

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À QUITINA DE TEGUMENTO DE *Albizia
lebbeck* e *Glycine max*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA
NO CONTROLE DA PENETRAÇÃO DE BRUQUÍDEOS

NADIA CASARIN MARTINS DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
ABRIL-2014

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À QUITINA DE TEGUMENTO DE *Albizia lebbbeck* e *Glycine max*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA NO CONTROLE DA PENETRAÇÃO DE BRUQUÍDEOS

NADIA CASARIN MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL-2014

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À QUITINA DE TEGUMENTO DE *Albizia lebbbeck* e *Glycine max*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA NO CONTROLE DA PENETRAÇÃO DE BRUQUÍDEOS

NADIA CASARIN MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de abril de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof. André de Oliveira Carvalho (Dr., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Francisco José Alves Lemos (Dr., Bioquímica) – UENF

Prof.^a Luciana Belarmino da Silva (Dr.^a, Biociências e Biotecnologia) – IFF

Prof.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (Dr.^a, Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientadora)

*Ao meu querido Deus, por seu amor incondicional, por
realizar e cuidar de cada detalhe deste sonho e por todo seu
companheirismo,*

Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS:

À Deus, meu Pai querido, por realizar este meu sonho e por estar comigo durante toda essa caminhada. Sem Você nada teria sido possível.

À minha orientadora Antônia Elenir Amâncio Oliveira, por sua orientação, credibilidade e ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

Aos Professores André de Oliveira Carvalho, Francisco José Alves Lemos e Luciana Belarmindo da Silva, por participarem da minha banca examinadora.

A todos os alunos do meu laboratório por toda ajuda prestada durante o meu mestrado.

Aos amigos e companheiros do LQFPP: Gustavo, Dayanni, Francielle, Lucilene, Cris, Nathalia por toda ajuda dada e pelos ótimos momentos de descontração e de muitas risadas. Vou sentir saudades!

À Isabela por toda a sua ajuda durante meu mestrado e pelo carinho de sempre. Vou sentir saudades!

Ao técnico Cristovão por toda ajuda dada durante o meu mestrado. Muito obrigada!

À minha família pelo carinho de sempre e por compreenderem a minha ausência. Amo muito vocês!

À minha irmã Flavia por sempre estar ao meu lado me apoiando, incentivando e aconselhando. Seu amor fez toda a diferença!

À minha amiga Amanda por todo incentivo, amizade e força durante esta caminhada. Obrigada por tudo!

À minha amiga Viviane por sempre apoiar minhas ideias, pelo incentivo e pela amizade. Por me escutar e aturar tantas vezes (rsrs). Obrigada amiga!

À Primeira Igreja Batista de Campos por seus ensinamentos e apoio espiritual.

A todos que contribuíram de certa forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1-Aspectos gerais	1
1.2-Defesa constitutivas de plantas	2
1.3-Proteínas com afinidade à quitina	3
1.4-Tegumento de sementes como barreira química contra a penetração de insetos	7
1.5-O inseto <i>Callosobruchus maculatus</i>	9
2 – OBJETIVOS	11
2.1-Objetivo Geral	11
2.1.1-Objetivos Específicos	11
3-MATERIAS E MÉTODOS	12
3.1-Sementes	12
3.2-Insetos	12
3.3-ENSAIOS DE TOXICIDADE PARA <i>C. maculatus</i>	12
3.3.1-Sementes artificiais cobertas por tegumentos artificiais	12
3.3.2-Investigações das alterações morfológicas das larvas no interior	

dos ovos postos sobre os tegumentos artificiais	13
3.3.3-Marcação de proteínas do tegumento de <i>A. lebbeck</i> e <i>G. max</i> com isotiocianato de fluoresceína (FITC)	14
3.3.4-Acompanhamento da trajetória das proteínas Marcadas com FITC no trato intestinal das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	14
3.3.5 Teste de longevidade dos insetos adultos emergidos a partir de ovos ovipositados por fêmeas que se desenvolveram após a travessia dos tegumentos artificiais contendo proteínas de tegumento de <i>Albizia lebbeck</i>	15
3.4- EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS COM AFINIDADE A QUITINA DE TEGUMENTOS DE SEMENTES	15
3.4.1- Extração proteica	15
3.4.2-Preparação da quitina	16
3.4.3-Cromatografia de afinidade em coluna de quitina	16
3.5-PERFIL PROTEICO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DOS TEGUMENTOS NATURAIS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À QUITINA	17
3.5.1-Eletroforese em gel poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	17
3.5.2-Identificação das proteínas por espectrometria de massas	17
4 – RESULTADOS	19
4.1-Acompanhamento do desenvolvimento larval inicial do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de sementes	19
4.2-Avaliação da mortalidade larval de <i>C. maculatus</i> após a travessia dos tegumentos artificiais	21
4.3-Avaliação da massa das larvas de <i>C. maculatus</i> após a travessia dos tegumentos artificiais	21

4.4-Isolamento e visualização das proteínas dos tegumentos com afinidade à quitina	24
4.5-Characterização, por espectrometria de massas, das proteínas dos tegumentos com afinidade à quitina	27
4.6-Acompanhamento do desenvolvimento das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre os tegumentos artificiais contendo as proteínas ligadoras de quitina	32
4.7-Avaliação da mortalidade larval de <i>C. maculatus</i> após a travessia do tegumento artificial contendo as proteínas ligadoras de quitina de tegumento	34
4.8-Avaliação da toxicidade das frações proteicas ligadoras de quitina de tegumentos sobre a massa larval	34
4.9-Acompanhamento da ingestão e excreção de proteínas ligadoras de quitina marcadas com FITC de tegumento de <i>A. Lebbeck</i> em larvas de <i>C. maculatus</i>	37
4.10-Acompanhamento da ingestão e excreção de proteínas ligadoras de quitina de tegumento de <i>G. max</i> em larvas de <i>C. maculatus</i>	39
4.11-Avaliação da longevidade dos insetos adultos desenvolvidos a partir de ovos ovipositados por fêmeas que se desenvolveram após a travessia dos tegumentos artificiais contendo proteínas de tegumento de <i>A. lebbeck</i>	42
4.12-Influência da espessura do tegumento artificial sobre o desenvolvimento das larvas de <i>C. maculatus</i>	44
4.13-Avaliação da mortalidade larval de <i>C. maculatus</i> após atravessar tegumento artificial mais espessos contendo 25% de fração proteica ligadora de quitina de tegumentos de <i>G. max</i>	44
4.14-Avaliação da toxicidade das proteínas ligadoras de quitina de tegumentos de <i>G.max</i> no desenvolvimento das larvas quando incorporadas em tegumentos mais espessos	47
5- DISCUSSÃO	49

6- CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de figuras

Página

Figura 1:

Fotomicrografia mostrando o desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos postos sobre os tegumentos artificiais de 30 mg de sementes artificiais do 1º ao 6º dia após a oviposição (DAO)

20

Figura 2:

Visualização gráfica da mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO sobre tegumentos artificiais com farinha de tegumento de *Glycine max* e *Albizia lebbbeck*

22

Figura 3:

Visualização gráfica da massa das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais após a travessia dos tegumentos artificiais com farinha de tegumento de *Glycine max* e *Albizia lebbbeck*

23

Figura 4:

Cromatografia da fração proteica precipitada com sulfato de amônio (0-90%) de tegumentos naturais das sementes em coluna de afinidade à quitina

25

Figura 5:

Visualização eletroforético do perfil proteico em gel SDS-PAGE das frações com afinidade a quitina dos tegumentos de *Glycine max* (R1) e *Albizia lebbbeck* (R2)

26

Figura 6:

Desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre tegumentos artificiais de 20 mg de espessura do 1º ao 7º DAO

33

Figura 7:

Desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre tegumentos artificiais de 20 mg de espessura do 1º ao 8º DAO

33

Figura 8:

Visualização gráfica da mortalidade de larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO sobre tegumentos artificiais com 6% de proteínas de ligação à quitina de tegumento de *Albizia lebbbeck*

35

Figura 9:

Visualização gráfica da massa das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo as frações proteicas ligadoras de quitina de tegumentos de *A. lebbbeck* (A) e *G. max* (B)

36

Figura 10:

Fotomicrografia por microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de *Callosobruchus maculatus* aos 19 DAO que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 6% das proteínas ligadoras à quitina marcadas com FITC

38

Figura 11:

Fotomicrografia por microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 25% das proteínas ligadoras à quitina marcadas com FITC

40

Figura 12:

Visualização gráfica da longevidade dos insetos de *Callosobruchus maculatus* provenientes de fêmeas nascidas de sementes artificiais com tegumentos artificiais contendo proteínas ligadoras de quitina de *Albizia lebbek*

43

Figura 13:

Desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre 30 mg de tegumentos artificiais de semente do 1º ao 6º DAO

45

Figura 14:

Visualização gráfica da mortalidade larval de *Callosobruchus maculatus* após 19 DAO pelas fêmeas em experimentos com 30 mg de tegumentos artificiais

46

Figura 15:

Visualização gráfica da massa das larvas de *C. maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com 30 mg de tegumento artificial com fração proteica ligadora de quitina de tegumentos de *G. max*

48

LISTA DE TABELAS:	Pág.
Tabela I	28
Tabela II	30

ABREVIATURAS

kDa- KiloDalton

PBS- Tampão Fosfato salino

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TEMED- N' N' N' N' tetrametiletlenodiamino

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

DMSO- Dimetilsulfóxido

DTT- 1,4 Diotreitol

CHCA- α -ciano-4-acido hidroxí cinámico

TFA- Ácido Trifluoroacético

MALDI- "Matrix-assisted laser desorption/ionization"

