, especially F1P1, which was able to reduce larval weight by 86.6% when present at 0.05% concentration in the seed. F1P1 presents three major bands with molecular weights of approximately 100, 40 and 12 kDa. The F3P1 peak was the most toxic among the peaks from F3, causing a 66.1% reduction in the weight of *C. maculatus* larvae, when present in the concentration of 0.05% in the artificial seed. F3/P1 was shown to have a single band of about 13 kDa. The incorporation of cotyledon flour into the *T. castaneum* diet caused a significant delay in larval development. The fractions F1, F2 and F3 caused death and delay in the larval development of *T. castaneum*, while F4, F5 and F6 caused the death of all individuals after 10 days. Inhibition activity of cysteine protease of papain type was detected in F2 (2.64 UIP), F3 (3.3 UIP), F4 (7.1 UIP) and F5 (7.76 UIP) fractions, and in the chromatographic fraction F1P1 (1.8 UIP). No inhibitory activities of serine proteases were detected in any of the protein fractions tested.

**Key words:** defensive proteins, chromatography, bioinsecticide, *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*

# 1 Introdução

## 1.1 Aspectos Gerais

Plantas e insetos estabeleceram relações co-evolutivas, ao longo de milhares de anos de convivência, o que provavelmente levou à diversificação de ambos (EHRlich & RAVEN, 1964). Como resultado destas relações passadas, as plantas desenvolveram sistemas de defesa contra a herbivoria, podendo essas defesas serem físicas ou químicas. No entanto, a domesticação de alguns cultivares, destinados ao consumo humano tem influenciado no desempenho da predação por herbívoros, a qual tem se mostrado mais eficiente em espécies cultivadas do que em nativas. Esse fato é demonstrado pela observação de que as plantas cultivadas, em geral, se tornam mais suscetíveis à herbivoria, o que gera um grande transtorno em termos de perdas na produção de cultivares de relevância agrônômica (TAMIRU *et al.*, 2015). Sementes de tais cultivares são atacadas por uma grande variedade de insetos herbívoros durante seu cultivo e armazenamento, o que causa graves perdas anuais, tanto na sua massa, quanto no seu potencial de germinação (BENREY *et al.*, 1998; WAR *et al.*, 2012).

A capacidade de um dado organismo de sobreviver a ataques de um determinado predador é chamada de resistência. E para que uma dada molécula seja associada à resistência é preciso que ela, além de ser tóxica a um dado agressor, esteja também presente no tecido vegetal em níveis suficientes para causar a morte ou reduzir, substancialmente, a predação por este organismo. Diversos estudos têm tido, como objetivo, identificar moléculas que sejam tóxicas para determinado predador e verificar se essa toxicidade associa-se à resistência de determinadas sementes e grãos a seus predadores específicos (GATEHOUSE, 1979; MORAES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004; GATEHOUSE *et al.*, 2008).

Por isso, surgiu e cresce, continuamente, o interesse em programas de melhoramento genético de cultivares de relevância comercial, programas estes que dependem fortemente da identificação e caracterização de moléculas com

potencial inseticida, que confirmam resistência e ainda sejam expressas em espécies vegetais não domesticadas.

## **1.2 Mecanismos de defesa de sementes contra insetos**

As plantas apresentam diferentes mecanismos de defesa; estes podem ser constitutivos, ou seja, estão sempre presentes e previstos na programação genética das espécies ou induzidos, produzidos em resposta ao ataque por herbivoria (WAR *et al.*, 2012). Ambas estratégias podem ser utilizadas de forma individual ou em conjunto, a depender da necessidade da planta. As plantas podem produzir diferentes sinais em resposta a herbivoria, como: fluxos de íons de cálcio, cascatas de fosforilação, sinalização sistêmica e do ácido jasmônico (FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013). Normalmente, em sementes, as defesas são sempre constitutivas. Essas defesas podem ser: físicas, tais como dureza, textura e espessura do tegumento, enfim propriedades facilmente perceptíveis pelos predadores; ou químicas, que podem ser efetivadas pela presença de compostos secundários e classes de proteínas (XAVIER FILHO, 1993). Estes compostos químicos do metabolismo secundário das plantas podem atrair predadores dos insetos, repelir ou intoxicar insetos herbívoros, já as proteínas de defesa costumam interferir na digestão destes insetos, causando sua morte por desnutrição (FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013).

### **1.2.1 Proteínas de sementes com ação inseticida**

Existem algumas famílias de proteínas tóxicas bem conhecidas, como as lectinas, as proteínas inativadoras dos ribossomos (RIPs do inglês *Ribosome Inactivating Proteins*), inibidores de proteases, inibidores de  $\alpha$ -amilases, vicilinas, arcelinas e quitinases (SALES *et al.*, 2000).

As lectinas são glicoproteínas que formam um grupo de proteínas capazes de se ligar de forma específica e reversível a diferentes carboidratos, sem alterar sua estrutura. As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, são proteínas multifuncionais e as mais estudadas são as da família das leguminosas, da tribo Diocleinae (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Lectinas de *Phaseolus vulgaris* foram vistas como capazes de se ligarem a açúcares presentes nas células epiteliais do intestino médio do inseto

*Callosobruchus maculatus*, impedindo, desta forma, a absorção de nutrientes e causando desnutrição nas larvas (GATEHOUSE *et al.*, 1984). A atividade inseticida desta classe de proteínas vegetais com habilidade de ligação a carboidratos tem sido reportada para diversas ordens de insetos, como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Homoptera (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As RIPs são N-glicosidases específicas para rRNAs, vistas como capazes de inativar a síntese proteica de células animais e que podem também atuar na defesa de plantas contra a herbivoria (SHARMA *et al.*, 2004).

Os inibidores de proteases estão presentes em sementes de leguminosas, têm função de armazenamento de aminoácidos e também de defesa, através de sua capacidade de inibir a ação catalítica de enzimas proteolíticas, o que leva a uma eficiente estratégia de defesa de plantas contra insetos, através de uma ação antinutricional (VERNEKAR *et al.*, 2001). Tal ação antinutricional decorre da redução do catabolismo de proteínas ingeridas na dieta do inseto, causada pela inibição da ação das enzimas proteolíticas do trato digestivo (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilases mostram grande potencial na defesa de plantas contra pragas. As enzimas do tipo amilases fazem a clivagem inicial do amido, quebrando-o em oligossacarídeos menores; para isso possuem uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e fazem a quebra das ligações glicosídicas através de grupos catalíticos específicos. Os inibidores destas enzimas, portanto, reduzem a capacidade dos organismos que os consomem de hidrolisarem o amido derivado dos alimentos ingeridos (IULEK *et al.*, 2000).

As vicilinas são proteínas da classe das globulinas 7S, têm função de armazenamento de aminoácidos em sementes e possuem altas massas moleculares (40 a 70 kDa por subunidade). Em leguminosas, são heterogêneas e constituídas de diferentes subunidades. Uma grande variedade de vicilinas extraídas de sementes de leguminosas tem mostrado potencial de interferência no desenvolvimento de insetos, como o besouro *C. maculatus*, pois estas se ligam fortemente, *in vivo*, à quitina (homopolímero de N-acetil-D-glucosamina,) detectada na matriz ou membrana peritrófica que reveste a superfície do

intestino médio deste e outros insetos (FIRMINO *et al.*, 1996; UCHÔA *et al.*, 2009; BARD *et al.*, 2014).

As arcelinas são proteínas de armazenamento de feijões selvagens, que a exemplo das vicilinas, têm função inseticida, principalmente contra insetos da ordem Coleoptera, família Bruchidae. Geralmente, são encontradas sob diversas isoformas variantes em uma mesma espécie, mas sua expressão é controlada por um único gene dominante (OSBORN *et al.*, 1986). Como exemplo disso, uma arcelina isolada de sementes de *Lablab purpureus* foi vista como tendo efeitos deletérios à sobrevivência de *C. maculatus*, causando impacto negativo na atividade da  $\alpha$ -amilase deste inseto. Essa natureza tóxica da arcelina pode ser transferida para outros cultivares de relevância agrônômica, como feijões do gênero *Vigna* que são fonte de alimento para esse inseto-pesto (JANARTHANAN & SURESH, 2010).

As quitinases catalisam a hidrólise de quitina, estão presentes de forma constitutiva e ou induzidas em plantas e conferem resistência de plantas a fitopatógenos que apresentam quitina como componente essencial de suas estruturas corpóreas, tais como a parede celular fúngica (ISELI *et al.*, 1996). LAWRENCE & NOVAK (2006) relataram a primeira quitinase vegetal (WIN6) que retarda o desenvolvimento de insetos. WIN6 foi obtida através de mudas de tomate infectadas com um vírus de batata recombinante X (PVX) e suas propriedades inseticidas foram testadas contra o besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*), considerado pragas de batata, tomate e outras culturas. Os resultados mostraram que apenas 47% dos insetos alimentados com esta proteína passaram para o segundo instar, enquanto que no controle 93% chegaram ao segundo instar.

### **1.3 Insetos pestes de relevância agrônômica**

Diversos trabalhos relatam interações inseto-planta, demonstradas principalmente pela alimentação, mostrando que as plantas servem de alimento para um grande número de insetos herbívoros (LAWTON, 1983; ASH, 1997; DEVI & DEVI, 2014). Com a domesticação de cultivares de relevância agrônômica, essa interação inseto-planta tornou-se um grave problema em termos de produção e perda de viabilidade das sementes (TAMIRU *et al.*, 2015). Inseticidas químicos tornaram-se a saída mais eficiente para combater

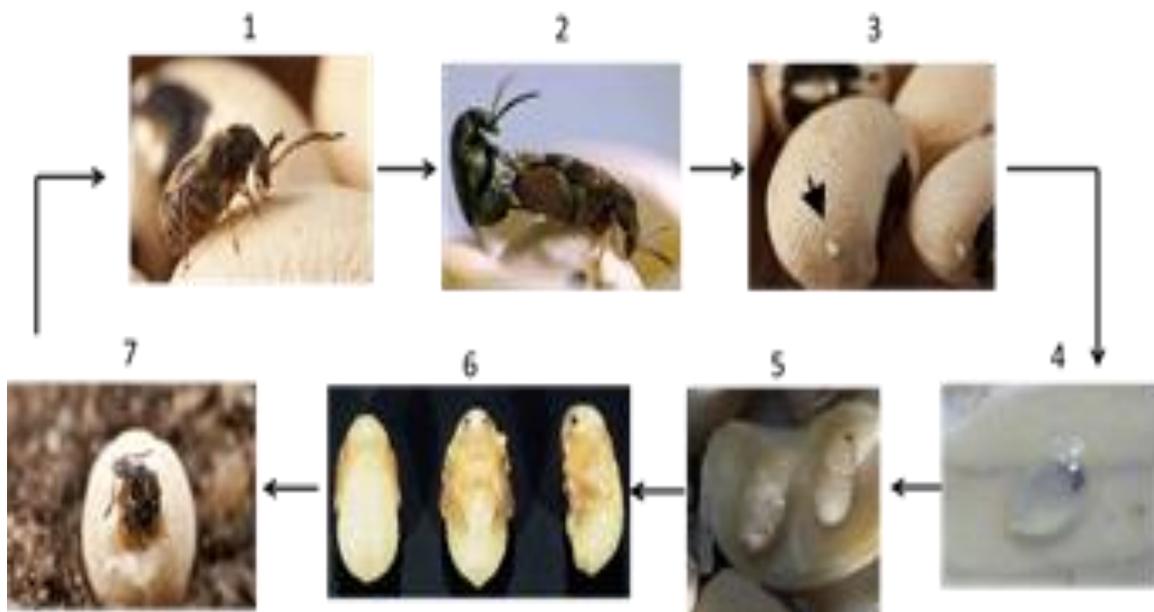
tais pragas, mas como decorrência natural do processo evolutivo, a resistência de insetos a inseticidas conhecidos tornou-se uma nova preocupação (GUEDES, 2016). Há diversos relatos de tais adaptações. No caso do gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*), que é uma praga de relevância agrônômica, CORDEIRO *et al.* (2016) mostraram que, ao longo de cinco gerações, fêmeas suscetíveis ao inseticida deltametrina passaram a apresentar uma preferência por machos mais pesados e maiores para o acasalamento. Foi sugerido que essa característica está associada ao processo de desenvolvimento de resistência ao inseticida, que após cinco gerações chega a ser 100 vezes maior. *Zabrotes subfasciatus*, o besouro predador do feijão comum (*P. vulgaris*), desenvolveu resistência a inseticidas normalmente utilizados no cultivo desse feijão, como é o caso do lindano (GOLOB & KILMINSTER, 1982). O besouro *Tribolium castaneum* se tornou resistente a fosfina, substância utilizada para o controle de sua proliferação em indústrias de cereais moídos (OPIT *et al.*, 2012).

Neste trabalho foram particularmente examinados, como insetos-modelo, as espécies a seguir descritas:

### **1.3.1 *Callosobruchus maculatus***

O besouro *C. maculatus*, conhecido popularmente como “caruncho”, pertence à família Chrysomelidae da ordem Coleoptera e é conhecido como a principal praga de grãos de leguminosas de interesse comercial, principalmente os feijões do gênero *Vigna*, durante seu armazenamento. O ciclo de vida deste besouro começa com a embriogênese, que dura 5 dias após a oviposição de fêmeas adultas, na casca das sementes; o fim deste estágio é marcado pelo início da escavação da larva para dentro da semente, consumindo seus cotilédones. Após esse ciclo, iniciam-se os 4 instares de vida da larva: o primeiro instar tem duração de 8 a 9 dias; o segundo instar dura de 3 a 4 dias; o terceiro instar também dura de 3 a 4 dias; e o quarto instar dura de 4 a 5 dias. Em seguida, começa a formação da pupa, que leva de 6 a 7 dias para machos e 5 a 6 dias para fêmeas. Por fim, a transformação em adultos leva de 9 a 12 dias para insetos machos e de 10 a 14 dias para fêmeas. Após esse tempo, os insetos adultos eclodem e assim, via de regra, inviabilizam o consumo e a

germinação destas sementes (DE SÁ *et al.*, 2014; DEVI & DEVI, 2014). O ciclo de vida desta espécie é mostrado na figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática do ciclo de vida do inseto *C. 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 (DE SÁ, 2013).

Dada à importância econômica dessa praga, vários estudos têm se dedicado a encontrar sementes resistentes ou compostos vegetais tóxicos para esse inseto. A avaliação da resistência de cultivares de feijão-de-corda ao besouro *C. maculatus* mostrou que alguns cultivares causaram alteração na oviposição, afetaram a sobrevivência larval, causaram diminuição do peso das larvas e também causaram a redução da atividade de proteases e de carboidrases digestivas do inseto (CRUZ *et al.*, 2016). A resistência de genótipos resistentes de origem nigeriana tem sido associada com formas variantes de vicilinas 7S, que são dificilmente digeridas pelas proteases intestinais do inseto, levando-o a uma condição de desnutrição e eventualmente sendo lesiva ao desenvolvimento do bruquídeo (MACEDO *et al.*, 1993; SALES *et al.*, 1992). Já para os cultivares Pajeu, Guariba, Tucumaque e Xiquexique BRS, CRUZ *et al.* (2016) sugeriram que seus

mecanismos de resistência atuam através da redução da capacidade digestiva das larvas de *C. maculatus*. Mais recentemente KUNZ *et al.* (2017) sugeriram que a internalização de vicilinas é feita por endocitose mediada por um receptor de membrana nos enterócitos do intestino médio de larvas de *C. maculatus*.