MP- Matriz ou membrana Peritrófica

GLcNAc - N-acetilglicosamina

NeuNAc- N-acetil ácido -D- neuramínico

DAO- Dias Após Oviposição

RESUMO

As plantas tem desenvolvido uma variedade de estratégias de defesa físicas e químicas contra o ataque de pragas e patógenos, entre elas a presença de proteínas tóxicas nos tegumentos de sementes como uma barreira constitutiva de defesa. O objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade dos tegumentos de sementes de *Albizia lebbbeck* e *Glycine max* para o inseto *Callosobruchus maculatus* e investigar a participação das proteínas de ligação à quitina destes tegumentos nesta toxicidade. Os tegumentos das sementes foram separados dos cotilédones e macerados com N líquido para uma farinha fina. As proteínas dos tegumentos foram extraídas em tampão fosfato de sódio a 100 mM, cloreto sódio 0,5 M, pH 7,6, seguida por precipitação em sulfato de amônio (0-90%). As proteínas dos tegumentos de *A. lebbbeck* e *G. max* foram separadas usando uma coluna de cromatografia de afinidade a quitina. Os ensaios de toxicidade foram realizados seguindo a metodologia descrita por Souza *et al.*(2011) usando uma semente artificial com sistema de tegumento artificial. O tegumento da semente artificial foi preparado contendo diferentes concentrações das farinhas de tegumentos das sementes ou proteínas de ligação à quitina do tegumento de sementes. A identidade das proteínas foi analisada por espectrometria de massas. Nossos resultados mostraram que a farinha de tegumento, principalmente de *A. lebbbeck*, foi tóxica para *C. maculatus* interferindo no desenvolvimento larval. Proteínas de ligação à quitina foram isoladas em ambos os tegumentos das sementes. A presença de bandas proteicas similares à quitinase e uma proteína precursora de tegumento de 24 kDa foram isoladas dos tegumentos de sementes de *G. max* por cromatografia de afinidade à quitina. Do tegumento de sementes de *A. lebbbeck* foram isoladas proteínas similares a mexicaina e a vignaina, ambas as proteínas sendo proteases cisteínicas. Estas frações de ligação à quitina de tegumentos de sementes foram tóxicas para o inseto *C. maculatus*, interferindo no desenvolvimento, massa e sobrevivência larval. O intestino e as fezes das larvas que penetraram o tegumento artificial das sementes contendo as proteínas dos tegumentos de sementes marcadas com FITC foram investigados para detectar a absorção e excreção destes componentes. Larvas que ingeriram proteínas marcadas com FITC dos tegumentos das sementes artificiais mostram um intenso sinal fluorescente no intestino e nas fezes. Estes resultados provaram que as larvas são capazes de ingerir as proteínas dos tegumentos de sementes artificiais e que a ingestão dessas proteínas prejudicam a digestão e excreção larval. Sendo assim, o tegumento constitui uma barreira de defesa eficiente contra a penetração de pragas.

ABSTRACT

Plants have developed a variety of chemical and physical defense strategies against pests and pathogens attack including the presence of toxic proteins in seed coat as a constitutive defense barrier. The objective of this work was to investigate the *Albizia lebbbeck* and *Glycine max* seed coat toxicity to insect *Callosobruchus maculatus* and investigate the participation of chitin-binding proteins from these seed coat in this toxicity. Seed coat and cotyledons were separated and the seed coat was macerated with N₂ to fine flour. The proteins were extracted in buffer sodium phosphate 100 mM, sodium chloride 0,5 M, pH 7,6 (PBS) during 3 h at 4°C. After proteins ammonium sulfate precipitation (0-90%) the proteins were separated using a chitin affinity chromatography column. Toxicity assays were performed following the methodology described by Souza *et al.*, 2011 using a artificial seed with artificial seed coat system. The artificial seed coat was prepared containing different concentrations of the seed coat flours or seed coat chitin-binding proteins. The proteins identity was analyzed by mass spectrometry. Our results showed that the seed coat flour, mainly from *A. lebbbeck* were toxic to *C. maculatus* interfering in larval development. Chitin-binding proteins were isolated from both seed coats. The presence of proteins bands similar to chitinase and a 24 kDa seed coat protein precursor were isolated from *G. max* seed coat by chitin affinity. From *A. lebbbeck* seed coat proteins similar to mexicain and vignain were isolated, both proteins are cysteine proteases. These chitin-binding proteins from seed coats were toxic to *C. maculatus* insect, interfering in larval development, mass and survival. The midgut and feces from larvae that penetrated the artificial seed coat containing FITC-labeled seed coat proteins were investigated to detected intake and excretion of these compounds. Larvae that ingested artificial seed coat proteins labeled with FITC showed intense fluorescence signal in the midgut and in the feces. These results prove that the larvae are capable of ingesting proteins artificial seed coats and that the ingestion of these proteins impairs larval digestion and excretion. Thus, the seed coat is an effective defense barrier against the penetration of pests and pathogens.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A agricultura representa uma atividade socioeconômica de grande importância, por proporcionar alimentos ricos em nutrientes (Xavier-Filho, 1993). Dentre os produtos cultivados, as sementes se destacam como sendo fundamentais na alimentação animal, na propagação das culturas, no desenvolvimento das civilizações, na fabricação de produtos e na medicina tradicional (Moise *et al.*, 2005). A riqueza de nutrientes das sementes também faz delas uma importante fonte alimentar para diversas pragas e patógenos. Isso faz com que a produção de alimentos seja altamente comprometida devido aos danos causados às sementes pelo ataque dessas pragas e patógenos (Xavier-Filho, 1993).

Na tentativa de conter estes ataques, torna-se constante o uso de defensivos agrícolas artificiais no controle das pragas e patógenos. Contudo, tem sido visto que o uso desses agentes químicos leva a seleção de pragas e patógenos resistentes e ao acúmulo de resíduos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos no ambiente e nos alimentos. Outro grande problema além do custo elevado desses defensivos químicos é o efeito deles reduzirem em apenas 7% as perdas na produção (Oerke *et al.*, 1994; Fields *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de variedades agrícolas resistentes, através do uso da manipulação genética, ou seja, da biotecnologia agrícola, tem sido uma alternativa cada vez mais considerada para minimizar o uso de agrotóxicos no controle dessas pragas. Nessa técnica é feita a manipulação genética através da superexpressão ou inserção de genes de resistência que codifiquem para proteínas envolvidas nas respostas de defesa das plantas economicamente importantes (Appleby e Credland, 2004). Saber como os vegetais se protegem naturalmente é então uma alternativa promissora, pois pela bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes podem ser criadas, aumentando a produção e a qualidade das plantas adquiridas (Soares e Machado, 2007). Assim através de estudos sobre os mecanismos de toxicidade dessas proteínas para pragas é possível identificar novas candidatas potenciais para manipulação genética futuramente aplicável a culturas economicamente importantes.

1.2- Defesas constitutivas de plantas

O conhecimento dos mecanismos de defesa vegetal se destaca há décadas como um ponto importante para o desenvolvimento de variedades agrícolas mais resistentes (Agris, 1988). As espécies vegetais possuem diferentes mecanismos de defesa naturais físicos e químicos que as protegem dos ataques realizados por insetos e agentes fitopatogênicos. Dentre essas defesas, destacam-se as defesas constitutivas que são aquelas previamente existentes, ou seja, estruturas físicas ou compostos químicos defensivos que são sintetizados e depositados nos tecidos vegetais, já no momento de sua formação, independente de um prévio contato com o agressor (Xavier-Filho, 1993; Wu e Baldwin, 2010). Já a defesa induzida é aquela acionada por estímulos externos como a herbivoria ou estresse abiótico, onde uma série de reações são iniciadas desencadeando a produção de compostos de defesas (Van Loon *et al.*, 2006).

Com relação a defesas químicas, constitutivas ou induzidas, inúmeros compostos já foram relacionados com essa função, como aminoácidos não protéicos, compostos do metabolismo secundário e diversas proteínas. Dentre as proteínas de defesa já descritas podemos citar os inibidores de proteases (Hartl *et al.*, 2011), as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (Kaur *et al.*, 2012), as lectinas conhecidas como proteínas ligadoras de carboidratos (Peumans e Van Damme, 1995; Sadeghi *et al.*, 2006; Van Damme *et al.*, 2008), as quitinases (Santos *et al.*, 2008; Conceição, 2008; Wang *et al.*, 2009), as vicilinas (Yunes *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2012) e a grande família dos peptídeos antimicrobianos (Castro e Fontes, 2005; Van Loon, *et al.*, 2006; Zottich *et al.*, 2011). Já em relação às estruturas físicas de defesa destacam-se os pêlos, espinhos, tricômas e principalmente as características físicas como a espessura e dureza dos tegumentos das sementes (Fahn e Shimony, 1996).

Trabalhos sobre os mecanismos de toxicidade dessas moléculas têm mostrado sua eficiente ação contra insetos e agentes fitopatogênicos, o que tem contribuído para seu uso na bioengenharia. Plantas de trigo transgênicas, expressando uma quitinase da classe II de cevada, exibiram uma resistência maior contra o fungo *Fusarium graminearum*, tanto em campo quanto em casa de vegetação (Shin *et al.*, 2008). Plantas transgênicas de *Vitis vinífera* L. (espécie de videira) expressando o gene para quitinase de arroz exibiram uma maior atividade desta enzima e foram

mais tolerantes a infestação pelo bolor *Uncinula necator*, mostrando um início tardio da doença e lesões menores (Nirala *et al.*, 2010).

Outros exemplos são as vicilinas, proteínas do tipo globulinas 7S classicamente descritas como reserva energética para os processos germinativos e pós-germinativos (Khan *et al.*, 1980). Entretanto estas globulinas 7S também têm sido relacionadas com a defesa de plantas contra pragas e patógenos (Macedo *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 2000). Vicilinas variantes obtidas de sementes de *Vigna unguiculata* (IT81D 1053) de genótipo resistente à infestação de *C. maculatus* foram tóxicas para o inseto *C. maculatus*, causando um atraso no desenvolvimento larval e ocasionando até 100% de mortalidade. Foi visto ainda que estas vicilinas eram internalizadas pelas células do intestino da larva migrando até a porção basal dos enterócitos sendo sugerido assim que esta internalização poderia estar interferindo na fisiologia normal desses enterócitos afetando o desenvolvimento larval (Uchôa *et al.*, 2009). Vicilinas isoladas de uma ampla quantidade de sementes de leguminosas também foram tóxicas para larvas de *C. maculatus* (Yunes *et al.*, 1998). Assim, as proteínas de defesa de plantas são eficientes na proteção das plantas contra as pragas e patógenos.

1.3- Proteínas com afinidade à quitina

Trabalhos sobre os mecanismos de toxicidade de proteínas de defesa vegetal para insetos têm mostrado que muitas dessas proteínas possuem afinidade a quitina, podendo esta afinidade está relacionada com suas propriedades tóxicas. A quitina é um polímero de N-acetil- β -D-glicosamina que pode ser encontrada nos insetos, aracnídeos e crustáceos, em esponjas, celenterados, nematoides e moluscos e ainda nas paredes de fungos em suas células vegetativas e em esporulação (Merzendorfer, 2009 e 2011). Nos insetos, a quitina é um importante constituinte da cutícula, da traqueia e da matriz ou membrana peritrofica (MP). A MP é uma estrutura acelular que reveste o trato intestinal de alguns insetos, funcionando como uma barreira de proteção entre o bolo alimentar e o epitélio intestinal, protegendo assim o intestino contra a penetração de microrganismos do alimento, contra a abrasão do bolo alimentar e participando também nos processos digestivos e na absorção dos nutrientes (Terra, 2001; Merzendorfer e Zimoch, 2003).