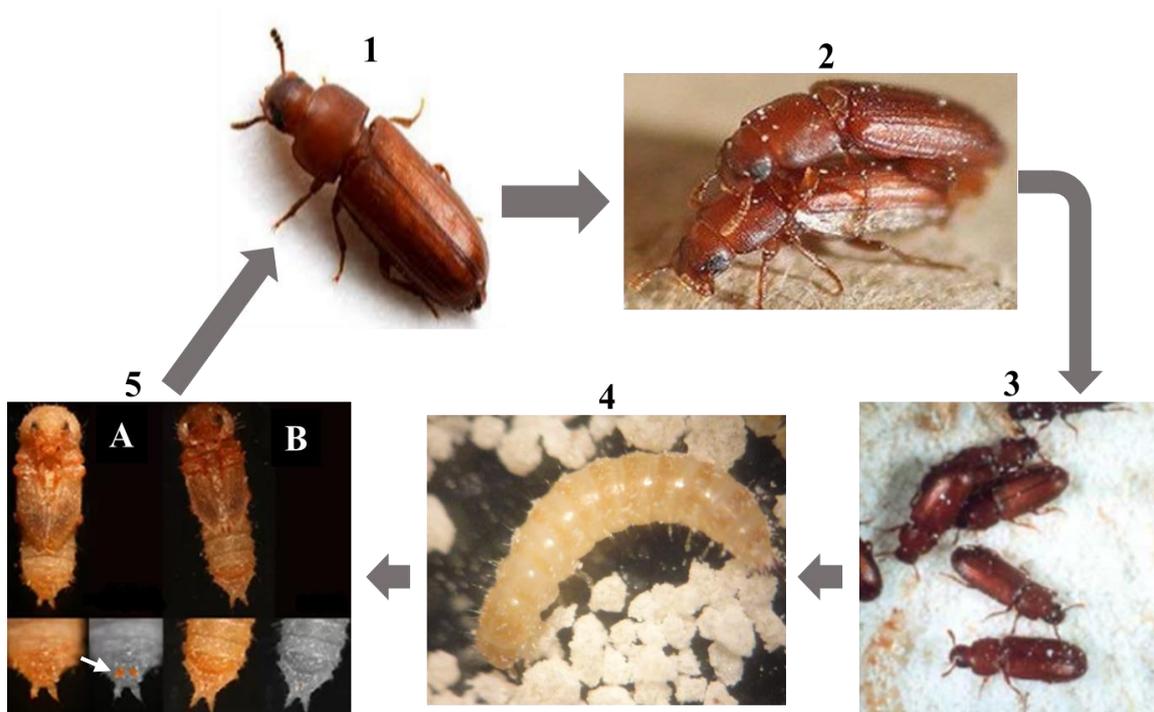
Outras espécies têm sido estudadas, com objetivo de se descobrirem novas moléculas tóxicas a *C. maculatus*. Estudos mostraram que o tegumento das sementes de *P. vulgaris* apresenta alguma forma de barreira química ao desenvolvimento pós-embrionário (larval) do besouro *C. maculatus*. Acredita-se que essa toxicidade seja causada pela redução da atividade das proteases digestivas deste inseto (DE SÁ *et al.*, 2014), mas a natureza química de tal toxicidade não foi identificada. Uma lectina (CrataBL), com potencial para controle do desenvolvimento larval de *C. maculatus*, foi também isolada da casca de sementes de *Crataeva tapia*. Os autores mostraram que esta lectina, a qual agiria como uma proteína multifuncional, foi capaz de reduzir a atividade proteolítica de proteases cisteínicas intestinais do inseto (NUNES *et al.*, 2015). Foi relatada também uma proteína de ligação à quitina na casca de sementes de *Albizia lebeck*, que se mostrou semelhante a uma protease cisteínica e com atividade tóxica para *C. maculatus*. Entende-se que esta toxicidade possa ser devida à sua ligação à quitina na superfície do intestino médio das larvas, atuando com ação antinutricional (SILVA *et al.*, 2016), visto que o gel peritrófico que reveste o intestino médio deste inseto, possui quitina em sua composição (Sales *et al.*, 2000).

### **1.3.2 *Tribolium castaneum***

O besouro *T. castaneum* pertence à família Tenebrionidae, da ordem Coleoptera. Larvas e adultos são conhecidos como pragas secundárias importantes no armazenamento de cereais moídos, tais como farelos e farinhas. Este se tornou um excelente modelo de inseto, para o qual diferentes ferramentas moleculares foram bem estabelecidas, visto que seu genoma está bem caracterizado (TRIBOLIUM GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2008). As fases de larva, pupa e adultos são facilmente observáveis. No entanto, os ovos são de difícil controle, por causa de seu tamanho muito

pequeno e de sua adesão aos grãos de farinhas e farelos, o que torna muito difícil sua identificação. Em moinhos de farinhas, o controle de infestação por esta praga é feito com fosfina, mas já se têm relatos de resistência adquirida pelo besouro *T. castaneum* a essa substância, o que torna necessário o estudo de novas formas de controle do mesmo (BROWN *et al.*, 2009; FABRES *et al.*, 2014; TABUNOKI *et al.*, 2016).

O ciclo de vida desta espécie é mostrado na figura 2.



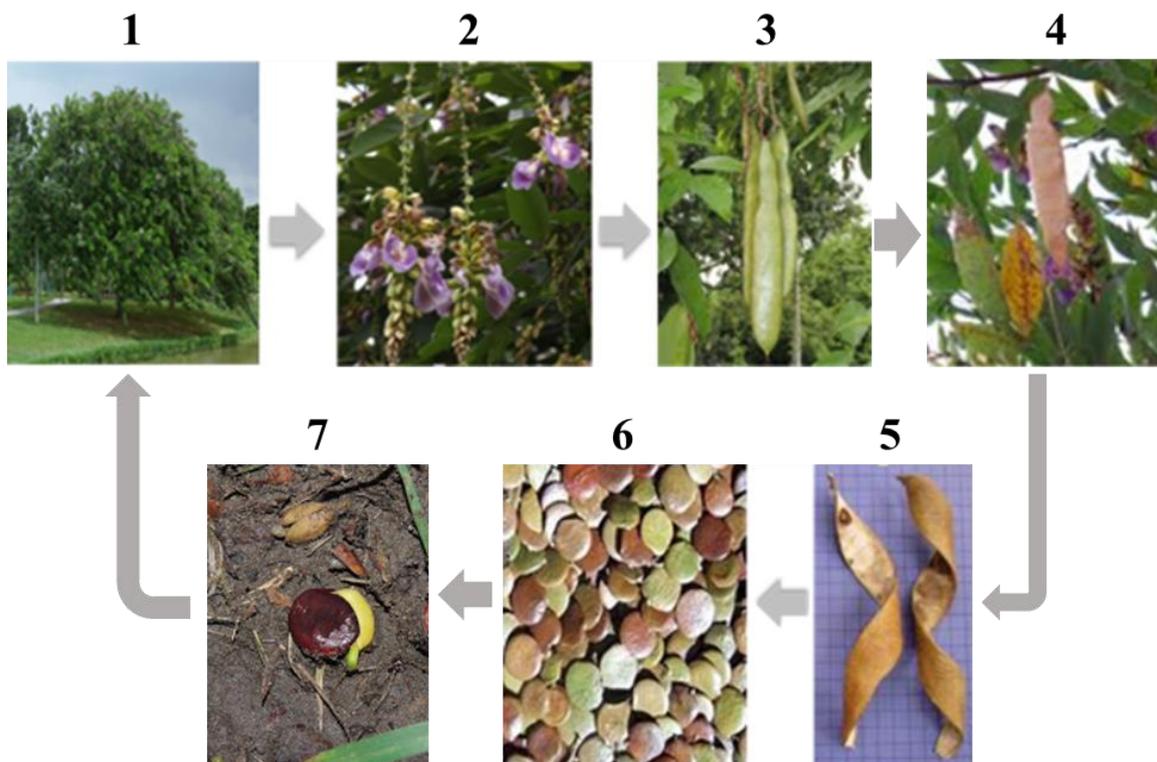
**Figura 2:** Representação esquemática do ciclo de vida do inseto *T. castaneum*. 1- Inseto adulto, 2- Acasalamento, 3- Postura dos ovos na farinha de trigo, 4- Larva formada, 5- Pupa fêmea (figura 5A), órgãos genitais destacados em laranja e indicados pela seta branca; pupa macho (figura 5B), não possui órgão genital pareado como a fêmea. Imagens 1, 2 e 3 disponíveis em: [https://www.google.com.br/search?q=tribolium+castaneum&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWjgzLT31ObYAhUCQ5AKHRzOAYcQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662](https://www.google.com.br/search?q=tribolium+castaneum&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWjgzLT31ObYAhUCQ5AKHRzOAYcQ_AUICigB&biw=1366&bih=662), acesso em: 20/01/2018 às 11:40 h. Imagem 4, autoria própria, durante o acompanhamento de um experimento. Imagem 5 disponível em: <https://science-explained.com/techniques/rna-interference-in-tribolium/>, acessada em: 20/01/2018 às 11:47 h.

Estudos têm sido feitos para identificar moléculas tóxicas ao besouro *T. castaneum*. Como exemplo, uma lectina isolada de *Artocarpus hirsuta* mostrou um efeito de retardo no desenvolvimento durante todo o ciclo de vida pós-embrionário deste inseto (larva, pupa e adulto), bem como um efeito deletério à fertilidade de fêmeas adultas. Acredita-se que a ligação da lectina a receptores de carboidratos, atrapalha o fornecimento de glicose para a formação de quitina (GURJAR *et al.*, 2010). Foi relatado também que a combinação de inibidor de protease cisteínica com inibidor de protease serínica foi mais eficaz para retardar o crescimento e desenvolvimento de larvas do besouro *T. castaneum*, do que dietas que tenham apenas um dos inibidores (OPPERT *et al.*, 1993).

#### **1.4 *Clitoria fairchildiana***

Nossa planta modelo é uma espécie não domesticada, da família Fabaceae – Papilionoidae, popularmente conhecida como faveira, sombreiro ou palheteira. Esta é nativa da região amazônica e muito utilizada em programas de arborização urbanos e rurais nas regiões Sudeste e Norte do Brasil (DUCKE, 1949; LORENZI, 1992).

Configura-se como uma espécie de porte arbóreo, de copa volumosa e produtora de flores atrovioláceas que se derivam em frutos deiscentes (DUCKE, 1949; LORENZI, 1992). Produz sementes orbiculares e plano-convexas, exalbuminosas, revestidas por tegumentos castanho-esverdeados; possui cotilédones livres como principais órgãos de reserva e o embrião é invaginado, sendo assim, a anatomia destas sementes segue o padrão da maioria das leguminosas (SILVA & MÔRO, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2014). A figura 3, abaixo, ilustra a descrição feita:



**Figura 3:** Representação esquemática de diferentes fases do ciclo de vida de *C. fairchildiana*. 1- Árvore adulta, 2- Flores, 3- Vagem verde, 4- Vagem seca, 5- Vagem seca e aberta dispersando as sementes, 6- Sementes dispersas e 7- Semente germinando.

Imagens disponíveis em: [https://www.google.com.br/search?q=Clitoria+fairchildiana&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjstqyN0bYAhULgpAKHfnaAPwQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662](https://www.google.com.br/search?q=Clitoria+fairchildiana&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjstqyN0bYAhULgpAKHfnaAPwQ_AUICigB&biw=1366&bih=662)  
 acesso em: 20/01/2018 às 11:34 h.

#### 1.4.1 Potencial biotecnológico das sementes do gênero *Clitoria*

Diversos trabalhos vêm mostrando a presença de algumas famílias de proteínas tóxicas em sementes de *Clitoria*. Foi relatada a existência de um inibidor de proteases (tripsina e quimotripsina) em sementes de *C. fairchildiana*, que exibe efeitos antinutricionais sobre as larvas de *Anagasta kuehniella*, *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* reduzindo em 76%, 59% e 49% respectivamente, a atividade das proteases intestinais, da classe tripsina, destes insetos (DANTZGER *et al.*, 2015). Foi relatada ainda a existência de uma proteína altamente básica de sementes de *C. ternatea*, designada "finotina". Esta mostrou um amplo e potente efeito inibitório para fungos

patogênicos de plantas (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* e *Colletotrichum gloeosporioides*), tem potencial para inibir o patógeno bacteriano *Xanthomonas axonopodis* e apresenta também potentes propriedades inibitórias contra os bruquídeos do feijão *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* (SEGENET *et al.*, 2004). Em um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa constatou a presença de um inibidor de tripsina de 13 kDa em sementes de *C. fairchildiana*, o qual foi capaz de reduzir em 87,93% a atividade de enzimas digestivas de larvas de 4º instar de *Aedes aegypti* (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Adicionalmente, há relatos na literatura onde se identificaram proteínas classicamente envolvidas com defesa vegetal em sementes do gênero *Clitoria*, mas cujos resultados não apresentaram dados de ação biológica destas proteínas sobre organismos predadores de plantas. LEITE *et al.* (2012), isolaram lectinas a partir de sementes de *C. fairchildiana*. Estas foram identificadas, em gel de eletroforese, como duas bandas com aproximadamente 100 e 116 kDa, capazes de aglutinar eritrócitos de coelho e ainda apresentavam atividade anti-inflamatória. Em um outro trabalho NAEEM *et al.* (2007), mostraram uma lectina de sementes de *C. ternatea*, capaz de aglutinar eritrócitos humanos e com especificidade de ligação a açúcares do grupo Gal/Gal NAc.

Além de proteínas com potencial inseticida, compostos do metabolismo secundário, tais como os rotenóides 11-desoxiclitoriactal e 6-desoxiclitoriactal, com atividade inseticida, também foram descritos em sementes de *C. fairchildiana* (MATHIAS, 1998).

Como reforço à nossa hipótese de que as sementes de espécies do gênero *Clitoria* possuem um vasto arsenal químico, com potencial inseticida ainda pouco estudado, foram depositadas duas patentes (US 20160174571 A1 e WO 2012113017 A1) de inseticidas produzidos com extrato de *Clitoria ternatea*, cuja composição é descrita como baseada em Compostos Secundários de Plantas (SPC do inglês Secondary Plant Compounds), que interferem com a oviposição e / ou impedem que insetos se alimentem de plantas tratadas com este extrato (MENSAH, 2012 e 2016).

Nosso interesse central na espécie *C. fairchildiana* é devido à ausência de estudos relatando pragas predadoras de suas sementes e também no fato de que não foi observado nenhum indício de predação das mesmas em indivíduos desta espécie, regularmente monitorados por pesquisadores de nosso grupo de pesquisa, ao longo de dois anos. As únicas pragas da espécie relatadas, na literatura, foram de insetos desfolhadores (*Euphalerus clitoriae*, *Urbanus acawoios* e *Hyperchiria incisa*) que atacam a copa destas árvores, podendo causar-lhes sérios danos (TREVISAN *et al.*, 2004; MAGISTRALI *et al.*, 2009; ZANUNCIO *et al.*, 2013).

Por este motivo, neste estudo levantamos a hipótese de que as sementes desta espécie apresentam um grande e ainda quase inexplorado arsenal químico de defesas, dentre estas, proteínas com potenciais praguicidas e pesticidas. Sendo assim, a identificação de proteínas relacionadas a tal capacidade defensiva destas sementes, poderia ser de grande valia tanto para programas de transformação de culturas de relevância agrônômica, como ao desenvolvimento de novas formulações de inseticidas.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral da presente pesquisa foi avaliar o potencial tóxico de proteínas de cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana* ao desenvolvimento e sobrevivência dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Extrair diferentes frações de proteínas dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*, separadas com base em suas propriedades de solubilidade em diferentes solventes;
- Testar o efeito da incorporação, na dieta dos insetos, de diferentes concentrações das frações de proteínas extraídas previamente, sobre o desenvolvimento dos insetos modelo.

- Analisar os parâmetros de oviposição, ganho de massa das larvas, duração dos estágios de vida e sobrevivência dos insetos submetidos às diferentes dietas;
- Caracterizar parcialmente proteínas eventualmente responsáveis pela toxicidade aos insetos.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Materiais Biológicos**

##### **3.1.1 *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard (Fabaceae)**

As sementes são dispersas apenas no mês de junho, foram coletadas nas cidades de Apiacá e Mimoso do Sul, no sul do estado do Espírito Santo. Em seguida, foram secas por 24 horas em uma estufa com temperatura controlada a 28 °C, para melhorar as condições de armazenamento e posteriores trabalhos.

##### **3.1.2 *Callosobruchus maculatus***

Os insetos utilizados no projeto foram obtidos a partir de uma colônia estabelecida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. Para criação e manutenção da colônia de insetos foram utilizadas sementes de *V. unguiculata* em potes de vidro a 28 °C e umidade relativa de 60 a 80%, dentro de uma incubadora do tipo BOD.

##### **3.1.3 *Tribolium castaneum***

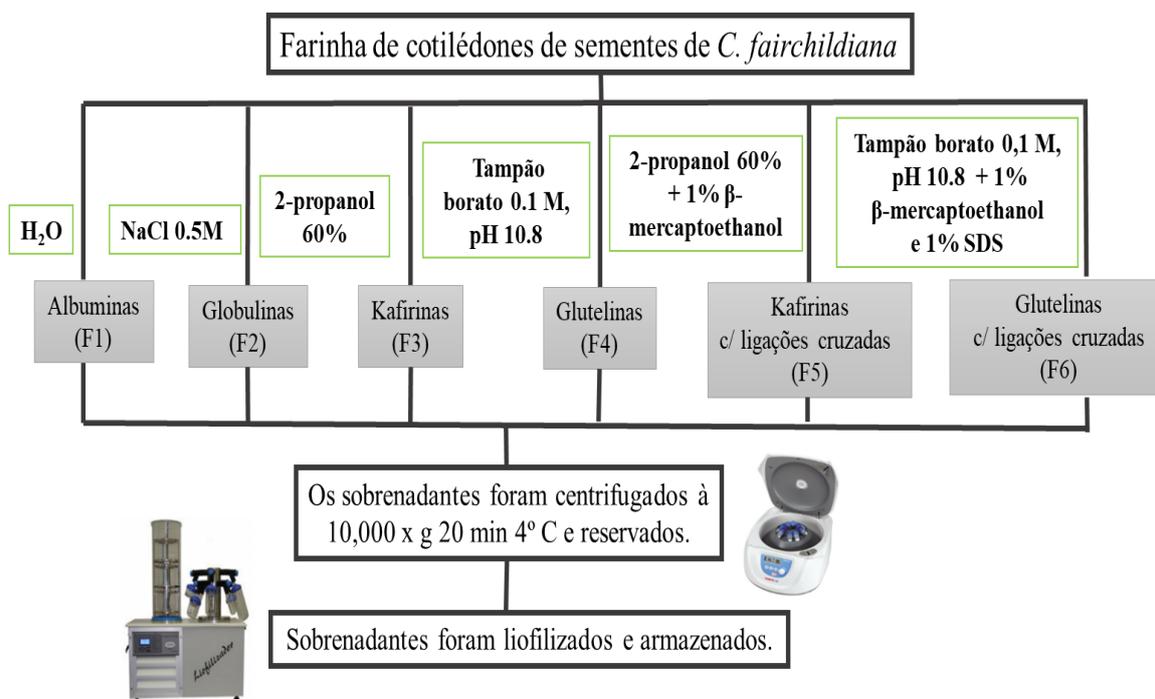
Os insetos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de uma colônia que foi mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. Farinha de trigo da marca Útil foi utilizada para alimentação destes insetos da colônia, que são mantidos em estufa BOD a 30 °C.

### 3.2 Extração de proteínas das sementes de *C. fairchildiana*

O fracionamento de proteínas foi realizado de acordo com o método citado e modificado por LUO *et al.* (2014).

Cotilédones de sementes quiescentes foram triturados até a obtenção de uma farinha fina, através do uso de um moedor de sementes do tipo moinho de facas SL – 30 SOLAB e subsequente peneiramento, através de peneira de malha de 48 mesh.

Vinte gramas de farinha de cotilédones foram extraídos sequencialmente com os seis solventes listados abaixo (200 mL de cada, à temperatura ambiente) e posteriormente centrifugados a 10.000 x g por 20 min a 4 °C, sendo o sobrenadante reservado após cada passo.



**Figura 4:** Representação esquemática da extração das seis classes de proteínas de acordo com sua solubilidade. Albuminas (F1) em água; Globulinas (F2) em NaCl 0,5M; Kafirinas (F3) em 2-propanol 60%; Glutelinas (F4) em tampão borato 0,1 M, ph 10.8; Kafirinas com ligações cruzadas (F5) em 2-propanol 60% + 1%  $\beta$ -mercaptoetanol e Glutelinas com ligações cruzadas (F6) em tampão borato 0,1 M, ph 10.8 + 1%  $\beta$ -mercaptoetanol + 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Inicialmente, a farinha foi ressuspensa em água destilada à temperatura ambiente (razão 1:10 m/v), sob agitação, durante 30 min. Repetimos essa etapa com o sedimento obtido e a fração solúvel final foi denominada **albuminas** (fração 1). O sedimento foi extraído sequencialmente com as

seguintes soluções: NaCl 0,5 M durante 60 min (a fração solúvel resultante são as **globulinas**; fração 2); 2-propanol a 60% (v / v) durante 4 h (a fração solúvel resultante foram as **kafirinas**; fração 3); tampão borato 0,1 M, pH 10,8, durante 4 h (a fração solúvel resultante foram as **glutelinas**; fração 4); 2-propanol a 60% com 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol durante 4 h (a fração solúvel resultante foram as **kafirinas com ligações cruzadas**; fração 5); e tampão borato 0,1 M, pH 10,8, contendo 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), durante 18 h (a fração solúvel resultante foram as **glutelinas com ligações cruzadas**; fração 6). Todas as frações reservadas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

### 3.3 Dosagem de proteínas

Foi feita a determinação da concentração de proteínas das amostras pelo método do ácido bicinconínico (BCA), descrito por SMITH *et al.* (1985), sendo utilizada albumina sérica bovina para a curva padrão. As leituras foram feitas no espectrofotômetro modelo Thermo Plate – TP Reader, a 540 nm.

Foi utilizado também o NanoDrop 2000 para dosagens de proteínas, de acordo com padrões estabelecidos pelo equipamento e a leitura foi feita a 280 nm.

### 3.4 Visualização das proteínas por SDS-PAGE

Todas as frações proteicas isoladas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), segundo o método descrito por LAEMMLI (1970). O gel final foi composto por um gel separador e um gel concentrador. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra (glicerol 12%, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, Tris-HCL 50 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 1%) e então aplicadas nas raias do gel. A corrida eletroforética foi realizada a, aproximadamente, 100 V. Após a corrida, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 e

então descorado com uma solução de metanol 40% e ácido acético 10%, antes de ser fotografado.

Todas as frações proteicas isoladas foram também submetidas à eletroforese em gel de tricina-SDS-poliacrilamida como descrito por SCHÄGGER & VON JAGOW (1987). Utilizamos uma concentração de acrilamida 16,5% T (T = concentração total de acrilamida e bis-acrilamida); 3% C (C = concentração do agente de *crosslinker* - bis-acrilamida - em relação à concentração total de T) para o gel fracionador e uma concentração de 4%T, 3%C para o gel concentrador. Trabalhamos com dois tampões de corrida, sendo um tampão catodo e o outro anodo. O tampão anodo foi colocado no polo negativo e o tampão catodo foi colocado no polo positivo da cuba. Após a corrida, o gel foi lavado com água por 15 min (2 vezes) e mantido em solução fixadora contendo metanol, ácido acético, água (40:10:50%) v/v por 30 min. Esta solução foi então descartada e adicionada uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25 % por 1 h sob leve agitação. O gel foi então descorado com solução de metanol 40% e ácido acético 10% (v/v) trocando esta solução a cada intervalo de 30 min, até se atingir a visualização das bandas proteicas.

A precipitação por nitrato de prata também foi utilizada em alguns momentos deste trabalho, seguindo-se a metodologia de DUNN *et al.* (2001). Nesse processo, os géis foram postos em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formol 37%) por 1 h. Após isso, foram lavados com solução de etanol 50% durante 20 min por duas vezes e em seguida, lavados com uma solução de etanol 30% durante 20 min. Subsequentemente, foram realizadas três lavagens com água destilada de 20 min, cada. Ao gel foi então adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg/100 mL) com mais 75 µL de formol, o que foi seguido por duas lavagens com água destilada por 20 s, cada. Em seguida, ao gel foi adicionada uma solução reveladora composta de carbonato de sódio (6 g/100 mL), formol (50 µL) e 400 µL de tiosulfato de sódio (1 mg / mL), até o aparecimento das bandas. Então, a solução fixadora foi adicionada novamente para parar a reação da solução com as bandas dos géis, e procedidas três novas lavagens com água destilada de 1 min, cada uma. O gel foi armazenado

com uma solução de glicerol 2% por um período de 1 h e então registrar a imagem.

### **3.5 Incorporação das frações proteicas em sementes artificiais**

Para avaliar o potencial bioinseticida das frações proteicas contra *C. maculatus*, estas foram incorporadas em sementes artificiais como descrito por DE SÁ *et al*, (2014). Cada semente tem 400 mg, contendo farinha de *V. unguiculata* cv. Fradinho (dieta preferencial de *C. maculatus*) e adições de concentrações crescentes das frações (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%). Primeiramente, uma mistura homogênea da farinha de cotilédones de *Vigna*, com as frações adicionadas nas diversas concentrações, foi introduzida em um molde cilíndrico e então prensada, com o auxílio de uma prensa manual. As sementes artificiais foram então retiradas do molde e expostas a fêmeas adultas de dois dias de idade e mantidas ali, por um período de 24 h, para permitir oviposição sobre as sementes. Após esse tempo, as sementes foram desinfestadas e o número total de ovos postos sobre a semente foi contado. O excesso de ovos foi removido com o auxílio de uma agulha fina, e um máximo de três ovos foi mantido em cada semente. Após 18 dias de incubação das sementes em câmaras BOD, sob controle de temperatura a 28 °C e umidade de 60-80 %, as sementes foram abertas para a contagem e pesagem das larvas sobreviventes. Foram comparados os dados obtidos a partir dos experimentos controle (sementes contendo apenas farinha de cotilédones de *V. unguiculata*) e testes (sementes artificiais com adição de frações proteicas misturadas em farinha à base de *V. unguiculata*) e estatisticamente analisados.

Outras baterias idênticas de ensaio foram realizadas, excetuando-se pelo fato de que foram utilizadas as frações cromatográficas na concentração de 0,05% por semente e foram feitas 5 sementes para cada fração.

### **3.6 Incorporação de farinha e frações proteicas na alimentação de *T. castaneum***

A fim de avaliar o potencial inseticida destas frações sobre o tenebrionídeo *T. castaneum*, um teste preliminar de incorporação da própria farinha de cotilédones das sementes de *C. fairchildiana* na alimentação do inseto foi realizado. Para isso, utilizamos 10 g de farinha de trigo em cada pote (dieta base do inseto), aos quais acrescentamos 10%, 20% e 30% de farinha de cotilédones de *C. fairchildiana* e colocamos 15 larvas pré-eclodidas de *T. castaneum*, em cada pote. Guardamos as misturas de farinhas contendo as larvas numa estufa BOD a 30° C. Após 15 dias, analisamos a sobrevivência das larvas e retornamos as sobreviventes para as mesmas condições de incubação previamente descritas, até completarem-se 30 dias. As larvas sobreviventes foram pesadas tanto após o primeiro intervalo de 15 dias, como após os 30 dias do experimento. Também foram testadas as frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana*, onde foram homogeneamente misturadas 3 g de farinha de trigo (dieta preferencial de *T. castaneum*) com adições de 5% de cada uma das frações. Em seguida, foram adicionadas cinco larvas recém eclodidas de *T. castaneum* na mistura preparada previamente. Essa mistura com as larvas foi armazenada em câmara BOD, sob controle de temperatura e umidade, e a cada cinco dias durante um período de 30 dias as larvas sobreviventes foram contadas (utilizando lupa estereoscópica) e pesadas. Os dados obtidos a partir dos experimentos controle (farinha de trigo pura) foram comparados com os testes (frações proteicas misturadas à farinha de trigo) e estatisticamente analisados (FABRES *et al.*, 2014).

### **3.7 Isolamento das proteínas tóxicas aos insetos**

As frações proteicas que mostraram maior toxicidade aos insetos passaram por posterior fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna de Sephadex G-50, na qual aplicamos 40mg de amostra / 1ml de tampão fosfato de sódio, para ambas as amostras F1 e F3 e utilizamos como eluente, tampão fosfato de sódio 100 mM, com NaCl 100 mM, pH 7,6. Foram coletados 700 µL por minuto e as frações coletadas foram lidas sob comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro Shimadzu

(DANTZGER *et al.*, 2015). Os picos resultantes foram dialisados e liofilizados. As frações proteicas separadas foram novamente incorporadas na alimentação dos insetos para avaliação de suas toxicidades como descrito no item 4.6. Todo o processo de fracionamento foi monitorado pela visualização proteica das diversas frações obtidas por SDS – PAGE.

### **3.8 Caracterização de frações proteicas tóxicas aos insetos**

#### **3.8.1 Ensaio de atividade inibitória de proteases cisteínicas**

A atividade inibitória de proteases cisteínicas foi determinada de acordo com o método descrito por MICHAUD *et al.* (1994). Inicialmente uma curva de atividade papainásica foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal da papaína comercial (Sigma), usada como referência enzimática controle, a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima pelos prováveis inibidores contidos nas amostras. As atividades inibitórias de papaína das frações proteicas obtidas foram medidas através do uso do substrato azocaseína, em pH 5,6 (indicado para proteases cisteínicas semelhantes à papaína). As reações foram realizadas incubando-se 80 µL de azocaseína 1% (dissolvida em tampão citrato-fosfato 100 mM com DTT 1,5 mM e 0,1% Triton X-100 pH 5,6), 11 µL de papaína comercial (solução estoque 1mg/5ml de tampão citrato-fosfato 100 mM com DTT 1,5 mM e 0,1% Triton X-100 pH 5,6), com 209 µL de tampão citrato-fosfato e com 100 µL da fonte de inibidores (frações proteicas, resuspensas em tampão citrato-fosfato), perfazendo um volume total de ensaio de 400 µL. Após a incubação a 37 °C em banho-maria por 1 h, a reação foi parada pela adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Logo em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 10600 x g. Após a centrifugação, 350 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e a este foram adicionados 350 µL de NaOH 1 M. As amostras finais foram avaliadas por leitura espectrofotométrica a 440 nm. Uma unidade de atividade inibitória de papaína (UIP) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,05 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com papaína e ausência de inibidor).

### **3.8.2 Ensaio de atividade inibitória de proteases serínicas**

As atividades inibitórias de proteases serínicas das frações proteicas obtidas foram medidas através do uso do substrato cromogênico DL- BApNA como descrito por (DEMARTINI *et al.*, 2007). Cerca de 100 µL da fonte de inibidores (frações proteicas) foram adicionadas a 200 µL de Tris/HCL (Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M e NaCl 0,15 M), pH 8,0, com 9 µL da tripsina comercial (solução estoque 1 mg/1ml de Tris/HCL) e foi incubado por 10 minutos à 37 °C, em seguida acrescentamos 25 µL de BApNA 5 mM (dissolvido em DMSO), e incubamos a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido acético 30% e a *p*-nitroanilida liberada foi lida a 405 nm. Uma curva padrão também foi inicialmente feita, usando-se tripsina como referência enzimática controle, a exemplo do já descrito para o ensaio anterior (4.8.1.).

Uma unidade de atividade inibitória de tripsina (UIT) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,05 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com tripsina e ausência de inibidor).

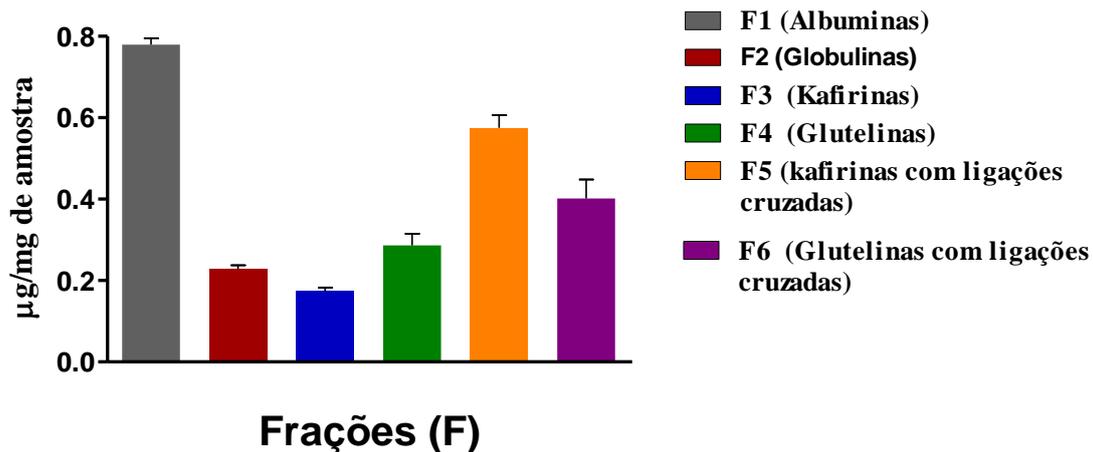
### **3.9 Métodos de análises estatísticas realizadas**

Os métodos de análise estatística utilizados foram o ANOVA (Tukey's Multiple Comparison) onde  $P < 0,0001$  e o Teste T de Student onde  $P < 0,05$ , ambos foram feitos utilizando o GraphPad Prism 5.