As plantas sintetizam uma variedade de proteínas capazes de fazer ligações reversíveis a matrizes que possuem quitina em sua composição. Os membros clássicos dessa família de proteínas com afinidade a quitina contem um ou mais domínios de ligação a esse polímero. Este domínio de ligação à quitina é composto principalmente por um fragmento de 30 a 43 resíduos de aminoácidos, incluindo oito resíduos de cisteínas, três resíduos aromáticos e glicinas. Este domínio frequentemente é referido como domínio heveína ou arranjo de ligação a quitina (Beintema, 1994; Asensio *et al.*, 2000). Este domínio heveína é assim denominado por ser semelhante à pequena proteína heveína que possui em sua estrutura 43 aminoácidos com 8 resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfeto, e que possuem ligação a quitina (Van Damme *et al.*, 1999). Esta propriedade de ligação a quitina das heveínas foi descrita por Van Parjis *et al.* (1991) que também demonstrou a forte atividade antifúngica dessas pequenas proteínas para oito diferentes fungos (Van Parjis *et al.*, 1991).

Alguns membros da família de proteínas de ligação a quitina podem também se ligar a vários outros complexos de glicoconjugados contendo N-acetil glicosamina (GLcNAc) ou ácido N-acetil-D-neuramínico (NeuNAc) em sua composição (Raikhel *et al.*, 1993). Embora esse domínio de ligação a quitina esteja presente na maioria das proteínas que apresentam essa propriedade, algumas proteínas, como as vicilinas, que também apresentam afinidade a esse polímero não possuem este domínio de ligação, tendo o seu sítio de ligação ainda desconhecido.

Dentre as proteínas com afinidade a quitina, algumas já são bem caracterizadas como proteínas de defesa. Nesse contexto destacamos algumas lectinas, proteínas de reserva do tipo vicilinas e quitinases que além de se ligarem ao polímero, também podem digeri-los (Raikhel *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1997).

A propriedade de ligação à quitina das vicilinas tem sido diretamente relacionada com seus mecanismos de toxicidade para insetos e fungos. Os efeitos tóxicos dessas proteínas para o inseto *C. maculatus* já foi mostrado em vários trabalhos (Macedo *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 2000; Sales *et al.*, 2001; Uchôa *et al.*, 2009). O mecanismo de toxicidade dessas vicilinas parece estar relacionado à capacidade de se ligarem a estruturas quitinosas que revestem o trato intestinal das larvas, interferindo com a digestão e absorção dos nutrientes (Sales *et al.*, 2000; Uchôa *et al.*, 2009). O grau de digestibilidade dessas vicilinas por enzimas digestivas do inseto parece ser muito menor do que a de outras vicilinas não tóxicas (Sales *et al.*, 1992).

Em 2003, proteínas do tipo vicilina, obtidas de sementes de um genótipo resistente de *Vigna unguiculata* (IT81D-1045), apresentaram capacidade de ligação à estrutura intestinal do inseto *Diatrea saccharalis*. Essa ligação foi diretamente relacionada a alta toxicidade dessas proteínas para as larvas desse inseto. A adição de 2% da vicilina na dieta do inseto ocasionou um decréscimo de 40% na emergência dos insetos adultos (Mota *et al.*, 2003). Já em 2008, foi visto por Paes *et al.* que essas mesmas vicilinas também se ligavam a estruturas quitinosas presentes no intestino do inseto *Tenebrio molitor* (Paes *et al.*, 2008). Vicilinas obtidas de sementes de *Erythrina velutina* quando adicionadas a dieta artificial, apresentaram-se extremamente tóxicas para as larvas da mosca *Ceratitis capitata*, causando 50% de mortalidade larval (dose letal 0,14%) e uma redução de 50% na massa corporal larval (dose eficaz 0,12%). Essas vicilinas também apresentaram capacidade de se ligarem a membrana peritrófica das larvas, sendo seus efeitos deletérios também associados a essa ligação (Macedo *et al.*, 2008).

As lectinas, também conhecidas como hemaglutininas, são proteínas que apresentam afinidade por açúcares ou glicoconjugados, inclusive a quitina. Essa capacidade de ligação a oligo ou polissacarídeos presentes na superfície de microrganismos ou no trato intestinal de insetos tem sido relacionada com os mecanismos de toxicidade para pragas e patógenos (Peumans e Van Damme, 1995). Uma das primeiras lectinas isoladas foi a de sementes de *Ricinus communis* que foi nomeada de ricina (Franz, 1988). A toxicidade de lectinas para insetos é bastante abordada em trabalhos. Larvas do inseto *C. maculatus* tiveram seu desenvolvimento bastante comprometido após ingerirem frações proteicas ricas em lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*. Este trabalho mostrou que essas lectinas ligavam-se às células epiteliais do intestino do inseto, sugerindo que o mecanismo de toxicidade dessas lectinas estava relacionados a possíveis rupturas das células intestinais o que estaria prejudicando o transporte de nutrientes (Gatehouse *et al.*, 1984). Já em 2006, foi visto que lectinas de *Arisaema jacquemontii*, quando incorporadas na dieta afetava o desenvolvimento das larvas da mosca do melão *Bactrocera cucurbitae* (Kaur *et al.*, 2006).

As lectinas estão ainda relacionadas a atividades biológicas tais como atividade antitumoral, antiviral e antifúngica (Wu e Bao, 2012). A alta afinidade das lectinas a N-acetilglucosamina e N-acetil-D-ácido neuramínico, faz delas também importantes marcadores, como a conhecida lectina de planta WGA (aglutinina germe

de trigo), que conjugada a outras substâncias, é usada em análises microscópicas (Ohno *et al.*, 1986).

Quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise da quitina quebrando as ligações β -1,4 que unem os monômeros de GLcNAc (Park *et al.*, 2002). Essas enzimas podem ser encontradas em diversos organismos como mamíferos, insetos, plantas, fungos e bactérias (Adrangi e Faramarzi, 2013). Geralmente, estas enzimas possuem massa molecular compreendida entre 25 e 35 KDa podendo ser constitutiva ou sua produção ser induzidas por diversos fatores bióticos e abióticos como infecção, fermentos, seca, salinidade excessiva, frio, entre outros (Collinge *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 2000).

Quitinases de plantas têm sido classificadas de diversas maneiras. Baseando-se no seu sítio hidrolítico podem ser classificadas como endoquitinases e exoquitinases (Collinge *et al.*, 1993). Com base na similaridade da sequência de aminoácidos, estrutura, substrato específico, mecanismo de catálise e sensibilidade a inibidor podem ser classificadas dentro de sete Classes de I a VII (Arie *et al.*, 2000; Kasprzewska, 2003). As quitinases da Classe I possuem um domínio de ligação a quitina rico em cisteínas na região N-terminal e um domínio catalítico na região C-terminal (Neunhaus *et al.*, 1996). Juntamente com as quitinases das classes II, IV, VI e VII, as quitinases da classe I estão inseridas dentro da família 19 das glicosídeos hidrolases que são encontradas principalmente em plantas e algumas bactérias (Kezuka *et al.*, 2010; Ohno *et al.*, 1996).

Em plantas, as quitinases têm sido relacionadas aos processos de defesa da planta contra pragas e patógenos. Plantas transgênicas expressando constitutivamente genes de quitinases da classe I (Cht-2 ou Chr-3) mostraram resistência contra duas cepas do fungo de arroz *Magnaporthe grisea* (Nishizawa *et al.*, 1999). Plantas de arroz transgênicas tiveram sua resistência contra *Rhizoctonia solani* aumentada quando super expressavam genes de quitinases de arroz obtidos de plantas de arroz após infecção pelo *R. solani* (Datta *et al.*, 2001). Trabalho publicado em 2002 mostrou que uma quitinase com dois domínios de ligação a quitina, isolada de *Brassicae juncea*, quando expressa em células de fumo exercia atividade antifúngica contra os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma viridae*, e atividade inseticida contra o inseto *Pieris rapae* (Fung *et al.*, 2002). Uma fração contendo uma quitinase isolada do tegumento de *Glycine max* inibiu o crescimento dos fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma*

pseudokoningii (Santos *et al.*, 2008; Conceição, 2008).

1.4- Tegumento de sementes como barreira química contra a penetração de insetos

A semente é a parte da planta responsável pela propagação das espécies e desenvolvimento de plantas superiores (Bewley e Black, 1994), possuindo características fisiológicas e genéticas de extrema importância para o estabelecimento do novo indivíduo. Assim, suas propriedades bioquímicas e fisiológicas como suas reservas nutritivas, fatores de adaptação ao ambiente e mecanismos de defesa física e química tornaram possíveis o estabelecimento e a sustentação da planta jovem nos seus estágios iniciais de vida (Bewley e Black, 1994; Xavier-Filho, 1993).

A estrutura das sementes é constituída pelo eixo embrionário ou tecido meristemático, pelo tecido de reserva e pelo tegumento (Moise *et al.*, 2005). O tecido meristemático promove o crescimento dos eixos na direção raiz e caule resultando em uma plântula. Já o tecido de reserva por possuir diversas macromoléculas como carboidratos, lipídeos e proteínas fornece suprimento de energia durante o processo de germinação e ainda as unidades formadoras para a constituição das novas moléculas, células e tecidos. O tegumento é um tecido de origem materna desenvolvido a partir dos integumentos do óvulo, que delimita externamente toda a semente. Suas camadas de células maternas especializadas constituem um importante modulador entre o meio interno da semente e o externo (Wan *et al.*, 2002), além de ser um tecido protetor, sendo o primeiro a entrar em contato com agentes agressores. A composição desse tecido é bastante variada tanto na quantidade como na qualidade de seus constituintes. Pode conter uma alta concentração de substâncias do metabolismo secundário como aminoácidos não-protéicos, alcalóides, taninos, fenóis e pigmentos, além de compostos inibidores da germinação, carboidratos e proteínas (Moise *et al.*, 2005).

Por muitos anos, acreditava-se que o tegumento participava da defesa das sementes apenas fornecendo proteção física aos tecidos embrionários e de reserva (Kozlowski, 1972). Entretanto, após estudos que investigaram a relação entre dureza e espessura do tegumento de 73 espécies diferentes de sementes em relação à sobrevivência ou morte de larvas de *C. maculatus*, foi demonstrado que esse bruquídeo obtinha sucesso ao penetrar alguns dos tegumentos espessos e duros

enquanto morriam ao tentar atravessar alguns tegumentos extremamente finos (Janzen, 1977). Essas observações iniciaram estudos subsequentes cuja hipótese era de que os tegumentos seriam também barreiras químicas atuantes na resistência da semente. Posteriormente, foi mostrado que as larvas de primeiro instar de *Acanthoscelides obtectus* morriam ao atravessar os finos tegumentos de *Phaseolus vulgaris*, sendo assim esta mortalidade das larvas atribuída a componentes tóxicos presentes nesses tecidos (Thierry, 1984).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* possuía uma proteína homóloga a vicilina, uma proteína tipicamente de cotilédones que apresentava alta toxicidade para a larva do inseto *C. maculatus* (Oliveira *et al.*, 1999). Proteínas similares também foram identificadas no tegumento das sementes de *Phaseolus lunatus* (Moraes *et al.*, 2000) e *Phaseolus vulgaris* (Silva *et al.*, 2004) e sendo também tóxicas para *C. maculatus*. Posteriormente, foi identificado por Santos *et al.* (2008), proteínas do tegumento de *Glycine max* capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium lateritium* e *Fusarium oxysporium*. Nosso grupo também mostrou a presença de um carboidrato de massa molecular de 883,0 Da, formado por ramnose com ramificações de galactoses que foi tóxico para larvas de *C. maculatus* em concentrações inferiores a 2% (Oliveira *et al.*, 2002).