## **4 Resultados**

### **4.1 Extração e dosagem proteica das frações obtidas de cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana***

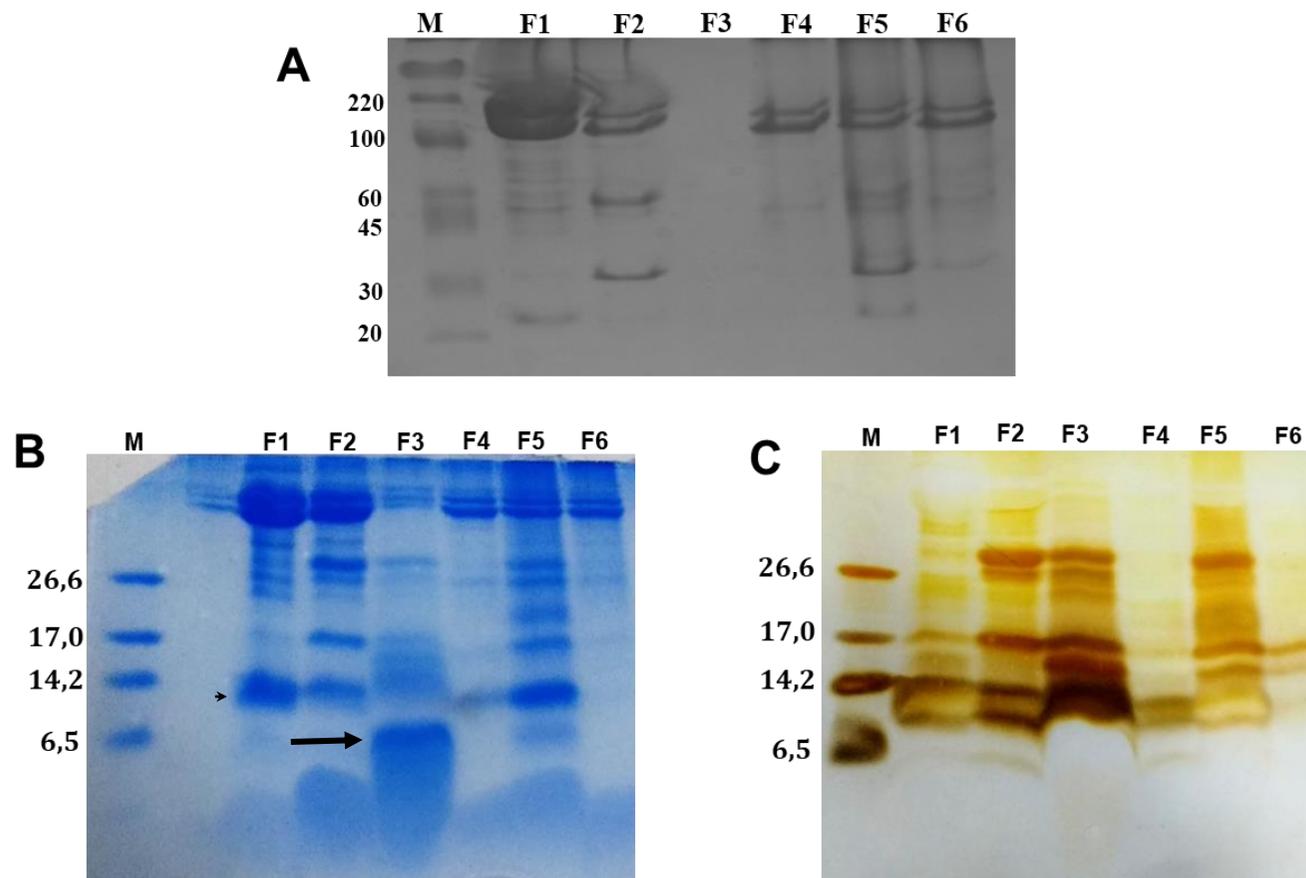
Foi feita a extração de seis frações de proteínas a partir de cotilédones de sementes de *C. fairchildiana*, denominadas F1 (albuminas), F2 (globulinas), F3 (kafirinas), F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas). Em seguida, foi feita a quantificação do conteúdo proteico das frações pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (figura 4). Nesta figura é possível constatar que os mais altos níveis de proteína, usando-se o método citado, foram detectados na fração albumínica (F1), seguida pela fração das kafirinas com ligações cruzadas (F5). Os mais baixos níveis foram detectados na fração das kafirinas (F3).



**Figura 5:** Visualização gráfica da quantificação de proteínas das diferentes frações pelo método de BCA, descrito por Smith (1985). (n=3).

#### 4.2 Visualização do perfil proteico das frações previamente extraídas por SDS-PAGE

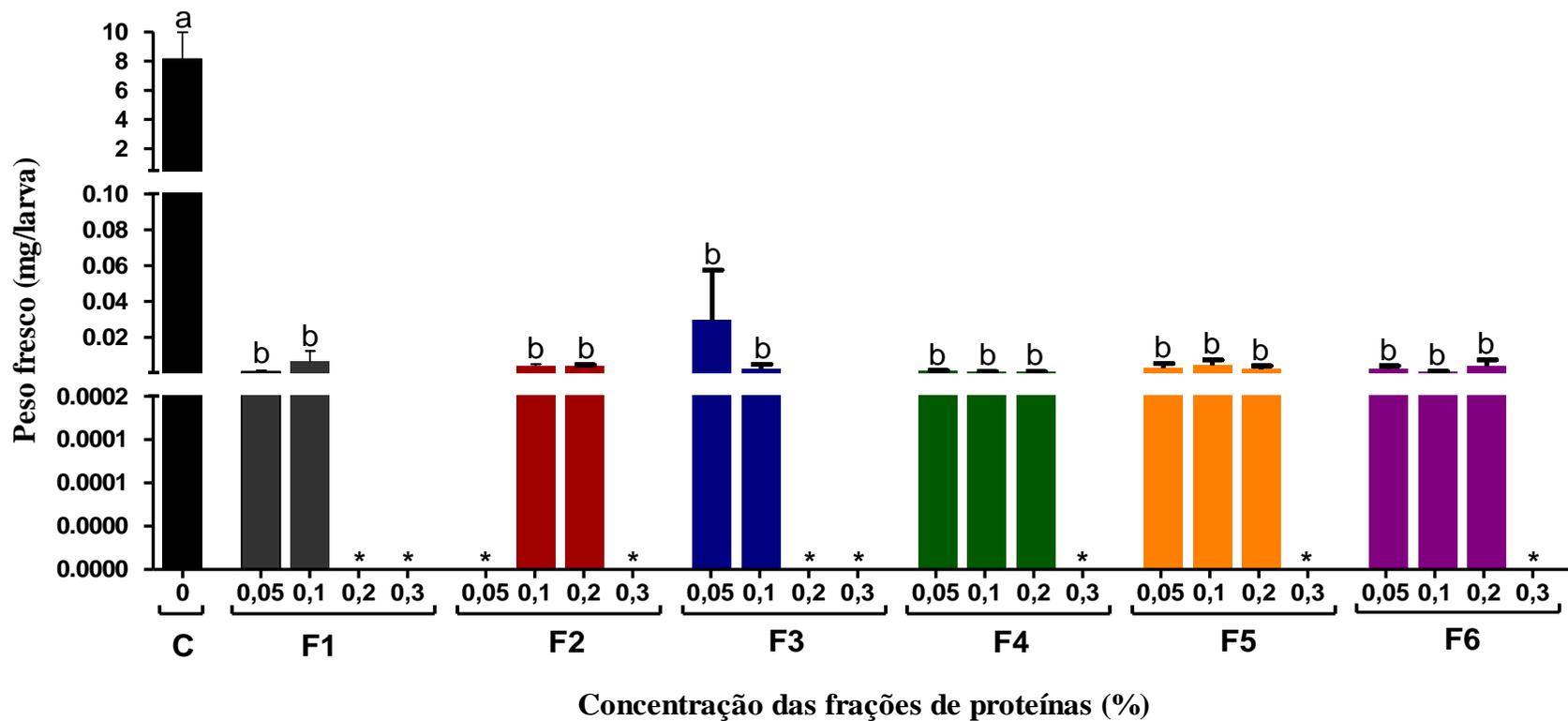
A figura 5A mostra o perfil eletroforético das proteínas presentes nas várias frações obtidas a partir da extração diferencial da farinha de cotilédones de *C. fairchildiana*, em gel de poliacrilamida 12%. Na imagem, podemos observar uma banda majoritária de aproximadamente 100 kDa presente em quase todas as frações e um perfil, de forma geral, relativamente distinto entre as frações. Também foi possível verificar que não apareceu nenhuma banda proteica na fração F3 (kafirinas), o que nos levou a investigar a possível presença de proteínas de massa molecular menor. Assim, visualizamos o perfil das proteínas de massa molecular menor em gel de tricina-SDS-PAGE, onde observamos diversas bandas proteicas em todas as frações, inclusive na fração F3 (figura 5B). Observamos também que algumas proteínas desta fração puderam ser melhor visualizadas utilizando-se a metodologia de precipitação por nitrato de prata (figura 5C). No entanto temos também uma banda com aproximadamente 6 kDa na fração F3, visualizada com a coloração por *Coomassie Brilliant Blue*, que não aparece na precipitação com prata (seta na Figura 5B). As frações F1, F2, F4 e F5, quando separadas neste gel Tricina-PAGE, revelaram a presença de uma banda proteica de cerca de 12 kDa, não observada por SDS-PAGE (cabeça de seta, na figura 5B).



**Figura 6:** Visualização eletroforética do perfil proteico das frações de cotilédones de *C. fairchildiana*. A – SDS-PAGE em gel a 12%; MM - marcadores de massa molecular de 20 a 220 kDa. B - Tricina-SDS-PAGE, e gel corado com Coomassie Brilliant Blue, revelaram a presença de uma banda proteica de cerca de 12 kDa (cabeça de seta >). C – Tricina – SDS –PAGE, e gel revelado com nitrato de prata. Em ambos painéis B e C, MM representam marcadores de massa molecular de a kDa.

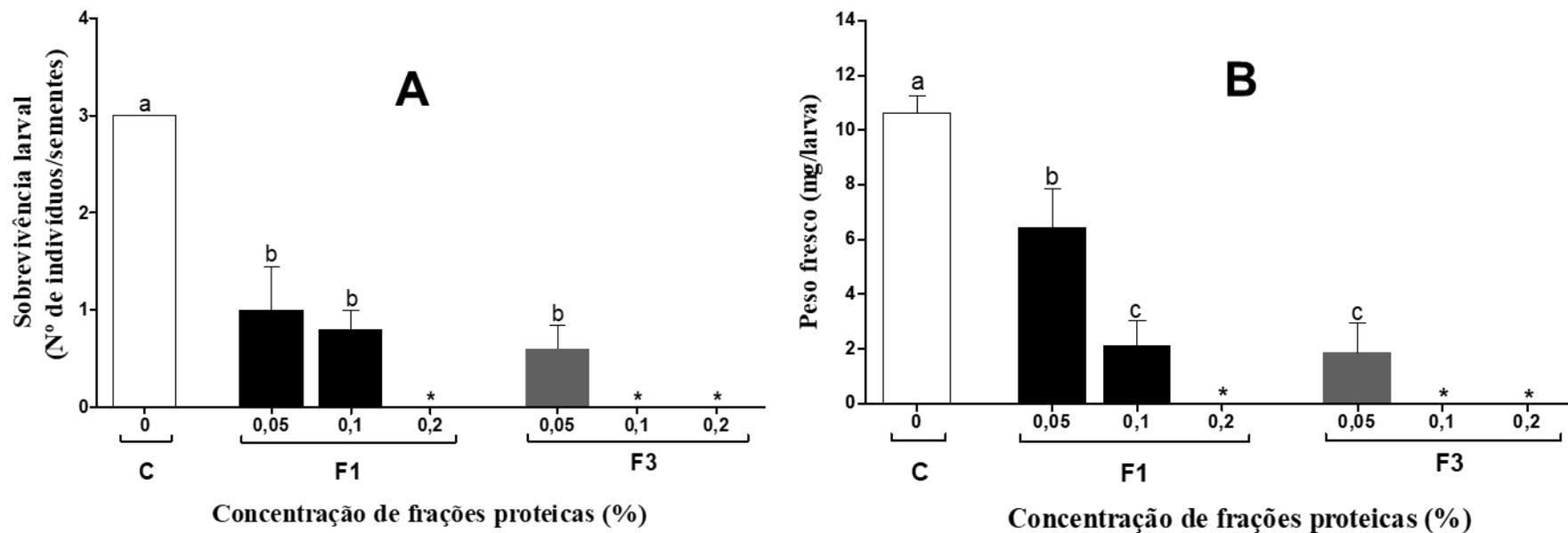
### **4.3 Efeito de diferentes concentrações das frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana* sobre o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus***

As frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana*, uma vez quantificadas e visualmente analisadas, foram submetidas a testes para avaliar a sua capacidade de interferir com o desenvolvimento do bruquídeo *C. maculatus*. Foram feitos experimentos de sementes artificiais, onde foi feita a incorporação de diferentes concentrações (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%) das frações proteicas, em 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. A partir dos resultados obtidos (figura 6), observamos que todas as frações de proteínas apresentaram efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento das larvas, visto que o peso das larvas diminuiu consideravelmente. Estes dados revelam um elevado potencial de controle do desenvolvimento de *C. maculatus* para proteínas presentes em cotilédones de *C. fairchildiana*. As frações F1 (albuminas) e F3 (kafirinas) mostraram os maiores níveis de toxicidade, visto que não houve sobreviventes acima da concentração de 0,1%. Estas frações, quando incorporadas ao nível da mais baixa concentração testada, de 0,05 %, levaram a reduções no peso larval de mais de 50%. Foram feitos dois ensaios separados, cada um com três sementes para cada fração.



**Figura 7:** Média do peso das larvas de *C. maculatus* alimentadas com as frações proteicas F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de cotilédones de *C. fairchildiana*, em sistema de sementes artificiais. C – controle. As letras a e b representam diferenças estatísticas significativas de acordo com o ANOVA (Tukey's Multiple Comparison) ( $P < 0.0001$ ) ( $n = 6 \times 3 = 18$ , onde seis é o número de sementes por concentração e três, o número de ovos em cada semente). \* não houve sobrevivente nesta concentração

A partir destes resultados prévios, selecionamos as frações F1 (albuminas) e F3 (Kafirinas) para avaliarmos melhor seus efeitos, em estudos subsequentes. Realizamos novos experimentos de sementes artificiais, onde incorporamos as menores concentrações usadas no experimento anterior, de 0,05%, 0,1% e 0,2%, em 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata*, sendo que nesta nova bateria de experimentos, foi feito um único ensaio onde aumentamos o número de sementes para cinco, para cada fração. Os resultados (figura 7) reforçaram a natureza altamente tóxica destas frações, em especial da F3, que quando incorporada em concentrações de 0,05% da massa da semente foi capaz de reduzir em cerca de 75% a massa larval dos insetos. Em concentrações de 0,1%, a fração F3 aboliu por completo o desenvolvimento larval.



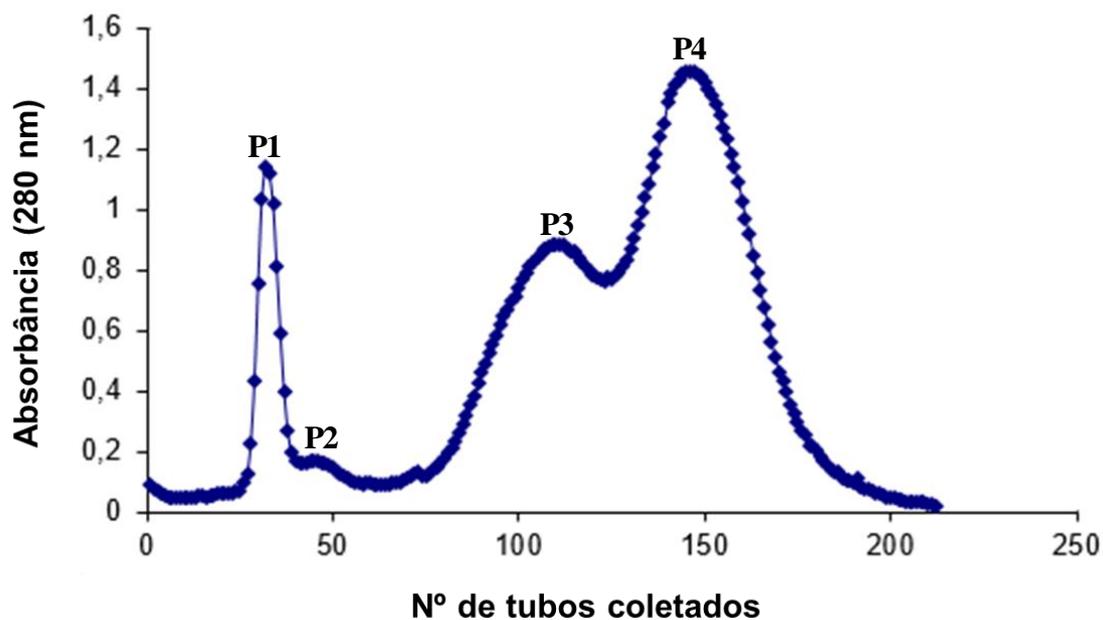
**Figura 8:** Sobrevivência (figura 6A) e média do peso (figura 6B) das larvas de *C. maculatus* alimentadas com as frações proteicas F1 e F3 de *C. fairchildiana*, em sistema de sementes artificiais. C – controle. As letras a, b e c representam diferenças estatísticas significativas de acordo com o ANOVA (Tukey's Multiple Comparison) ( $P < 0.0001$ ). ( $n = 5 \times 3 = 15$ , onde cinco é o número de sementes por concentração e três, o número de ovos em cada semente). \* não houve sobreviventes nesta concentração.