Em pesquisas com sete cultivares diferentes de *Glycine max* foram vistos que os tegumentos dessas sementes exerciam influências negativas na sobrevivência e desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*. Desta forma, os resultados mostraram haver uma redução drástica na oviposição, chegando a 100% no cultivar Tucunaré. Foi observado ainda atraso de até 116% no tempo de travessia das larvas pelo tegumento para alcançar os cotilédones e quando esses tegumentos naturais foram adicionados em sistema de sementes artificiais, estes ocasionaram uma redução de 34% na massa corporal das larvas que sobreviveram à travessia (Oliveira *et al.*, 2009). Reduções drásticas na oviposição e eclosão larval de *C. maculatus* também foram observados em outras sementes não hospedeiras. Assim, uma redução de 52,5% e 96,5%, respectivamente, foram vistos na oviposição pelas fêmeas sobre os tegumentos de *P. vulgaris* (cultivares manteiga e vermelho) e uma redução de 100% na eclosão larval dos ovos sobrepostos em tegumentos de *Dioclea altíssima* e *Canavalia ensiformis*. Ainda neste trabalho, foi visto que alguns ovos ovipositados sobre o tegumento de *C. ensiformis* murcharam e após o 16º dia as larvas que

permaneceram vivas foram incapazes de perfurar o tegumento em direção ao cotilédone da semente (Souza *et al.*, 2011). Souza *et al.* (2012) mostraram que a farinha de tegumentos de *Albizia lebbek* foi extremamente tóxicas ao desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*, ocasionando uma forte perda da massa corporal larval, em torno de 87,1% quando 1% da farinha do tegumento era adicionada nas sementes artificiais na qual as larvas se desenvolviam. Foi visto ainda que apenas 14,1% dessas larvas conseguiam sobreviver após 20 dias de contato com as sementes artificiais contendo a farinha. Uma proteína com similaridade a vicilina isolada desses tegumentos foi extremamente tóxica as larvas de *C. maculatus* quando adicionada à dieta artificial (Souza *et al.*, 2012).

Experimentos com tegumentos de *Phaseolus vulgaris* usando sementes artificiais cobertas com os tegumentos naturais e artificiais confirmaram que a toxicidade desses tegumentos para o inseto *C. maculatus* atinge principalmente a fase larval, não sendo observadas alterações no desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento larval foi prejudicado com reduções na sobrevivência em cerca de 40% e perda de 43,9% da massa corporal. Alterações nos processos digestivos das larvas também foram visualizadas, no qual enzimas digestivas intestinais das larvas tiveram sua atividade prejudicada após o consumo do tegumento pelas larvas durante a travessia pelo tegumento. Essas reduções foram de 54% na atividade de proteases cisteínicas, redução na atividade da α -amilase em até 28,5% e também da α -glucosidase em até 42,7% (Sá *et al.*, 2014).

1.5- O inseto *Callosobruchus maculatus*

O inseto *Callosobruchus maculatus* pertencente à Ordem Coleoptera é conhecido popularmente como “caruncho” ou “gorgulho” do feijão. O número estimado dos besouros dessa ordem é de cerca de 375 mil espécies, estando distribuídas em todo o mundo (Pereira e Almeida, 2001).

Esse inseto representa a principal praga de grãos armazenados de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (Gallo *et al.*, 2002). O ataque desses bruquideos as semente de *V. unguiculata* pode se iniciar no campo, continuando durante o armazenamento. O ataque desse inseto causa grandes danos as sementes, podendo levar a perdas de 20 a 60% dos grãos (Abrol, 1999; Gallo *et al.*, 2002; Tarver *et al.*, 2007). Os prejuízos causados aos grãos incluem perda de peso,

redução do poder germinativo e do valor nutricional e desvalorização comercial (Gallo *et al.*, 1988; Xavier-Filho, 1993).

Quanto a estrutura corporal desses insetos, estes se apresentam com cerca de 3 mm de comprimento, com uma cabeça preta e antenas com 11 segmentos serrilhados e tórax preto com pubescências douradas, apresentando no elítrons manchas amarronzadas, que em repouso formam um “X” (Quintela *et al.*, 1991). A melhor faixa de temperatura para o desenvolvimento desses insetos está compreendida entre 20 e 30 °C, com umidade relativa de 60%, no qual as fêmeas podem ovipositar em média cerca de 80 ovos (Gallo *et al.*, 2002). Os ovos desse bruquideo apresentam uma forma subelíptica, com uma coloração esbranquiçada, de comprimento médio de 0,5 mm. Durante seu ciclo de vida, as fêmeas realizam a postura dos ovos na parte externa das sementes hospedeiras, ficando os ovos aderidos ao tegumento. Posteriormente, dos ovos eclodem larvas curvas de cor branca que penetram o tegumento das sementes alcançando e consumindo o seu interior (Southgate, 1979; Credland e Dendy, 1992). No interior das sementes, estas larvas se transformam em pupa que gradativamente vão adquirindo a cor marrom, e nos últimos estágios apresentam vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981).

O ciclo de vida do *C. maculatus* pode ser dividido em sete estágios após a postura dos ovos: larvas até 8 dias após a oviposição (DAO) (1^o instar), 11 DAO (2^o instar), 13 DAO (3^o instar), 17 DAO (4^o instar), 19 DAO (pré-pupa), 24 DAO (pupa) e adulto. Após completar o seu desenvolvimento em aproximadamente 25-30 dias, os insetos adultos emergem da semente deixando galerias (Williams, 1980). Os insetos adultos apresentam dimorfismo sexual, com fêmeas maiores que os machos, e vivem uma média de 8 dias após a emergência (Quintela *et al.*, 1991).

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Isolar e caracterizar proteínas ligadoras de quitina dos tegumentos de sementes e investigar a eficiência dessas proteínas como barreira contra a penetração e desenvolvimento das larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*.

2.1.1- Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar proteínas de ligação a quitina de tegumentos de sementes de *Albizia lebbbeck* e *Glycine max*;
- Investigar a toxicidade dessas proteínas, quando incorporadas em tegumentos artificiais, sobre a oviposição, formação das larvas, penetração, sobrevivência, desenvolvimento larval e emergência de adultos;
- Acompanhamento da ingestão e a excreção dessas proteínas em larvas que atravessaram tegumentos artificiais contendo essas proteínas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sementes

As sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) e *Glycine max* (Soja) foram obtidas comercialmente no mercado central da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. As sementes de *Albizia lebbbeck* foram coletadas em árvores do *Campus* Leonel Brizola da UENF.

3.2 Insetos

O inseto *Callosobruchus maculatus* foi obtido a partir de colônia mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos-LQFPP da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As larvas foram mantidas em sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) armazenadas em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampas plásticas perfuradas. As sementes foram mantidas em câmaras de crescimento a temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65%. Para a manutenção das colônias, fêmeas de 2 dias de idade foram usadas para infestar novas sementes por 24 h. Após infestação as fêmeas foram descartadas e as sementes armazenadas nas mesmas condições descritas acima até a emergência dos insetos adultos. Insetos machos e fêmeas recém emergidos foram deixados juntos para acasalamento durante 2 dias. Posterior a isso as fêmeas foram usadas para novas infestações.

3.3- ENSAIOS DE TOXICIDADE PARA *C. maculatus*

3.3.1- Sementes artificiais cobertas por tegumentos artificiais

As sementes artificiais contendo tegumentos artificiais foram confeccionadas com diferentes concentrações das farinhas dos tegumentos naturais ou das proteínas ligadoras de quitina. Assim, foram usadas concentrações de 2% e 3% de farinha tegumento de *A. lebbbeck* e 10% e 25% de farinha tegumento de *G. max*. Para as frações proteicas retidas em coluna de quitina foram usadas concentrações respectivas de 6% e 25% das frações de *A. lebbbeck* e *G. max*. Para a confecção das

sementes, as diferentes concentrações das amostras foram misturadas a farinha dos cotilédones de *Vigna unguiculata* e essa mistura foi usada para a confecção dos tegumentos artificiais perfazendo um total de 20 e 30 mg. Esses tegumentos com massa de 20 e 30 mg foram confeccionados para avaliar o efeito do aumento da espessura do tegumento artificial no desenvolvimento de *C. maculatus*. A mistura foi colocada num molde cilíndrico e sobre este montante foram adicionados mais 400 mg de farinha de cotilédones de *V. unguiculata* que comporão o cotilédone artificial. Este molde foi prensado em uma prensa manual para fazer a semente artificial com massa final de 420 mg e 430 mg. Sementes controle, contendo apenas farinha de cotilédones de *V. unguiculata*, também foram confeccionadas com massas finais de 420 mg e 430 mg. Após a retirada da semente prensada do molde, as partes que não possuíam o tegumento artificial foram protegidas com parafilme e as sementes foram submetidas à infestação com as fêmeas de *C. maculatus* de dois dias de idade por 24 h. Todas as sementes dos experimentos foram feitas em triplicata. Posteriormente as fêmeas e o excesso de ovos foram retirados, sendo deixados de 3 a 4 ovos sobre cada tegumento artificial. As sementes foram incubadas a 28 °C e o desenvolvimento larval foi acompanhado diariamente em lupa até 19 dias após a oviposição (DAO). Passado esse tempo as sementes foram desfeitas e as larvas sobreviventes foram contadas e pesadas para o cálculo da mortalidade e massa corporal larval, e ainda foram usadas para experimentos posteriores. As análises estatísticas das massas corporais larvais foram realizadas utilizando o teste t de Studart do programa GraphPad Prism 5.

3.3.2- Investigações das alterações morfológicas das larvas no interior dos ovos postos sobre os tegumentos artificiais

Para o acompanhamento de possíveis alterações macroscópicas nos ovos e na formação das larvas, os ovos postos sobre os tegumentos artificiais das sementes artificiais (controle e tratado) foram observados e fotografados durante todo o período da embriogênese. Com auxílio de uma lupa e câmera fotográfica os ovos foram fotografados até a observação do início da escavação do tegumento pela larva formada no interior do ovo.

3.3.3- Marcação de proteínas do tegumento de *A. lebeck* e *G. max* com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

As proteínas com afinidade a quitina, obtidas após cromatografia, foram misturadas com uma solução contendo FITC diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) na proporção de 5 mg de FITC para 1 mg de proteína, para a realização da marcação, como descrito em Sá *et al.* (2014). Essa mistura foi então agitada levemente durante uma hora a temperatura ambiente e depois deixada em repouso por 16 h a 4 °C. Após esse período a mistura foi dialisada contra água destilada por 48 h a 4 °C para retirada do FITC não ligado. A amostra foi liofilizada e as proteínas marcadas foram usadas para a confecção de tegumentos artificiais de 20 mg como descrito no item acima. Para a preservação da fluorescência do FITC, todos os procedimentos foram realizados na ausência da luz.

3.3.4- Acompanhamento da trajetória das proteínas Marcadas com FITC no trato intestinal das larvas de *Callosobruchus maculatus*

Larvas de 19 DAO obtidas de experimentos com sementes artificiais incubadas no escuro contendo diferentes concentrações das proteicas marcadas com FITC foram retiradas das sementes artificiais e lavadas em solução salina (NaCl 250 mM) e secas com papel toalha. Inicialmente as larvas foram deixadas 10 min em lâmina escavada para defecar. As fezes foram imersas em glicerol 70% e observadas por microscopia de fluorescência. Posteriormente as larvas foram transferidas para placas de Petri, deixadas por 10 min sobre um recipiente com gelo e transferidas para uma lâmina escavada contendo 50 µL da solução salina, onde foram dissecadas a frio sob lupa estereoscópica. As larvas foram abertas por uma incisão na porção central, para extravasamento da hemolinfa e exposição do intestino e demais órgãos. A hemolinfa dispersa no volume de 50 µL de solução salina e o corpo gorduroso foram separados do trato intestinal e descartados. Já o trato intestinal dissecado foi transferido imediatamente para uma lamina de vidro contendo 20 µL de glicerol para serem observados por microscopia de fluorescência.

3.3.5 Teste de longevidade dos insetos adultos emergidos a partir de ovos ovipositados por fêmeas que se desenvolveram após a travessia dos tegumentos artificiais contendo proteínas de tegumento de *Albizia lebbbeck*

Para o teste de longevidade dos insetos foram confeccionadas sementes com tegumento artificial contendo 6% da fração proteica de ligação à quitina de *Albizia lebbbeck*. Estas sementes foram infestadas com fêmeas de *C. maculatus* e o excesso de ovos ovipositados foi retirado, como descrito anteriormente. Após a emergência dos insetos adultos (aproximadamente 30 DAO), as fêmeas foram separadas dos machos e usadas para infestação de sementes naturais de *Vigna unguicula*. Como controle do experimento, fêmeas que emergiram de sementes naturais de *V. unguiculata* também foram usadas para a infestação de sementes naturais de *V. unguiculata*. Assim, cinco fêmeas emergidas das sementes com tegumento artificial (tratado e controle) foram selecionadas e colocadas para a infestação das 23 sementes naturais de *V. unguiculata* durante 24 horas. Após a oviposição as sementes permaneceram em estufa incubadora para completar o ciclo de desenvolvimento (cerca de 30 DAO). Após a emergência dos insetos adultos o tempo de vida dos insetos foi acompanhado diariamente até a detecção da morte total dos insetos.

3.4- EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS COM AFINIDADE A QUITINA DE TEGUMENTOS DE SEMENTES

3.4.1- Extração proteica

Os tegumentos das sementes de *A. lebbbeck* e *G. max* foram separados manualmente dos seus cotilédones e acumulados. Após isso, os tegumentos de *G. max* foram triturados em nitrogênio líquido com o auxílio de grau e pistilo, enquanto os tegumentos de *A. lebbbeck* foram triturados com uso de um liquidificador doméstico comum até a obtenção de uma farinha fina. As proteínas das farinhas foram extraídas separadamente com tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 7,6 na proporção 1:10 (m/v), sob agitação por 3 h a 4 °C. Os extratos foram submetidos à centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4 °C e os sobrenadantes precipitados com sulfato de amônio 0-90% de saturação. As misturas foram deixadas em repouso durante 16h a 4 °C e submetidas a centrifugação a 10.000 x g por 30 min (4 °C). Os precipitados obtidos foram dialisados contra água destilada em membranas de diálise que excluem proteínas abaixo de 10 kDa. A diálise ocorreu durante 4 dias com 3 trocas diárias da água. Posteriormente as

amostras foram secas por liofilização, resultando nos extratos brutos proteicos de *A. lebbeck* e *G. max*.

3.4.2- Preparação da quitina

Na preparação da quitina foi utilizado o método descrito por Hackman e Goldberg (1964), onde 50 gramas de quitina (Sigma) foram misturados a 1000 mL de HCl 0,1 M, durante 24h sob agitações ocasionais. A mistura foi centrifugada a 7.500 x g por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500 mL de NaOH 0,1 M e aquecido a 100 °C por 16 h. Esse aquecimento foi repetido por mais duas vezes, e ao término a mistura foi submetida à centrifugação a 7.500 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado acidificado com 500 mL de HCl 2,0 M. O material acidificado foi submetido a diálise contra água destilada durante 48 h com 3 trocas de água diárias e centrifugado a 7.500 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (quitina) foi então usado como matriz para a montagem da coluna de afinidade à quitina.

3.4.3- Cromatografia de afinidade em coluna de quitina

A quitina, previamente preparada, foi inicialmente lavada exaustivamente com o tampão acetato de sódio 0,08 M, pH 5,0. Após a lavagem, 50 mg dos extratos brutos protéicos de *A. lebbeck* e *G. max* foram dissolvidos em 15 mL de tampão acetato de sódio 0,08 M pH 5,0 e incubados com a quitina, sob agitação moderada, por 30 min. A mistura foi transferida para a uma coluna de vidro e o material não retido foi lavado com o mesmo tampão de dissolução da amostra. As proteínas retidas na quitina foram eluídas com HCl 0,1 M, sob um fluxo de 24 mL/h, coletando-se frações de 5 mL/tubo. A absorvância das frações foi analisada a 280 nm. As frações retidas que continham proteínas foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

3.5- PERFIL PROTEICO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DOS TEGUMENTOS NATURAIS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À QUITINA

3.5.1- Eletroforese em gel poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O perfil proteico das amostras retidas em coluna de quitina foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, na presença de SDS (Laemmli, 1970). O gel de separação foi montado em placas de vidro de 10 x 13,5 cm, misturando-se: 2,3 mL de água destilada; 5,0 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%; 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 100 µL de persulfato de amônio 10 % e 4 µL de TEMED. O gel de concentração foi preparado misturando-se: 1,4 mL de água destilada; 330 µL de solução acrilamida/bis-acrilamida 30%; 250 µL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 20 µL de SDS 10%; 20 µL de persulfato de amônio 10% e 2 µL de TEMED. As amostras proteicas foram preparadas misturando 0,5 mg das frações retidas em coluna de quitina em 200 µL de tampão de amostra sendo então posteriormente aquecidas por 5 min a 100 °C. Dessa mistura, 20 µL foram aplicados no poço do gel de concentração. A corrida foi processada por aproximadamente 3 h em voltagem constante de 80 V. O gel foi corado com uma solução de Coomassie Brilhante Blue R 0,25% em metanol, ácido acético e água destilada (5:1:1 v/v/v) durante 16 h, e descorado com uma solução contendo 35% de metanol e 10% de ácido acético, em água. Como marcadores moleculares foram utilizados: Albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa).

3.5.2- Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Esses experimentos foram realizados na FIOCRUZ em colaboração com o Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e Dr. Jonas Perales. As bandas protéicas reveladas após a coloração do gel foram selecionadas de acordo com as individualizações das bandas proteicas em relação às outras e sua forte marcação no gel, recortadas, tripsinizadas e os peptídeos resultantes foram identificados através de espectrometria de massas. Neste processo as bandas protéicas foram lavadas com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min até completa descoloração. O gel foi desidratado com acetonitrila e seco por centrifugação a vácuo. As amostras foram reduzidas com DTT (Ditiotreitol),

alquiladas com iodoacetamida e desidratado novamente com acetonitrila. O solvente foi removido e as bandas reidratadas com uma solução gelada de tripsina por 16h a 37 °C. Após digestão, os peptídeos obtidos foram dessalinizados em tips do tipo C18 (ZipTip) para micropipetas. Um volume de 0,3 µL da solução peptídica foi depositado sobre a placa de aço do espectrômetro MALDI (ABI 192-target MALDI plate) e co-cristalizada com 0,3 µL de matriz α -ciano -4- ácido hidroxí cinâmico (CHCA) 10mg/mL em solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% (v/v) para análise do espectro de massas. Picos de massa com sinal de 20 ou acima (noise ratio) foram usados para pesquisa em bancos de dados (NCBI) usando-se o programa MASCOT versão 2.1 e 2.2. Para a análise dos dados também foi usado o programa Scaffold. Os dados foram considerados válidos quando mostravam *score* superior a 40.

4. RESULTADOS

4.1-Acompanhamento do desenvolvimento larval inicial do inseto *Callosobruchus maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de sementes

Sementes artificiais confeccionadas com tegumentos artificiais de 30 mg foram usadas para a análise da influência das farinhas de tegumentos de *A. lebeck* e *G. max* sobre o desenvolvimento inicial de *C. maculatus*. Após a oviposição sobre os tegumentos artificiais pelas fêmeas de *C. maculatus*, o comportamento do ovo e a formação larval inicial (dentro do ovo) foram observados diariamente. Nossos resultados mostraram não haver alterações visíveis na formação inicial das larvas ainda dentro do ovo promovidas pelos tratamentos. No 3^o DAO as larvas já se apresentavam completamente formadas sem nenhuma alteração morfológica aparente (figura 1). No 5^o DAO as larvas já haviam iniciado a escavação do tegumento e no 6^o DAO os ovos estavam completamente esbranquiçados, indicando o total preenchimento do interior destes pela farinha resultante da escavação do tegumento. Nesse período (5^o DAO) a larva já havia eclodido do ovo e cavava o tegumento em direção ao cotilédone artificial para completar o seu ciclo de vida. Além de não terem sido notadas alterações morfológicas, também não observamos atraso durante a travessia das larvas pelo tegumento, quando comparamos com as sementes controle (sem as farinhas dos tegumentos).