#### 4.4 Separação cromatográfica por exclusão molecular das proteínas tóxicas

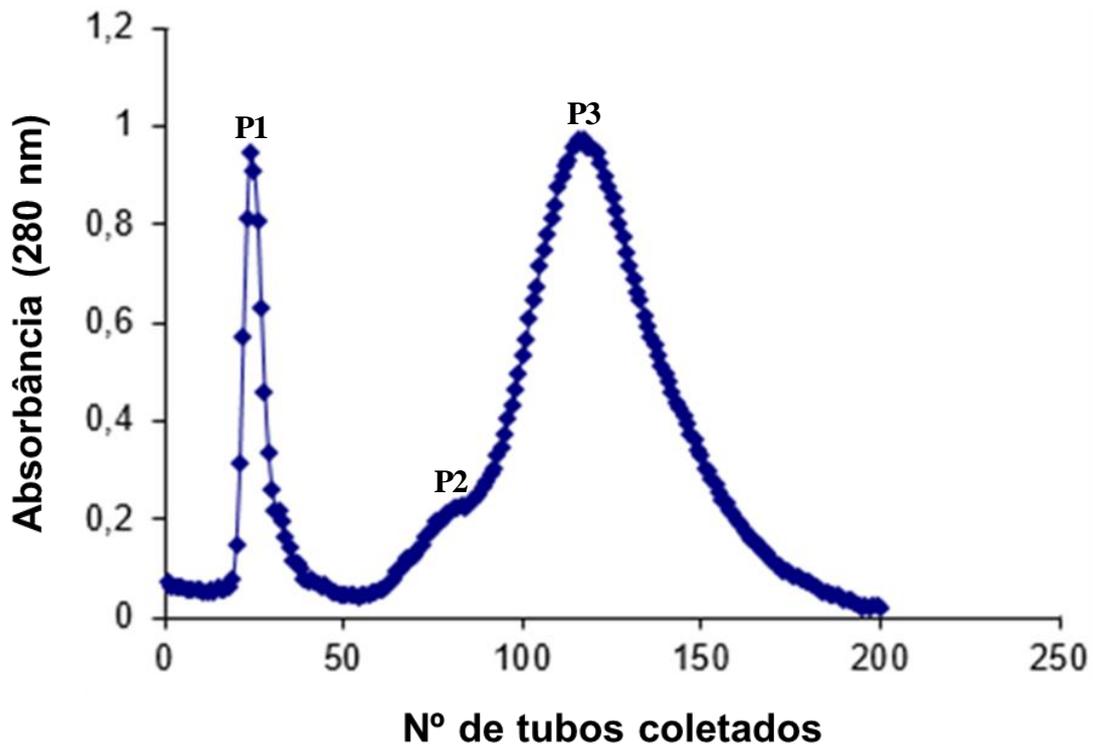
Uma vez identificadas as frações proteicas com maior toxicidade para *C. maculatus*, passamos para a fase de isolamento destas proteínas. Para isso, fracionamos as frações F1 (albuminas) e F3 (kafirinas) em cromatografia de exclusão molecular, numa coluna de Sephadex G-50, conforme mostram as Figuras 8 e 9, respectivamente.

Para a fração F1 (figura 8), obtivemos quatro picos que chamamos de P1, P2, P3 e P4.

Já para a fração F3 (figura 9), tivemos apenas três picos, que chamamos de P1, P2 e P3.



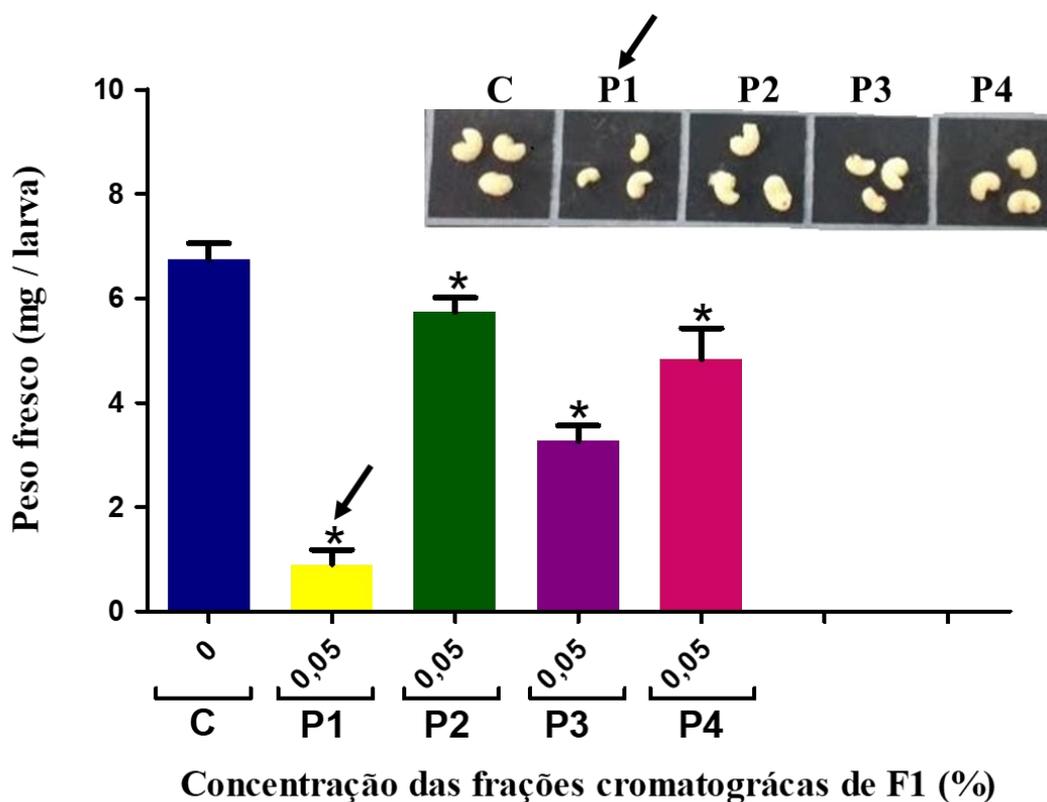
**Figura 9:** Cromatografia da fração 1 (albuminas) em coluna de exclusão molecular Sephadex G50 (eluente tampão fosfato de sódio 100 mM NaCl 100 mM, pH 7,6). Fluxo de 700  $\mu$ L por minuto. P1, P2, P3 e P4 são as frações coletadas, lidas em espectrofotômetro a 280 nm.



**Figura 10:** Cromatografia da fração 3 (albuminas) em coluna de exclusão molecular Sephadex G50 (eluente tampão fosfato de sódio 100 mM NaCl 100 mM, pH 7,6). Foram coletados 700  $\mu$ L por minuto. P1, P2 e P3 são as frações coletadas, lidas em espectrofotômetro a 280nm.

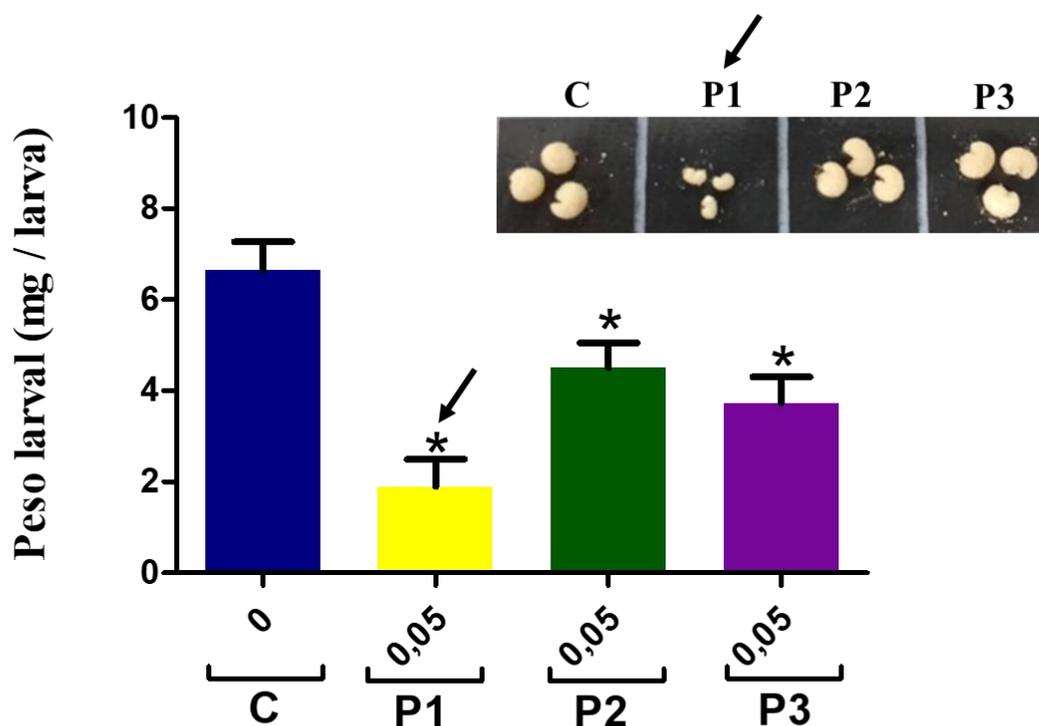
#### 4.5 Efeito de diferentes concentrações das frações cromatográficas sobre o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*

As frações cromatográficas foram incorporadas na alimentação dos insetos, por novos experimentos de sementes artificiais, na concentração de 0,05% em 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. Pode-se observar na figura 10 que todos os picos referentes à fração F1 mostram toxicidade às larvas de *C. maculatus*. No entanto, o pico P1 mostrou maior toxicidade, visto que o peso larval reduziu drasticamente (86,6%), como indicado pelas setas. Foram feitos dois ensaios separados, cada um com cinco sementes para cada fração.



**Figura 11:** Média do peso das larvas de *C. maculatus* alimentadas com os picos cromatográficos da fração proteica F1 de *C. fairchildiana*, em sistema de sementes artificiais. C – controle. \*representa diferenças estatísticas significativas de acordo com o Teste T de Student ( $P < 0.05$ ). ( $n = 10 \times 3 = 30$ , onde 10 é o número de sementes por concentração e três, o número de ovos em cada semente).

No caso da bateria de sementes artificiais feitas com os picos da fração F3, sob as mesmas condições descritas anteriormente para F1, observamos também toxicidade em todos os picos, e nesse caso também o pico P1 mostrou maior toxicidade (figura 11). O peso larval foi consideravelmente menor que os outros, como mostram as setas, tendo sido reduzido em cerca de 66,1 % em relação ao controle.

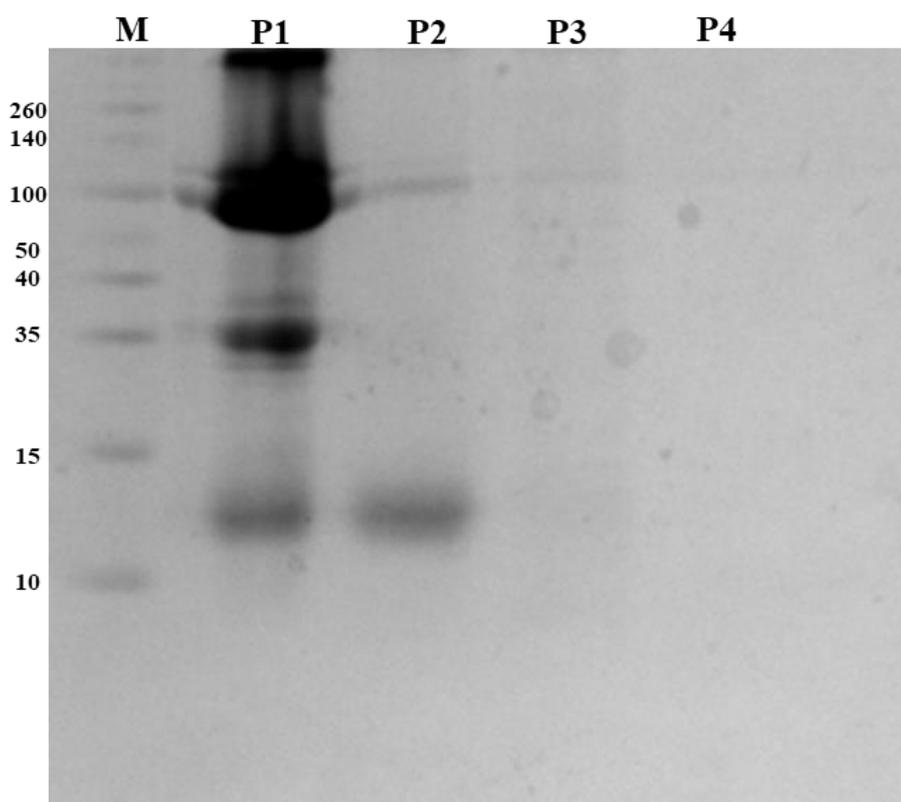


### Concentração das frações cromatográficas de F3 (%)

**Figura 12:** Média do peso das larvas de *C. maculatus* alimentadas com os picos da fração proteica F3 de *C. fairchildiana*, em sistema de sementes artificiais. C – controle. \*representa diferenças estatísticas significativas de acordo com o Teste T de Student ( $P < 0.05$ ). ( $n = 10 \times 3 = 30$ , onde 10 é o número de sementes por concentração e três, o número de ovos em cada semente).