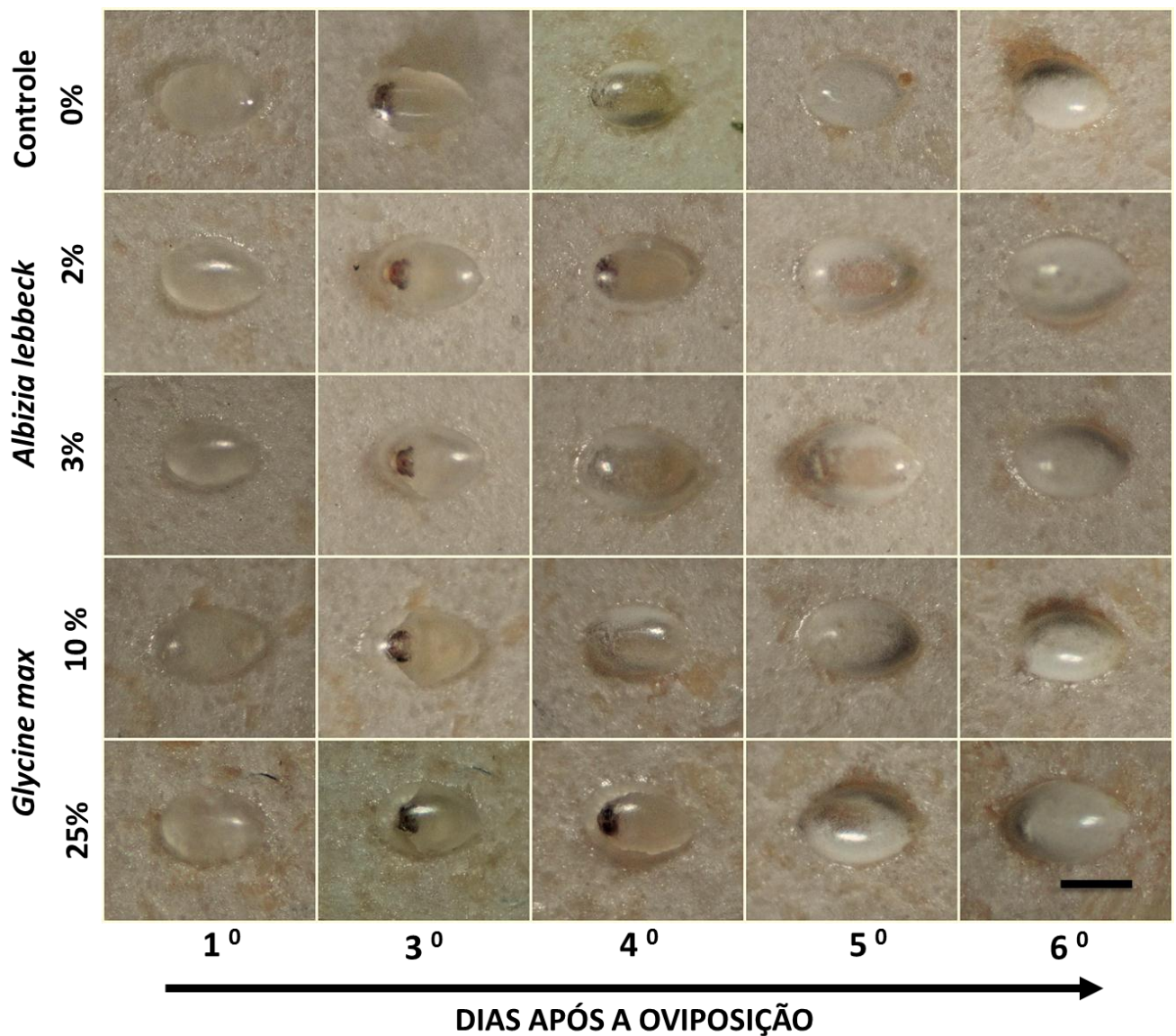


Figura 1: Fotomicrografia mostrando o desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos postos sobre os tegumentos artificiais de 30 mg de sementes artificiais do 1º ao 6º dia após a oviposição (DAO). Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. Barra= 0,5 mm.

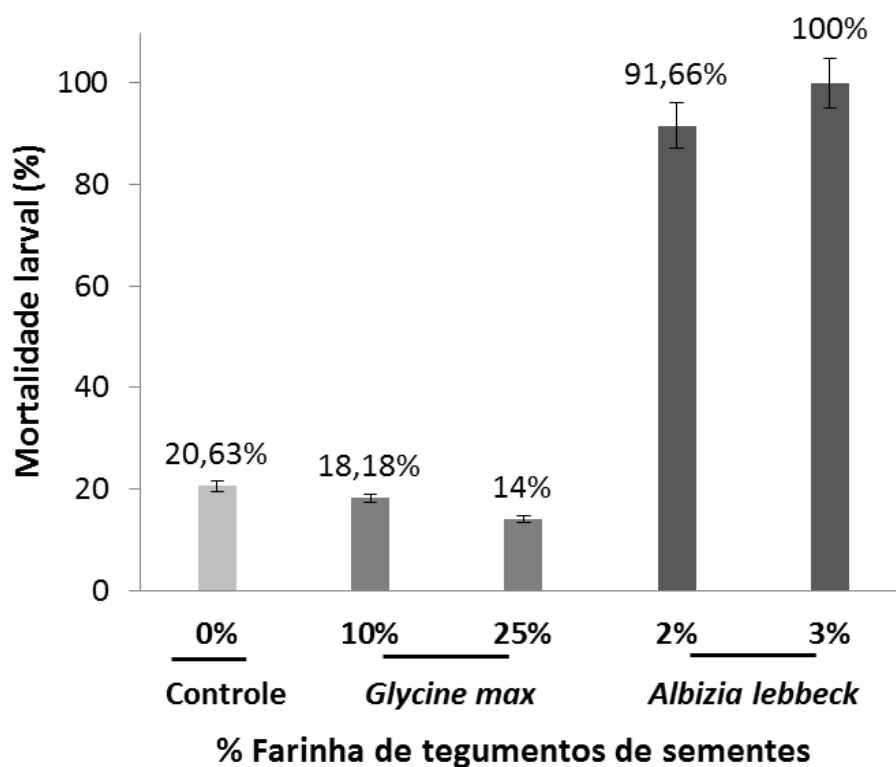
4.2- Avaliação da mortalidade larval de *C. maculatus* após a travessia dos tegumentos artificiais

A mortalidade das larvas que atravessaram os tegumentos artificiais foi analisada no 19º DAO. Nossos resultados mostraram uma mortalidade larval de 18,18% e 14% para as larvas que atravessaram o tegumento artificial contendo 10% e 25% respectivamente do tegumento de *G. max*. Essa mortalidade foi similar a observada para as larvas das sementes controle, onde os tegumentos artificiais foram compostos apenas por farinha de *V. unguiculata* (figura 2A). Para as sementes contendo a farinha de tegumento de *A. lebbeck* a mortalidade observada foi de 91,66% e 100% para as larvas que atravessaram os tegumentos artificiais com 2% e 3% respectivamente da farinha dos tegumentos (figura 2A). Na figura 2B visualizamos uma das larvas que morreram após a eclosão, durante a travessia do tegumento artificial contendo *A. lebbeck*. A casca do ovo foi retirado de sobre o tegumento e observamos uma larva minúscula, já parcialmente eclodida do ovo com o corpo parcialmente atravessado no tegumento. Na figura 2B também observamos o orifício feito no tegumento pela escavação da larva.

4.3- Avaliação da massa das larvas de *C. maculatus* após a travessia dos tegumentos artificiais

Larvas que sobreviveram à travessia dos tegumentos e continuaram o desenvolvimento nos cotilédones artificiais foram pesadas 19 DAO. As larvas que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 25% da farinha do tegumento de *G. max* tiveram uma redução na massa corporal de 43,8% quando comparadas com as larvas das sementes controle. A redução no peso corporal das larvas que sobreviveram a travessia dos tegumentos contendo 2% da farinha dos tegumentos de *A. lebbeck* foi ainda maior, aproximadamente 82,5% (figura 3). A redução de massa corporal para larvas desenvolvidas em 25% de farinha de tegumento de *G. max* foi estatisticamente significativa quando comparado ao controle (teste t de Studart; $P < 0,001$). Para os experimentos de tegumento artificial com 2% da farinha de tegumento de *A. lebbeck* não foi obtido número de larvas (n amostral) suficientes para realizar as análises estatísticas.

A



B



Figura 2: Visualização gráfica da mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO sobre tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *Glycine max* e *Albizia lebeck*. **A:** Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. **B:** Foto mostrando uma larva que morreu durante a travessia do tegumento artificial contendo 3% da farinha do tegumento de *A. lebeck*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados representam a média dos resultados.

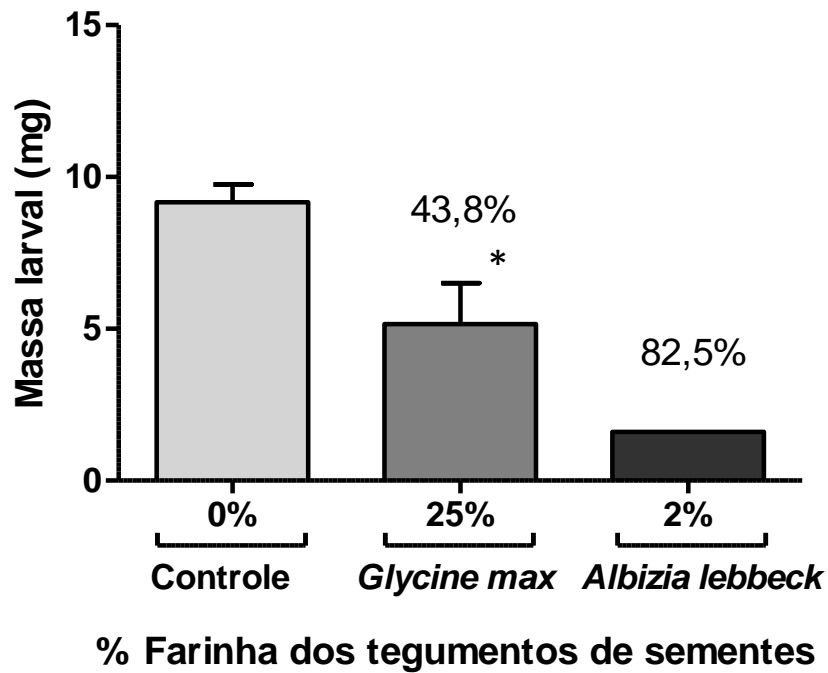


Figura 3: Visualização gráfica da massa das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais após a travessia dos tegumentos artificiais contendo farinha de tegumento de *Glycine max* e *Albizia lebeck*. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados representam a média dos resultados. * Indica resultado estatisticamente diferente do respectivo controle de acordo com o teste t de Studart ($P < 0,001$).

4.4- Isolamento e visualização das proteínas dos tegumentos com afinidade à quitina

Proteínas foram extraídas dos tegumentos de sementes de *G. max* e *A. lebbeck* e após precipitação com sulfato de amônio, as proteínas foram então fracionada por cromatografia de afinidade a quitina. Frações protéicas com afinidade a quitina foram observadas nas amostras de ambos os tegumentos e foram eluídas com HCL 0,1 M (figuras 4). Embora seja evidenciada uma alta absorbância das frações retidas em quitina em comprimento de onda de 280 nm, grande parte dessa absorbância se deve a interferência de pigmentos dos tegumentos.