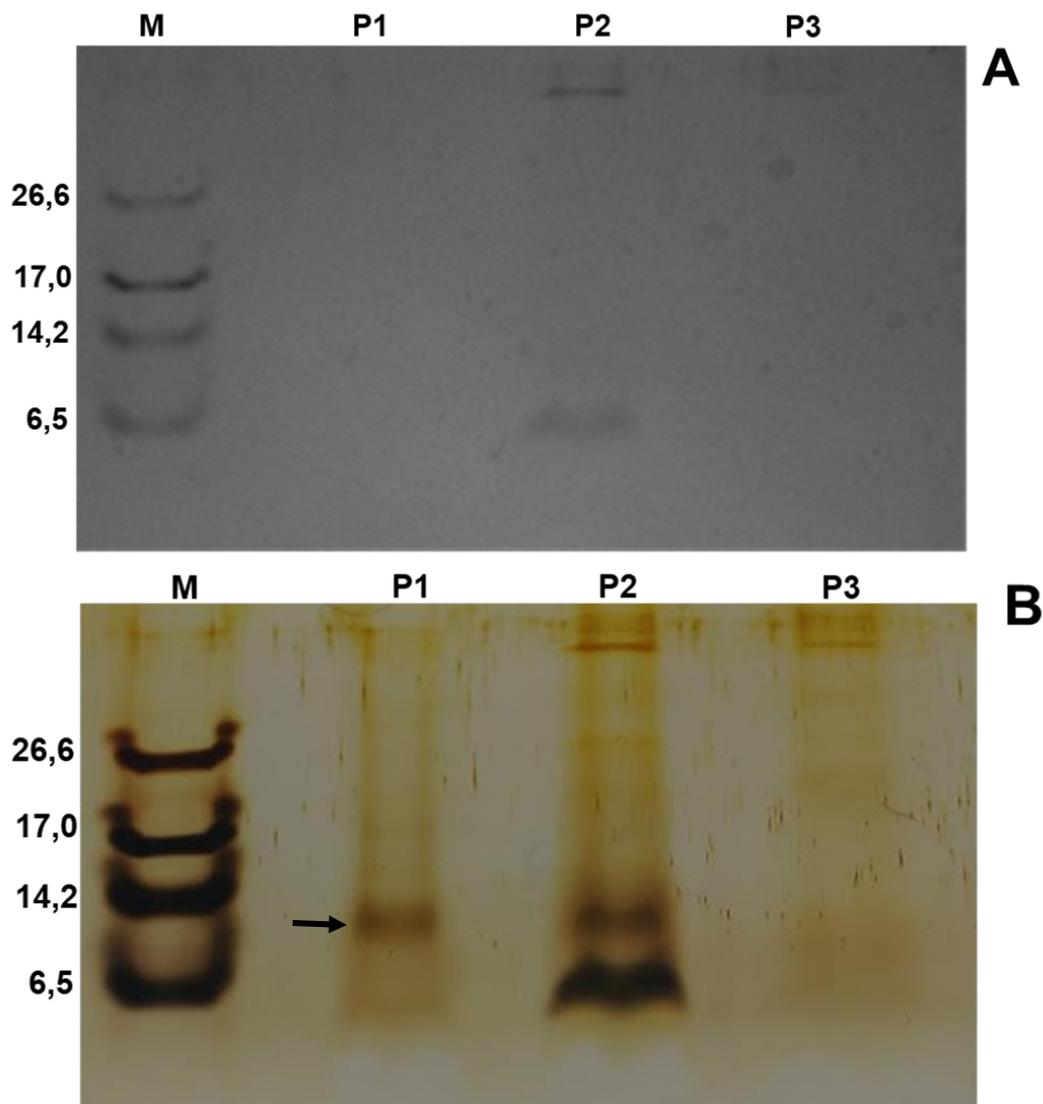
#### 4.6 Visualização eletroforética das frações cromatográficas

A figura 12 mostra o perfil proteico das frações cromatográficas provenientes da fração albumínica F1, obtida a partir de cotilédones de *C. fairchildiana*. Podemos observar que o P1 apresenta três bandas majoritárias bem definidas, de massas moleculares de aproximadamente 100, 35 e 12 kDa. Já em P2 observamos apenas duas bandas, uma mais fraca de massa molecular de aproximadamente 100 kDa, e uma mais intensa de cerca de 12 kDa. Em P3, há uma visualização bem fraca de algumas bandas proteicas e em P4 não apareceu nenhuma banda no gel SDS-PAGE.



**Figura 13:** Visualização eletroforética do perfil proteico dos picos da fração F1 de cotilédones de *C. fairchildiana*. SDS-PAGE em gel a 15%; M - marcadores de massa molecular de 260 a 10 kDa; Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

Já a figura 13 mostra o perfil proteico dos picos da fração F3, visualizados por SDS-PAGE (painel A) e Tricina-SDS-PAGE (painel B). Fica claro que na figura 13A não aparecem bandas nos picos P1 e P3, o que pode ocorrer por falta de afinidade da proteína ao corante *Coomassie Brilliant Blue*. Por isso, recorreremos à coloração com nitrato de prata. Na figura 13B, é possível observar novas bandas em todos os picos, sendo que P1 apresenta uma única banda em torno de 13 kDa (seta).

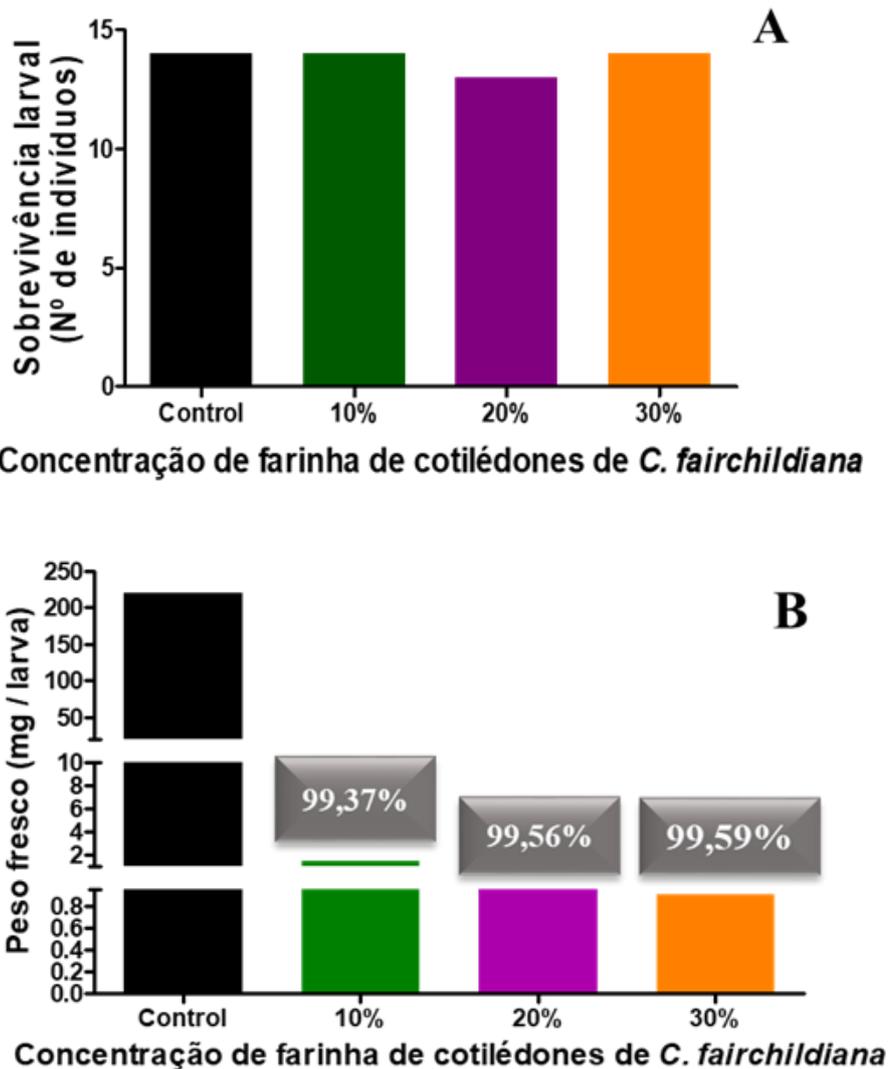


**Figura 14:** Visualização eletroforética do perfil proteico dos picos da fração F3 de cotilédones de *C. fairchildiana*. A e B – Tricina-SDS-PAGE em gel a 15%; M - marcadores de massa molecular de 26,6 a 6,5 kDa. A - gel corado com Coomassie Brilliant Blue. B - gel revelado com nitrato de prata, P1 apresenta uma única banda em torno de 13 kDa (seta preta).

#### **4.7 Efeito de diferentes concentrações da farinha e das frações proteicas de cotilédones de *Clitoria fairchildiana* sobre o desenvolvimento de *Tribolium castaneum***

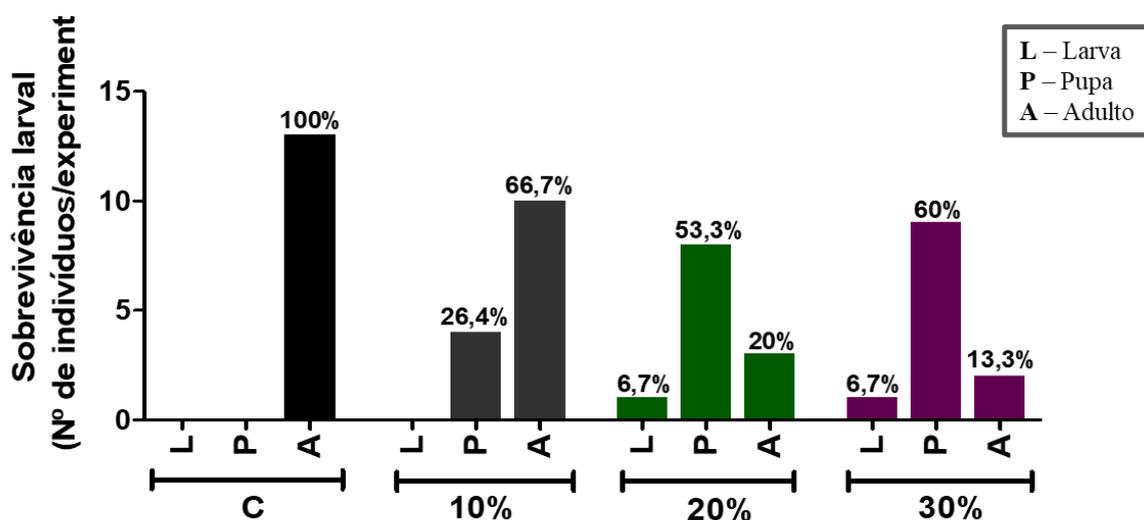
A farinha e as frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana* foram também submetidas a testes de sua capacidade de interferir com o desenvolvimento do inseto *T. castaneum*. A figura 14A mostra os resultados do experimento piloto, onde testamos diretamente os efeitos da farinha de

cotilédones de sementes de *C. fairchildiana* sobre a sobrevivência e o desenvolvimento larval do inseto. Após 15 dias, foi possível constatar a sobrevivência de praticamente todas as larvas, em todas as concentrações (10%, 20% e 30%) de farinha adicionadas. No entanto, o peso larval havia diminuído em relação ao controle feito exclusivamente com farinha de trigo; no teste com 10% de incorporação, houve redução de 99,37% do peso larval, com 20%, a redução foi de 99,56% e com 30%, foi 99,59% (figura 14 B).



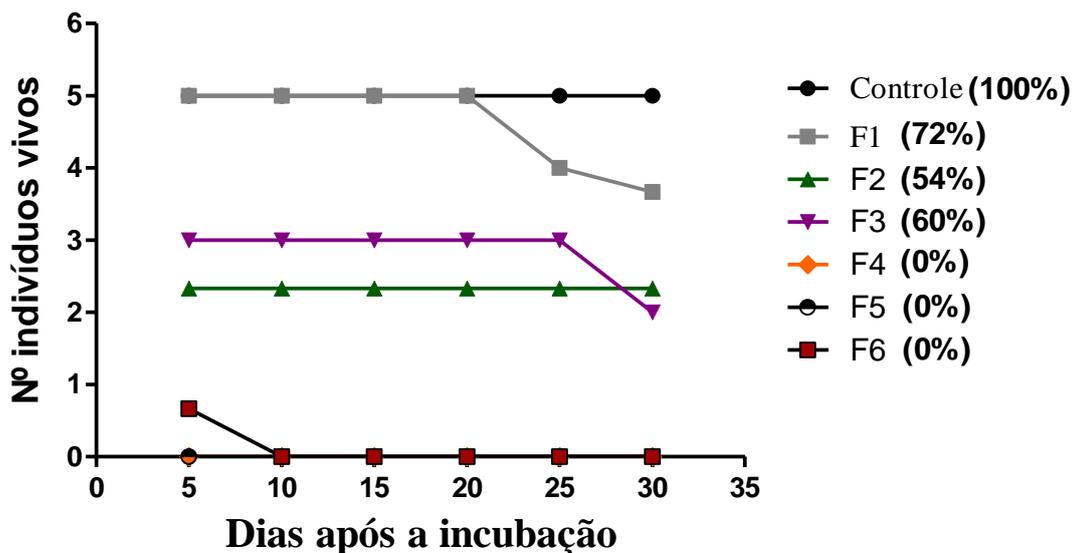
**Figura 15:** Sobrevivência (A) e peso de larvas (B) de *T. castaneum*, após 15 dias de consumo de farinha de cotilédones de *C. fairchildiana*. (n = 5 x 3 = 15, onde 5 é o número de indivíduos por ensaio e 3 é o número de ensaios).

Após a nova análise das larvas sobreviventes, em 30 dias de experimento, observamos que no controle tínhamos 100% de adultos, enquanto que nos testes, com farinha de cotilédones de *C. fairchildiana*, ainda existiam insetos em estágios de larvas e pupas (Figura 15). No teste com 10% de incorporação da amostra, havia 26,4% de pupas e 66,7 % de adultos; com 20%, tínhamos 6,7% de larvas, 53,3% de pupas e 20% de adulto, e com 30%, observamos 6,7% de larvas, 60 % de pupas e 13,3 % de adultos.



**Figura 16:** Efeito da incorporação da farinha de cotilédones de *C. fairchildiana* sobre a sobrevivência de *T. castaneum*. (n = 5 x 3 = 15, onde 5 é o número de indivíduos por ensaio e 3 é o número de ensaios).

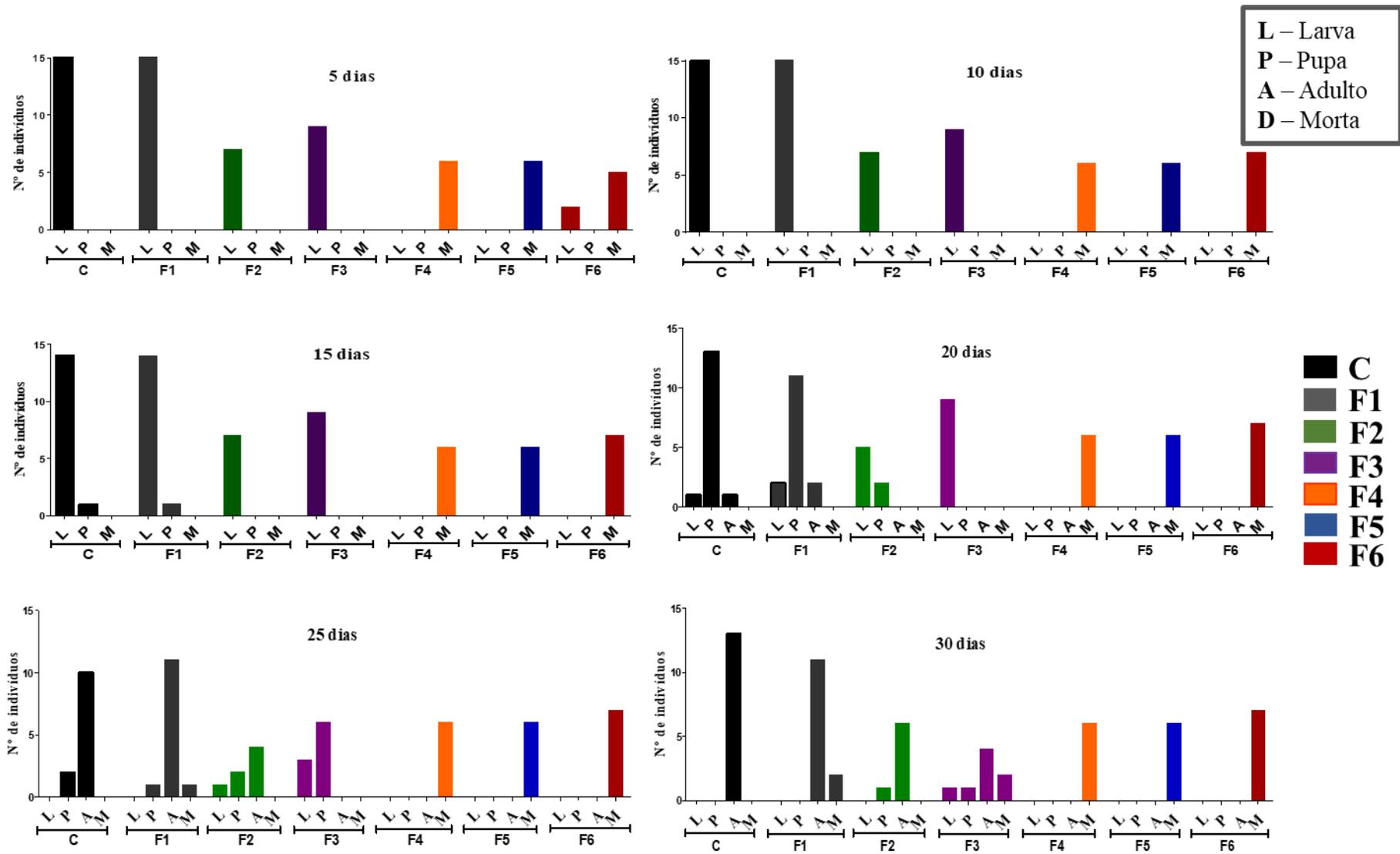
Quando analisamos os efeitos das frações proteicas, previamente obtidas, sobre o desenvolvimento de *T. castaneum*, observamos que todas as frações mostraram toxicidade sobre as larvas, visto que o número de larvas vivas caiu (F1 = 28%, F2 = 54%, F3 = 60 %, F4 = 0%, F5 = 0% e F6 = 0%) e observamos também que as frações F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas) mostraram os maiores efeitos deletérios no desenvolvimento larval, visto que não houve nenhum sobrevivente já a partir de 10 dias de exposição a essas frações na dieta (figura 16).



**Figura 17:** Efeito da incorporação das frações proteicas de sementes de *C. fairchildiana* na sobrevivência de *T. castaneum*. (n = 5 x 3 = 15 onde cinco é o número de indivíduos por ensaio e três é o número de placas para cada fração).

Foram analisados ainda os estágios de vida dos insetos em cada experimento em relação ao controle, por 30 dias, num monitoramento intercalado a cada cinco dias. Observamos que as frações F1 (albuminas), F2 (globulinas) e F3 (kafirinas) são tóxicas e causaram um retardo no desenvolvimento das larvas que sobreviveram durante os 30 dias. Já as frações F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas) mostraram os maiores efeitos deletérios no desenvolvimento larval, visto que não houve nenhum sobrevivente a partir do décimo dia. Como podemos observar na figura 17, as frações F2, F3, F4, F5 e F6 mostraram ser tóxicas já nos primeiros cinco dias de experimento, sendo que F2 e F3 reduziram o número de larvas em 46,7% e 60%, respectivamente, enquanto que F4 e F5 foram letais e F6 manteve apenas 13,3% de sobrevivência neste período. Com 10 dias, observamos que F2 e F3 mantiveram-se iguais e que F6 tornou-se letal. Em 15 dias começamos a ver uma pequena toxicidade de F1, pois observamos um indivíduo morto neste estágio, enquanto F2 e F3 mantiveram-se iguais. Em 20 e 25 dias começamos a observar um retardo no desenvolvimento das larvas alimentadas com F1, F2 e F3, quando comparadas ao controle. Já com 30 dias, o controle apresentou

100% de indivíduos adultos, ao passo que F1 apresentou 13,3% de morte, F2 ainda tinha 1 pupa, F3 tinha larvas e pupa e F4, F5 e F6 não apresentaram sobreviventes desde o décimo dia.

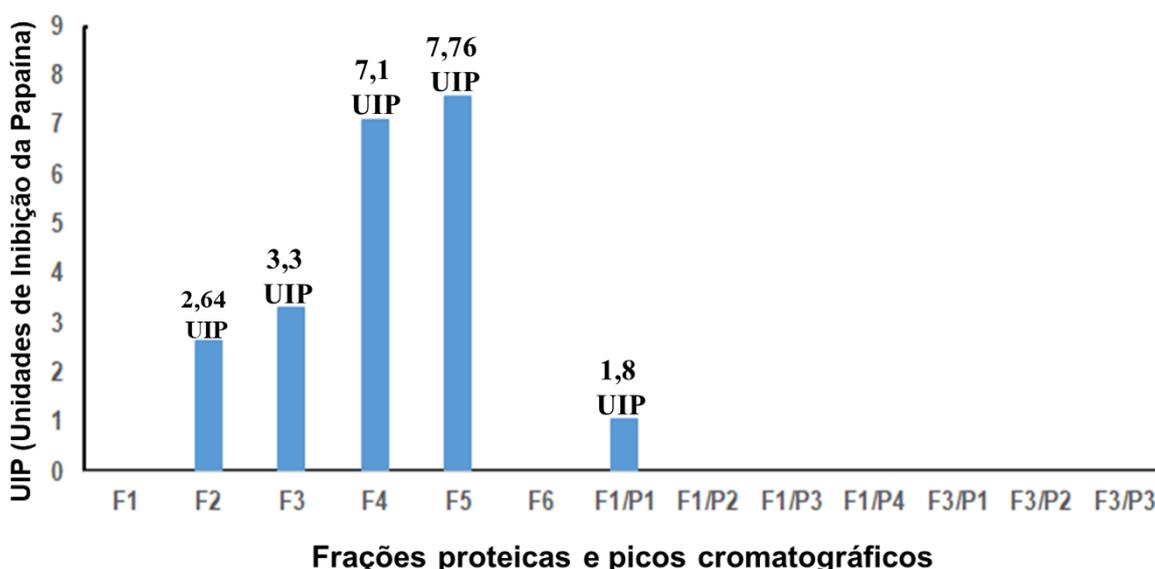


**Figura 18:** Efeito da incorporação das frações proteicas de sementes de *C. fairchildiana* nos estágios de vida de *T. castaneum*. (n = 5 x 3 = 15 onde cinco é o número de indivíduos por placa e três é o número de placas para cada fração).

## 4.8 Determinação de atividade inibitória de papaína e tripsina nas frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana*

### 4.8.1 Inibidores de papaína

Uma curva padrão foi feita usando-se papaína como referência enzimática controle. A partir desta curva, escolhemos a concentração de 2,2 µg de papaína para uso nos ensaios de detecção de inibidores nas amostras. A figura 18 mostra o resultado do ensaio de atividade de inibição da papaína nas diferentes frações proteicas (F1, F2, F3, F4, F5, F6), bem como nas diferentes frações cromatográficas obtidas (F1/P1, F1/P2, F1/P3, F1/P4, F3/P1, F3/P2 e F3/P3). As frações proteicas que apresentaram inibição de proteases cisteínicas do tipo papaínica foram F2 (2,64 UIP), F3(3,3 UIP), F4 (7,1 UIP) e F5 (7,76 UIP). Já nas frações cromatográficas somente a fração F1/P1 (1,8 UIP) mostrou atividade inibitória.



**Figura 19:** Ensaio de atividade de inibição da papaína. O eixo X representa as frações proteicas e o eixo Y representa os valores de UIP (Unidades de Inibição da Papaína). Uma UIP foi arbitrariamente definida como a concentração de inibidor capaz de reduzir em 0,05 a leitura de absorbância da papaína controle (2,2 µg).

#### 4.8.2 Inibidores de tripsina

Uma curva padrão foi feita usando-se tripsina como referência enzimática controle. A partir desta curva, escolhemos a concentração de 2,3 µg de tripsina para uso nos ensaios de detecção de inibidores nas amostras. Como resultado do ensaio de atividade de inibição da tripsina nas diferentes frações proteicas obtidas de cotilédones de *C. fairchildiana* (F1, F2, F3, F4, F5 e F6), não obtivemos nenhuma inibição nas condições deste ensaio.

## 5 Discussão

Como resultado de relações co-evolutivas, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra a herbivoria, mas a domesticação de cultivares de relevância agrônômica vem causando a perda desse potencial genético de defesa, o que gera grandes prejuízos anuais na agricultura, tanto no ataque de pestes e pragas no campo, como durante o armazenamento de sementes e cereais moídos (TAMIRU *et al.*, 2015). A forma de combate mais eficiente a estes predadores ainda se faz pelo uso de inseticidas químicos. No entanto, como decorrência natural do processo evolutivo, a resistência dos organismos a essas formulações químicas, e de interesse mais particular a esse trabalho, de insetos a inseticidas, tornou-se uma nova preocupação (GUEDES, 2016).

Como alternativa a esta estratégia, propõem-se programas de melhoramento genético de cultivares de relevância comercial, programas estes que dependem fortemente da identificação e caracterização de moléculas com potencial inseticida, que confirmam resistência e ainda sejam expressas em espécies vegetais não domesticadas (WAR *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, algumas famílias de proteínas tóxicas de plantas se tornaram bem conhecidas, como as lectinas, as proteínas inativadoras dos ribossomos (RIPs), inibidores de proteases, inibidores de  $\alpha$ -amilases, vicilinas, arcelinas e quitinases (SALES *et al.*, 2000). Suas ações e mecanismos de ação tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Algumas destas proteínas têm seu mecanismo de ação bem explorado, como é o caso das lectinas, em que a atividade inseticida desta classe de proteínas vegetais, reportada para diversas ordens de insetos, como

Coleoptera, Tenebrionidae, Diptera, Lepidoptera e Homoptera, está relacionada com sua habilidade de ligação a glicoproteínas ou outras estruturas glicosiladas, presentes em membranas de células de tecidos que revestem seus aparelhos digestivos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os inibidores de proteases, cuja ação antinutricional decorre da redução do catabolismo de proteínas ingeridas na dieta do inseto, causada pela inibição da ação das enzimas proteolíticas de seus tratos digestivos, também têm sido alvos de vários trabalhos (DANTZGER *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). As vicilinas se ligam fortemente, *in vivo*, à quitina (homopolímero de N-acetil-D-glucosamina) detectada na matriz ou membrana peritrófica que reveste a superfície do intestino médio de insetos (UCHÔA *et al.*, 2009; BARD *et al.*, 2014). Quitinases catalisam a hidrólise de quitina e conferem resistência de plantas a fitopatógenos, que apresentam quitina como componente essencial de suas estruturas corpóreas, tais como a parede celular fúngica e membranas ou matrizes peritróficas de intestinos de insetos da família dos bruquídeos, como *C. maculatus* (ISELI *et al.*, 1996).

Levando em conta a grande diversidade de insetos pestes de relevância agrônômica, neste presente estudo foram particularmente examinados, como insetos-modelo: *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium Castaneum*, que destroem os feijões do gênero *Vigna*, no caso da primeira espécie, e são conhecidos como pragas secundárias importantes no armazenamento de cereais moídos, no segundo caso (DE SÁ *et al.*, 2014; FABRES *et al.*, 2014). Neste trabalho, avaliamos o potencial tóxico de proteínas de cotilédones de sementes de *C. fairchildiana* ao desenvolvimento e sobrevivência dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*. Para isso, foi feito o fracionamento de seis frações de proteínas a partir de cotilédones de sementes de *C. fairchildiana*, denominadas frações F1 (albuminas), F2 (globulinas), F3 (kafirinas), F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas) (LUO *et al.*, 2014). A figura 4 mostra que a fração albumínica F1 é a que apresenta os mais altos níveis de proteína e a fração F3 kafirinas possui os mais baixos níveis; as outras frações apresentam níveis intermediários de proteínas. Não foi possível comparar esse resultado com dados da literatura, porque o único trabalho que fez esse tipo de fracionamento de proteínas foi o

de LUO *et al.* (2014) e eles não fizeram dosagem de proteínas por BCA e sim mediram a quantidade de aminoácidos não essenciais no feijão fava antes e após a brotação e também não analisaram o perfil proteico das frações por SDS-PAGE. Na figura 5, observamos os perfis proteicos das seis frações de proteínas que são, de forma geral, relativamente distintos entre as frações. Também foi possível verificar que não apareceu nenhuma banda na fração F3 (kafirinas), o que nos levou a investigar a possível presença de proteínas de mais baixos pesos moleculares. Assim, visualizamos o perfil das proteínas de baixo peso molecular em gel de tricina-SDS-PAGE, onde observamos diversas bandas proteicas em todas as frações, inclusive na fração F3 (Figura 5B). Observamos também que algumas proteínas desta fração puderam ser mais bem visualizadas utilizando-se a metodologia de revelação por nitrato prata (Figura 5C). No entanto, temos também uma banda com aproximadamente 6,5 kDa na fração F3, visualizada com a coloração por *Coomassie Brilliant Blue*, que não aparece na precipitação com prata, acreditamos que sejam um grupo de proteínas com baixa afinidade com a prata, visto que CHEVALLET *et al.* (2006) relataram que com este tipo de coloração proteínas ácidas são melhor reveladas que as proteínas básicas. Por isso, acreditamos que provavelmente pode se tratar de um conjunto de proteínas em sua maioria básicas (seta na Figura 5B).

As frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana*, uma vez quantificadas e visualmente analisadas, foram submetidas a testes de sua capacidade de interferir com o desenvolvimento de *C. maculatus* e *T. castaneum*, com metodologias adaptadas de DE SÁ *et al.* (2014) e FABRES *et al.* (2014) respectivamente. Como podemos observar na figura 6, todas as frações mostraram ser tóxicas a *C. maculatus* em concentrações muito baixas e as frações F1 e F3 mostraram maior toxicidade, visto que não obtivemos nenhum sobrevivente acima da concentração de 0,1%. A partir dessa observação, seguimos examinando essas duas frações F1 e F3, e como vemos na figura 7, os resultados reforçaram a natureza altamente tóxica destas frações, em especial de F3, que, quando incorporada em concentrações de 0,05% da massa da semente, foi capaz de reduzir em cerca de 75% e, em 0,1%, não permitiu o desenvolvimento larval. Passamos então para a fase de

isolamento destas proteínas. Para isso, utilizamos uma metodologia adaptada de cromatografia de exclusão molecular, numa coluna de Sephadex G-50, e sub-fracionamos as frações F1 (albuminas) e F3 (kafirinas), conforme mostram as figuras 7 e 8, respectivamente, e testamos novamente as novas frações em ensaios de sementes artificiais. Vê-se, na figura 10, que todos os picos da fração F1 causaram redução significativa do peso larval; no entanto o P1 foi capaz de reduzir em 86,6% o peso larval na concentração de 0,05% do total da semente.

Verificamos então o perfil proteico destes picos cromatográficos de F1 e a figura 12 mostra que P1 apresenta 3 bandas majoritárias bem definidas, de massas moleculares de aproximadamente 100, 35 e 12 kDa. Assim, imaginamos que a toxicidade registrada pode estar associada a uma dessas proteínas ou que a ação conjunta destas proteínas reduziu drasticamente o peso larval de *C. maculatus*, assim como OPPERT *et al.* (1993) observaram que o sinergismo de diferentes classes de inibidores de proteinases (cisteínicas e serínicas) aumenta a toxicidade para insetos como *T. castaneum*, no entanto, ainda não podemos afirmar quais proteínas são essas. Como a concentração utilizada no experimento foi muito baixa (0,05%), acreditamos que se trata de uma importante fonte de proteínas tóxicas que podem ser caracterizadas química e estruturalmente e que devem ser de grande valia para programas de melhoramento genético de cultivares de relevância comercial, principalmente para feijões do gênero *Vigna*, que são alvo da família dos bruquídeos. Já a figura 11, mostra toxicidade para os três picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular da F3. Neste caso, F3P1 também apresenta maior toxicidade, sendo responsável por uma redução de 66,1 % do peso das larvas de *C. maculatus*. O perfil proteico desta F3P1 (Figura 13B) mostra apenas uma banda de aproximadamente 13 kDa para este pico (P1), o que nos leva a acreditar que esta proteína é a responsável por tal toxicidade. DANTZGER *et al.* (2015) encontraram um inibidor de protease serínica em sementes de *C. fairchildiana*, que exibe efeitos antinutricionais sobre as larvas de *Anagasta kuehniella*, *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* reduzindo em 76%, 59% e 49%, respectivamente, a atividade das proteases intestinais destes insetos. No entanto, neste presente estudo não podemos afirmar com certeza que a

proteína encontrada seria da classe de inibidores de proteases, visto que não encontramos atividade inibitória para proteases cisteínicas (papaína) e proteases serínicas (tripsina). Por isso, novos ensaios precisam ser feitos para testar essa hipótese. Assim, como foi incorporada no ensaio uma concentração muito baixa (0,05%), acreditamos que se trata de uma importante proteína tóxica de grande importância agrônômica, para a formulação de novos inseticidas naturais, que não danifiquem o meio ambiente e a saúde humana, como descrito por KOUNDAL & RAJENDRAN (2003). Mas ainda não podemos afirmar qual a natureza da proteína em questão.