As proteínas obtidas nas frações retidas em quitina de ambos os tegumentos foram então visualizadas por SDS-PAGE (figura 5). Na raia R1 encontra-se a fração proteica retida em coluna de quitina dos tegumentos de *G. max* e na raia R2 a fração dos tegumentos de *A. lebbeck*. Nossos resultados mostraram diversas bandas protéicas com variados pesos moleculares em ambas as frações. Destas proteínas com massas moleculares entre 14 e 66 kDa, as frações proteicas de aproximadamente 36 KDa e 24 kDa de *G. max* e de aproximadamente 29 kDa, 20 kDa e 14,2 kDa de *A. lebbeck* foram selecionadas, recortadas do gel com o auxílio de um bisturi e submetidas a análise por espectrômetria de massas.

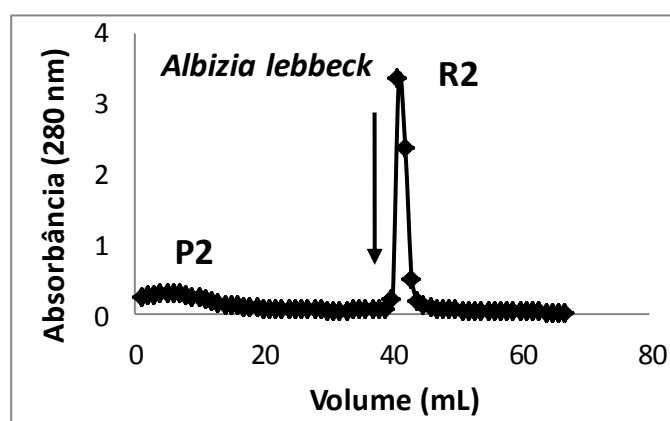
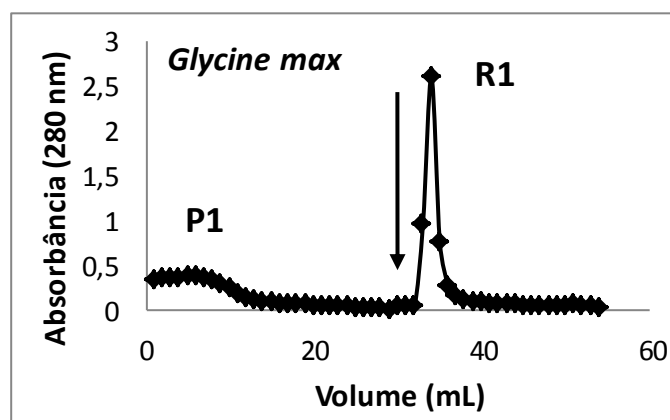


Figura 4: Cromatografia da fração proteica precipitada com sulfato de amônio (0-90%) de tegumentos naturais das sementes em coluna de afinidade à quitina. O material não retido (P1 e P2) foi eluído com o tampão acetato de sódio 0,08 M pH 5,0 e o retido em quitina (R1 e R2) foi eluído com HCL 0,1 M. Foram coletadas frações de 5 mL sob um fluxo de 1 mL/min. A seta indica o início da eluição com HCL 0,1 M. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 280 nm.

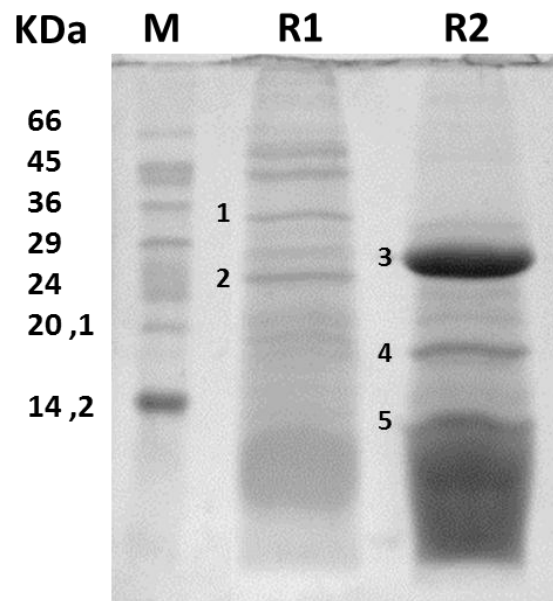


Figura 5: Visualização eletroforético do perfil proteico em gel SDS-PAGE das frações com afinidade a quitina dos tegumentos de *Glycine max* (R1) e *Albizia lebbbeck* (R2). Em R1 os números 1 e 2 indicam, respectivamente, as bandas proteicas de aproximadamente 36 e 24 kDa e em R2 os números 3, 4 e 5 indicam, respectivamente, as bandas proteicas de aproximadamente 29 kDa, 20 kDa e 14,2 kDa. Essas bandas foram as selecionadas para a análise por espectrometria de massas; M, marcador molecular (kDa). **(M):** marcador de massas moleculares em kDa. O gel encontra-se corado com Coomassie brilhante blue.

4.5- Caracterização, por espectrometria de massas, das proteínas dos tegumentos com afinidade à quitina.

As bandas proteicas recortadas do gel de poliacrilamida (figura 5) denominadas respectivamente bandas 1 e 2 (bandas proteicas de aproximadamente 36 kDa e 24 kDa de *Glycine max*) e bandas 3, 4 e 5 (bandas com massas aproximadas de 29 kDa, 20 kDa e 14,2 kDa de *A. lebbeck*) foram submetidas a hidrólise com tripsina e os peptídeos obtidos analisados em espectrômetro de massas do tipo MALDI TOF. A partir da banda 1 do tegumento de soja foram obtidos 2 peptídeos e ambos mostraram similaridades com uma quitinase da classe I de 34,3 kDa de *Glycine max* (gi351723511). Esses dois peptídeos somam 34 aminoácidos dos 320 aminoácidos totais da proteína, perfazendo 11% de cobertura (Tabela 1). A análise da banda 2 do tegumento de soja também revelou 2 peptídeos e ambos mostraram similaridades com uma proteína de 24 kDa de tegumentos de *G. max* (gi351721970). Esses dois peptídeos somam 37 aminoácidos dos 219 aminoácidos totais da proteína, perfazendo 17% de cobertura (Tabela 1).

A partir das 3 bandas proteicas recortadas do gel da fração de *A. lebbeck*, apenas um único peptídeo, idêntico para as três bandas, foi identificado. Esse peptídeo apresentou 100% de similaridade com a cadeia A da mexicaina de *Jacaratia mexicana* e 97 % de similaridade com vignaina de *Vitis vinifera*. Ambas mexicaina e vignaina são proteases do tipo cisteínicas. Esse peptídeo de 14 aminoácidos apresenta 7% de cobertura em relação aos 214 aminoácidos da mexicaina e 4% em relação aos 360 aminoácidos totais da vignaina (Tabela 2).

Tabela 1: Peptídeos detidos, por de espectrometria de massas a partir das bandas proteicas retidas em coluna de quitina do tegumento de *Glycine max*.

Sequências a partir da Banda 1 do tegumento de <i>Glycine max</i> .		
Sequence	Prob	Mascot Ion score
(R)LISSSLFDQMLK(Y)	95%	71.6
(K)ALGLDLINNPDLVATDATVSFK(T)	99%	94.8

Sobreposição dos peptídeos da banda 1 com a quitinase da classe 1 de *Glycine max*

gi|351723511 (100%), 34,342.0 Da
Precursor da quitinase classe I [*Glycine max*]
2 Peptídeos únicos exclusivo, 2 espectros únicos exclusivo, 2 espectros totais, 34/320 aminoácidos (11% cobertura)

```

MKNMKLCSVM LCLSLAFLLG ATAEQCGTQA GGALCPNRLC CSKFGWCGDT DSYCGEGCQS QCKSATPSTP TPTTPSSGGD
I SR LISSSLF DQMLK YRNDG RCGSHGFYRY DAFIAAAGSF NGFGTTGDDN TRKKEIAAFL AQTSHETTGG WASAPDGPYA
WGYCFINEQN QATYCDGGNW PCAAGKKYYG RGPIQLTHNY NYGQAGK ALG LDLINNPDLV ATDATVSFK T ALWFWMTAQG
NKPSSHVDVIT GRWTPSSADS SAGRAPGYGV ITNIINGGLE CGHGQDNRVQ DRIGFYRRYC QMMGISPGDN LDCNNQRPPFA

```


Sequências a partir da Banda 2 do tegumento de *Glycine max*

Sequence	Prob	Mascot Ion score
(R)VYGGSLTHYQSPTLEPNIYNR(W)	100%	134.3
(K)FGVYAQDGASNYMESR(W)	99%	98.6

Sobreposição dos peptídeos da banda 2 com uma proteína de 24 kDa de tegumentos de *Glycine max*

gi|351721970 (100%), 24,569.8 Da

Proteína precursora de 24 kDa de tegumentos de sementes [*Glycine max*]

2 Peptídeos únicos exclusivo, 2 espectros únicos exclusivo, 2 espectros total, 37/219 aminoácidos (17% cobertura)

```

MVPQPILHLT  LLSLIISLTT  LSLVDAADPT  FGFTPLGLSS  SSNLQIQKPY  DVAVNERYSF  SNGVHRFWVY  STDKPHMQGS
NTKPRTEIRI  AGYDYTSQVW  QFQGFYVPS  GTSGVCIQQV  FGGVTSATTS  QTRVYGGSLT  HYQSPTLEPN  IYNRWIRFNV
IHDVGANNVK  IFLNGEDNPR  YNGPGRGAST  HYFKFGVYAQ  DGASNYMESR  WRDIQIFKK

```

Tabela 2: Peptídeo detido, por de espectrometria de massas, a partir das bandas proteicas retidas em coluna de quitina do tegumento de *Albizia lebbbeck*.