Nos ensaios de alimentação artificial de *T. castaneum*, observamos na figura 14A que quando testadas as concentrações de 10%, 20% e 30% de farinha de cotilédones de *C. fairchildiana*, não houve alteração na sobrevivência larval em 15 dias; no entanto, com 10%, o peso larval foi reduzido em 99,37%, com 20%, em 99,56% e com 30%, em 99,59% (Figura 14B). Isso nos fez acreditar que a farinha estava causando privação nutricional nas larvas. Após 30 dias de continuidade do experimento, observamos que o controle tinha 100% de insetos adultos e nos testes com 10% de farinha de *C. fairchildiana* havia 26,4% de pupas e 66,7 % de adultos; com 20%, tínhamos 6,7% de larvas, 53,3% de pupas e 20% de adulto; e com 30%, 6,7% de larvas, 60 % de pupas e 13,3 % de adultos. Portanto, a farinha de cotilédones de *C. fairchildiana* estava causando um retardo no desenvolvimento de *T. castaneum*, semelhante com o relatado por FABRES *et al.* (2014) que observou que alterações na dieta destes insetos, causa privação de nutrientes essenciais e retarda o desenvolvimento larval de *T. castaneum*. Dessa forma, a inclusão de compostos tóxicos específicos a esta praga na sua alimentação pode ser uma boa estratégia de controle desta praga. Testamos, então, a incorporação das frações proteicas extraídas previamente (F1 (albuminas), F2 (globulinas), F3 (kafirinas), F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas) na alimentação do *T. castaneum*. Neste ensaio podemos ver, na figura 16, que, visto que o número de larvas vivas caiu (F1 = 28%, F2 = 54%, F3 = 60 %, F4 = 0%, F5 = 0% e F6 = 0%), sendo que F4, F5 e F6 foram as mais tóxicas para o inseto, e partir de 10 dias não houve sobreviventes alimentados com estas frações. Ainda assim,

constatou-se que houve um retardo no desenvolvimento das larvas sobreviventes nas frações F1, F2 e F3 (Figura 17), sugerindo que as proteínas destas frações causem um retardo no desenvolvimento das larvas de *T. castaneum*, semelhante ao que foi relatado por GURJAR *et al.* (2010) que encontraram uma lectina de *Artocarpus hirsuta* capaz de inibir o crescimento e reprodutividade de *T. castaneum*.

Na tentativa de melhor caracterizar a natureza proteica da toxicidade das frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana*, investigamos a presença de potenciais inibidores de proteases cisteínicas e serínicas nestas amostras. Como justificativa a esse interesse, estão os fatos de que *C. maculatus* utiliza proteases cisteínicas como principal classe de proteinases na sua digestão (DE SÁ *et al.*, 2014) e em *T. castaneum*, a principal classe de proteinases digestivas são as proteases serínicas (FABRES *et al.*, 2014). As frações proteicas que apresentaram inibição de proteases cisteínicas, do tipo papaínica, foram F2 (2,64 UIP), F3 (3,3 UIP), F4 (7,1 UIP) e F5 (7,76 UIP). Já nas frações cromatográficas, a fração F1/P1 (1,8 UIP) foi a única em que tal atividade foi detectada. Imaginamos que em virtude de F1 apresentar grande diversidade de proteínas, quando testada como fração completa, a provável presença de um inibidor minoritário em termos de concentração, não foi detectada no ensaio. No entanto, quando sub-fracionada a F1 na coluna de exclusão molecular, estes inibidores foram concentrados em uma única fração e aí a detecção de sua atividade tornou-se possível. Outro ponto intrigante nos resultados obtidos foi a presença desta atividade, em níveis até relativamente elevados, nas frações outras, que não as albuminas. Classicamente, na literatura, os inibidores de proteases são relatados como solúveis em água e portanto, proteínas do tipo albumina (BEWLEY AND BLACK, 1994). Nas frações em que a base do extraente também foi a água (F2 e F4), poderia ser sugerido que a condição de extração possibilitou a solubilidade de inibidores que não estavam disponibilizados, em sua forma livre, na extração aquosa inicial, inibidores que porventura estivessem complexados a outras moléculas, ou associados em formulações mais complexas, como no caso da família de inibidores do tipo cininogênios. Já nas frações F3 e F5, extraídas em solventes alcóolicos, acreditamos que possam ter sido extraídos inibidores associados a

glicoproteínas ou outras moléculas conjugadas a frações de membranas, mas não encontramos relatos na literatura que subsidiassem tais proposições. Estas atividades merecerão, pois, estudos mais aprofundados em projetos futuros.

No caso do ensaio de inibição de proteases serínicas do tipo tripsina, para as frações proteicas não obtivemos nenhuma inibição da tripsina nas condições realizadas do ensaio. Como nas primeiras determinações realizadas, as leituras de absorvância das amostras eram até mais altas que as da tripsina controle usada no ensaio, pensamos que poderia haver a presença de proteases serínicas endógenas nas amostras que estivessem mascarando os resultados. Por essa razão, e conhecendo a natureza termoestável dos inibidores de proteases de sementes, fervemos as amostras por 3 minutos, e refizemos os ensaios de inibição com as amostras fervidas e centrifugadas. Novamente nenhuma inibição foi detectada. A exemplo do que foi observado com a fração F1, cuja atividade de inibição de papaína só se revelou quando este material foi sub-fracionado pela exclusão molecular, acreditamos que a atividade do inibidor de tripsina, relatada por DANTZGER *et al.* (2015), precisaria também ser determinada nas frações cromatográficas, o que infelizmente não se fez possível por quantidade insuficiente de amostras. Acreditamos, portanto, que não temos dados suficientes no momento que nos permitam afirmar que estas proteínas que mostraram toxicidade ao *Tribolium castaneum* sejam desta ou de outra natureza, como por exemplo lectinas, a exemplo do que foi descrito por GURJAR *et al.* (2010).

Segundo KOUNDAL & RAJENDRAN (2003), a produção de proteínas tóxicas que interferem na digestão de insetos é um mecanismo natural de defesa de plantas, sendo assim, o uso de genes que codificam essas proteínas está surgindo como uma forma viável de produção de plantas transgênicas resistentes a pragas. Por isso, é importante caracterizar essas proteínas e seus genes, visto que a disponibilidade de vários genes facilitará o desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Essas plantas transgênicas terão menor custo no cultivo, e por reduzirem o uso de agrotóxicos, também levarão à redução de danos ambientais e à saúde humana.

## 6 Conclusão

- Todas as frações de proteínas apresentaram efeitos tóxicos no desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* e *T. castaneum*, indicando um alto potencial de controle para essas espécies de insetos.

- As frações F1 (albuminas) e F3 (kafirinas) apresentaram maior toxicidade para *C. maculatus*, uma vez que não houve sobreviventes quando tais frações foram incorporadas nas dietas desses insetos em concentrações acima de 0,1%.

- Todos os picos da fração F1 causaram redução significativa do peso larval, no entanto o P1 foi capaz de reduzir em 86,6% o peso larval de *C. maculatus* na concentração de 0,05% do total da massa da semente. P1 apresenta um perfil proteico com três bandas majoritárias bem definidas, de massas moleculares de aproximadamente 100, 40 e 12 kDa.

- Os três picos obtidos da fração F3 por cromatografia de exclusão molecular foram tóxicos, no entanto P1 também apresenta maior toxicidade com uma redução de 66,1% do peso das larvas de *C. maculatus*, quando incorporado na concentração de 0,05% do total da massa da semente. P1 mostrou um perfil proteico com apenas uma banda de aproximadamente 13 kDa.

- As frações F1, F2 e F3 causaram a morte e atraso no desenvolvimento larval de *T. castaneum*, enquanto F4, F5 e F6 causaram a morte de todos os indivíduos após 10 dias.

- As frações proteicas que apresentaram inibição de proteases cisteínicas do tipo papaína foram F2 (2,64 UIP), F3(3,3 UIP), F4 (7,1 UIP) e F5 (7,76 UIP). Já nas frações cromatográficas somente a fração F1/P1 (1,8 UIP) mostrou atividade inibitória.

- O ensaio de inibição de proteases serínicas do tipo tripsina não mostrou nenhuma inibição da tripsina nas frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6, nas condições testadas.

## 7 Referências

- ASH, S. Evidence of arthropod-plant interactions in the Upper Triassic of the southwestern United States. **Lefhaia**, v. 29, p. 237–248, 1997.
- BARD, G. C. *et al.* Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are  $\alpha$ -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 102, n. 4, p. 335–343, 2014.
- BENREY, B. *et al.* The effects of domestication of Brassica and Phaseolus on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. **Biological Control**, v. 11, n. 2, p. 130–140, 1998.
- BEWLEY AND BLACK. Seeds - physiology of development and germination. **Plenum Press, NY**, Second Edition, pp.1,35-42, 147-153, 1994.
- BROWN, S. J. *et al.* The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): A model for studies of development and pest biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 8, 2009.
- CHEVALLET, M. *et al.* Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature**, v. 4, p. 1852–1858, 2006.
- CORDEIRO, E. M. G. *et al.* Insecticide resistance and size assortative mating in females of the maize. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 479–484, 2016.
- 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, 2016.
- DANTZGER, M. *et al.* Bowman – Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds : Isolation , biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015.

- DE SÁ, L. F. R. Efeito do tegumento de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Dissertação de mestrado**. Campos dos Goytacazes, UENF, 2013.
- 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.
- DEMARTINI, D. R. *et al.* A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 521–532, 2007.
- DEVI, M. B. & DEVI, N. V. Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 2, n. 3, p. 74–76, 2014.
- DUCKE, A. As leguminosas da Amazônia Brasileira: notas sobre a flora neotrópica - II. **Instituto Agrônômico do Norte**, v. 1, n. 1, p. 248, 1949.
- DUNN, B. Determination of protease mechanism. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. **R Beynon, JS Bond**, v. 2, p. 77–104, 2001.
- EHRlich, P. R. & RAVEN, R. J. Butterflies and plants : a study in coevolution **Society for the Study of Evolution**, v. 18, n. 4, p. 586–608, 1964.
- 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.
- FIRMINO, F. *et al.* Cowpea (*V. unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid *C. Maculatus* and *Z. Subfasciatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 29, n. 1, p. 749–756, 1996.

- FÜRSTENBERG-HÄGG, J. *et al.* Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 10242-10297, 2013.
- GATEHOUSE, A. M. R. *et al.* Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*; mechanism of toxicity. **Science of Food and Agriculture**, v. 35, p. 373–380, 1984.
- TRIBOLIUM GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. April, p. 949–955, 2008.
- GOLOB, P & KILMINSTER, A. The biology and control of *Zabrotes subfasciatus* (boheman) (cwleoptera: bruchidae) infesting red kidney beans. **Journal of Stored Products Research**, v. 18, p. 95–101, 1982.
- GONÇALVES C. L. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e plântulas, e anatomia das sementes de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*). **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 4, p. 414–421, 2014.
- GUEDES, R. N. C. Insecticide resistance, control failure likelihood, and the first law of geography. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 479–484, 2016.
- GURJAR, M. M. *et al.* Growth inhibition and total loss of reproductive potential in *Tribolium castaneum* by *Artocarpus hirsuta* lectin. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 38, n. 2, p. 95–98, 2010.
- ISELI, B. *et al.* Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 186–188, 1996.
- IULEK, J. *et al.* Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, n. 11–12, p. 1195–1204, 2000.
- JANARTHANAN, S. & SURESH, P. Insecticidal potential of wild bean seed protein , arcelin. **Natural Product Radiance**, v. 2, n. October 2003, p. 243–245, 2010.

- KOUNDAL, K. R. & RAJENDRAN, P. Plant insecticidal proteins and their potential for developing transgenics resistant to insect pests. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. January, p. 110–120, 2003.
- KUNZ, D. *et al.* Comparative biochemistry and physiology , part B receptor mediated endocytosis of vicilin in *Callosobruchus maculatus* ( Coleoptera : Chrysomelidae ) larval midgut epithelial cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 210, n. May, p. 39–47, 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAWRENCE, S. D. & NOVAK, N. G. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 593–599, 2006.
- LAWTON, J. H. Plant architecture and the diversity of phytophagous insects. **AnIL Rev. Entol1WI**, v. 28, p. 23–39, 1983.
- LEITE, FILOMENA, J. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **molecules**, v. 17, n. 14, p. 3277–3290, 2012.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo da plantas nativas do Brasil. **Nova Odessa**, v. 1, n. 1, p. 1, 1992.
- LUO, Y. *et al.* Effect of soaking and sprouting on iron and zinc availability in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3970–3976, 2014.
- 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**, v. 105, n. 1, p. 89–94, 1993.
- MAGISTRALI, I. C. *et al.* Ocorrência e infestação de *Euphalerus clitoriae* Burckhardt & Guajará, 2000 (Hemiptera: Psylloidea) em árvores de sombreiro (*Clitoria fairchildiana* HOWARD) utilizadas na arborização urbana de Viçosa-MG. **Rev Bras. de Arborização Urbana**, v. 4, n. 4, p. 100–110, 2009.

- MICHAUD, D. *et al.* Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 3, p. 497–503, 1994.
- NAEEM, A. *et al.* Purification and characterization of a novel b - D -galactosides - specific lectin from *Clitoria ternatea*. **The Protein Journal**, v. 26, n. 6, p. 1572–3887, 2007.
- NUNES, N. N. S. *et al.* Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larva development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431–10436, 2015.
- OLIVEIRA, L. O. *et al.* A Trypsin inhibitor from *Clitoria fairchildiana* cotyledons is active against digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Protein & Peptide Letters**, v. 22, n. 10, p. 893–902, 2015.
- OLIVEIRA C.F.R. *et al.* Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498–504, 2011.
- OPIT, G. P. *et al.* Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in oklahoma phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in oklahoma. **BioOne Research Evolved**, v. 105, n. 4, p. 1107–1114, 2012.
- OPPERT BRENDA, THOMAS D. MORGAN, C. C. AND K. J. K. DIETARY MIXTURES OF CYSTEINE AND SERINE PROTEINASE INHIBITORS EXHIBIT SYNERGISTIC TOXICITY TOWARD THE RED FLOUR BEETLE , TRIBOLIUM CASTANEUM. **Camp. Biochem. Physiol.**, v. 105, n. 3, p. 379–385, 1993.
- OSBORN, T. C. *et al.* Bean arcelin. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, n. 6, p. 847–855, 1986.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology**. [s.l: s.n.]. v. 15

- SALES, M. P.; MACEDO, L. M. DIGESTIBILITY OF COWPEA (VIGNA UNGUICULATA) VICILINS BY PEPSIN, PAPAIN AND BRUCHID (INSECT) MIDGUT PROTEINASES. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 4, p. 945–950, 1992.
- SALES, P.; GERHARDT, I. R.; FA, M. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, p. 515–522, 2000.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.
- SEGENET, K.; CARDONA, C.; SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 867–873, 2004.
- SHARMA, N. et al. Isolation and Characterization of an RIP ( Ribosome-Inactivating Protein )-Like Protein from Tobacco with Dual Enzymatic Activity 1 [ w ]. **Plant Physiology**, v. 134, p. 171–181, 2004.
- SILVA, B. M. D. S. & MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 195–201, 2008.
- SILVA, N. C. M. et al. Albizia lebeck 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, 1985.
- TABUNOKI, H. et al. Superoxide dismutase 2 knockdown leads to defects in locomotor activity, sensitivity to paraquat, and increased cuticle pigmentation in *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 3–5, 2016.

- TAMIRU, A.; KHAN, Z. R.; BRUCE, T. J. A. New directions for improving crop resistance to insects by breeding for egg induced defence. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, n. 1, p. 51–55, 2015.
- TREVISAN, H. et al. Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: Hesperiiidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. **Ciência Rural**, v. 34, p. 3–6, 2004.
- 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, 2009.
- VERNEKAR, J. V et al. Novel bifunctional alkaline protease inhibitor: protease inhibitory activity as the biochemical basis of antifungal activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 4, p. 1018–24, 2001.
- VIEIRA BARD, G. C. et al. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are  $\alpha$ -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 102, n. 4, p. 335–343, 2014.
- WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306–1320, 2012.
- XAVIER FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. 1ª edição. Fortaleza: **Imprensa da Universidade Federal do Ceará**, 31.p. 1993.
- ZANUNCIO, J. C. et al. *Hyperchiria incisa incisa* (Lepidoptera: Saturniidae) on plants of *Clitoria fairchildiana* in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 67, n. 2, p. 131–133, 2013.
- [https://www.google.com.br/search?q=Clitoria+fairchildiana&source=lnms&tbn=sch&sa=X&ved=0ahUKEwjstqyN0bYAhULgpAKHfnaAPwQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662](https://www.google.com.br/search?q=Clitoria+fairchildiana&source=lnms&tbn=sch&sa=X&ved=0ahUKEwjstqyN0bYAhULgpAKHfnaAPwQ_AUICigB&biw=1366&bih=662) acesso em: 20/01/2018 às 11:34 hs.
- [https://www.google.com.br/search?q=tribolium+castaneum&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjgzLT31ObYAhUCQ5AKHRzOAYcQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662](https://www.google.com.br/search?q=tribolium+castaneum&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjgzLT31ObYAhUCQ5AKHRzOAYcQ_AUICigB&biw=1366&bih=662), acesso em: 20/01/2018 às 11:40 hs.

<https://science-explained.com/techniques/rna-interference-in-tribolium/>,  
acessada em: 20/01/2018 às 11:47 h.