Sequência a partir das Bandas 1, 2 e 3 do tegumento de <i>Albizia lebbbeck</i> .		
Sequence	Prob	Mascot Ion score
(K)NSWGPNWGEKGYIR(I)	100%	124.9
Sobreposição do peptídeo obtido das bandas 1, 2 e 3 com a cadeia A da mexicaina de <i>Jacaratia mexicana</i>		
<p>gi 116666824 (100%), 23,762.0 Da Cadeia A, Mexicaina de <i>Jacaratia mexicana</i> 1 Peptídeo único exclusivo, 1 espectro único exclusivo, 1 espectro total, 14/214 aminoácidos (7% cobertura)</p>		
<pre> Y P E S I D W R E K G A V T P V K N Q N P C G S C W A F S T V A T I E G I N K I I T G Q L I S L S E Q E L L D C E R R S H G C D G G Y Q T T S L Q Y V V D N G V H T E R E Y P Y E K K Q G R C R A K D K K G P K V Y I T G Y K Y V P A N D E I S L I Q A I A N Q P V S V V T D S R G R G F Q F Y K G G I Y E G P C G T N T D H A V T A V G Y G K T Y L L L K N S W G P N W G E K G Y I R I K R A S G R S K G T C G V Y T S S F F P I K G Y R </pre>		
Sobreposição do peptídeo obtido das bandas 1, 2 e 3 com vignaina de <i>Vitis vinifera</i>		

gi|225456820 (97%), 39,918.4 Da

Predito: vignaina [*Vitis vinifera*]

1 Peptídeo único exclusivo, 1 espectro único exclusivo, 1 espectro total, 14/360 aminoácidos (4% cobertura)

MK	RF	FF	VV	AL	S	LVL	VVG	I	VES	FDF	HQ	KE	LET	EES	LW	NLY	ER	WR	SH	HT	VSR	S	LDE	KH	KRF	NV	FK	EN	VNF	VHE	FN	KK	DE	PY	KL		
KL	NK	FAD	MT	N		HE	FR	ST	YAG	S	KVN	HHR	MFR	G	SQA	AAG	SF	MY	EK	VK	SV	PP	SV	DWR	KK	GAV	TP	IK	DQ	QG	CG	SC	WA	FS	TV	VAVE	
GI	NH	IK	TN	KL		VSL	SEQ	EL	V	CD	TSE	NQG	CN	GGL	MGY	A	FE	F	I	KE	KG	IT	TE	QSY	PY	TA	ED	G	TC	DV	SK	VNS	P	VV	SI	DGH	ETV
PP	NN	ED	ALL	K		AA	NQ	PI	SVA	I	DAG	GS	AF	QF	Y	SEG	V	FAG	R	C	G	TDL	DH	GVA	I	VGY	G	TT	LD	GT	KY	WI	VK	NSWG	TDWGENGYIR		
MK	RG	I	SA	KE	G	LC	GI	A	VE	ASY	PI	KNS	S	TNP	V	GAP	SSL	K	DEL																		

4.6- Acompanhamento do desenvolvimento das larvas de *Callosobruchus maculatus* sobre os tegumentos artificiais contendo as proteínas ligadoras de quitina

Para avaliar as possíveis influências das frações proteicas com afinidade a quitina dos tegumentos naturais de *A. lebbeck* e *G. max* foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* sobre os tegumentos artificiais de 20 mg de espessura contendo essas frações. Assim tegumentos artificiais contendo respectivamente 6% e 25% de frações proteicas obtidas de *A. lebbeck* (figura 6) e *G. max* (figura 7) foram confeccionados e submetidos a infestação. Após a oviposição foi observado que os ovos estavam bem fixados aos tegumentos artificiais das sementes. No 4º DAO nos ovos postos sobre os tegumentos contendo 6% da fração de *A. lebbeck* já eram observadas larvas formadas (figura 6). Para os tegumentos contendo 25% da fração de *G. max* as larvas completaram sua formação no interior dos ovos no 5º DAO (figura 7). Nenhuma alteração foi observada na formação larval em ambos os tegumentos artificiais, entretanto atrasos de um dia (figura 6) e de dois dias (figura 8) foram observados durante a penetração do tegumento artificial. As larvas conseguiram atravessar os tegumentos artificiais em direção ao interior das sementes respectivamente nos 7º e 8º DAO para os experimentos com *A. lebbeck* e *G. max* (figuras 6 e 7 respectivamente). Nesses dias os ovos já se encontravam completamente esbranquiçados, indicando o preenchimento do interior dos ovos com a farinha resultante da escavação das larvas em direção ao cotilédone.



Figura 6: Desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre tegumentos artificiais de 20 mg de espessura do 1º ao 7º DAO. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. O desenvolvimento larval foi acompanhado nos primeiros sete dias DAO. Barra= 0,5 mm.

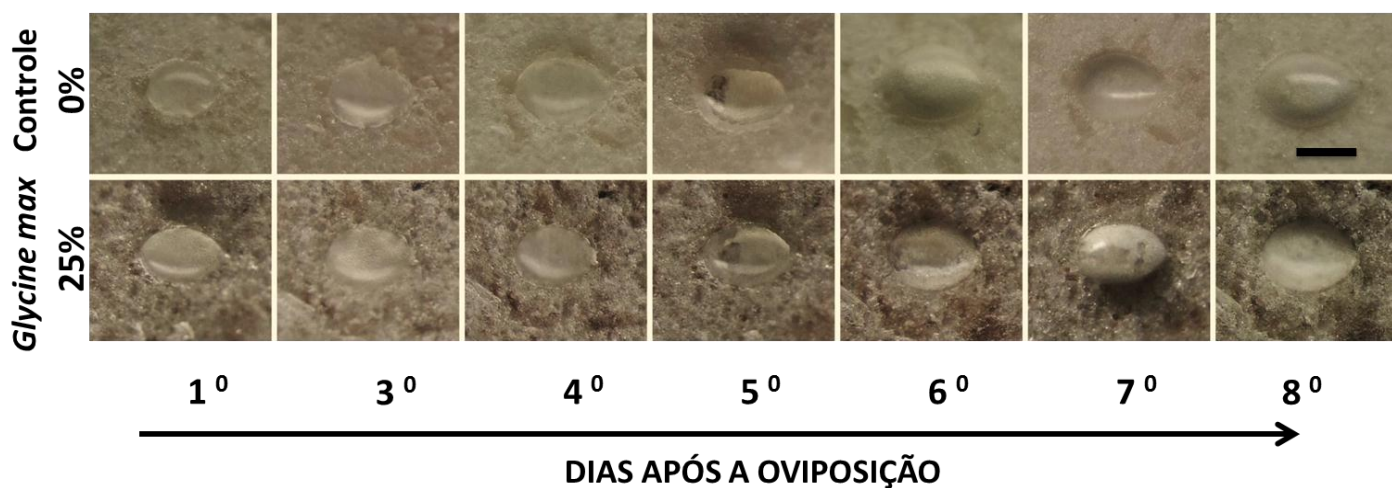


Figura 7: Desenvolvimento inicial de larvas de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre tegumentos artificiais de 20 mg de espessura do 1º ao 8º DAO. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. O desenvolvimento larval foi acompanhado nos primeiros oito dias depois da oviposição (DAO). Barra= 0,5 mm.

4.7- Avaliação da mortalidade larval de *C. maculatus* após a travessia do tegumento artificial contendo as proteínas ligadoras de quitina de tegumentos

A mortalidade larval de *C. maculatus* foi inicialmente avaliada em experimentos onde os tegumentos artificiais foram confeccionados com massa final de 20 mg. Esses tegumentos continham concentrações de 6% e 25% das frações proteicas com afinidade a quitina de tegumentos naturais de *A. lebbeck* e *G. max* respectivamente. Nossos resultados mostraram uma mortalidade de 42% para as larvas que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 6% de proteínas ligadoras de quitina de tegumentos de *A. lebbeck* (figura 8), enquanto nas sementes controle a mortalidade foi cerca de 20%. Em tegumentos artificiais contendo 25% da farinha de tegumento de *G. max* nenhuma mortalidade larval foi observada (dados não mostrados).

4.8- Avaliação da toxicidade das frações proteicas ligadoras de quitina de tegumentos sobre a massa larval

Larvas de *C. maculatus* 19 de DAO sobre os tegumentos artificiais foram retiradas dos cotilédones e pesadas. Conforme observado na figura 9, foi confirmada a toxicidade das frações proteicas ligadoras de quitina sobre a massa larval para ambos os tegumentos. As larvas que atravessaram tegumentos artificiais contendo 6% da fração proteica ligadoras de quitina isolada de tegumentos de *A. lebbeck* tiveram uma redução de 31,7% na massa corporal (figura 9A), enquanto que as larvas que atravessaram o tegumentos contendo 25% da fração proteica ligadora de quitina de tegumentos de *G. max* tiveram uma redução na massa corporal de 28% (figura 9B). As reduções na massa corporal da larva foram estatisticamente significativas quando analisadas com teste t de Studart tanto para larvas que se desenvolveram em 6% de proteínas ligadoras de quitina *A. lebbeck* ($P = 0,0376$) quanto para larvas desenvolvidas em 25% de proteínas ligadoras de quitina de *G. max* ($P = 0,0237$).

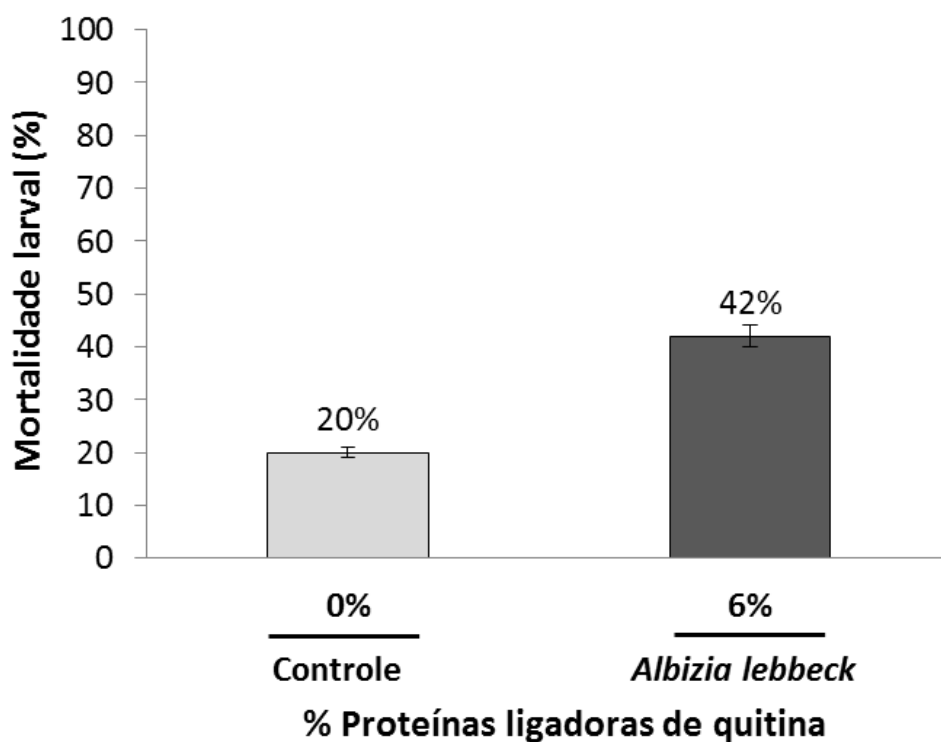


Figura 8: Visualização gráfica da mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO sobre tegumentos artificiais com 6% de proteínas de ligação à quitina de tegumento de *Albizia lebeck*. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados representam a média desses resultados.

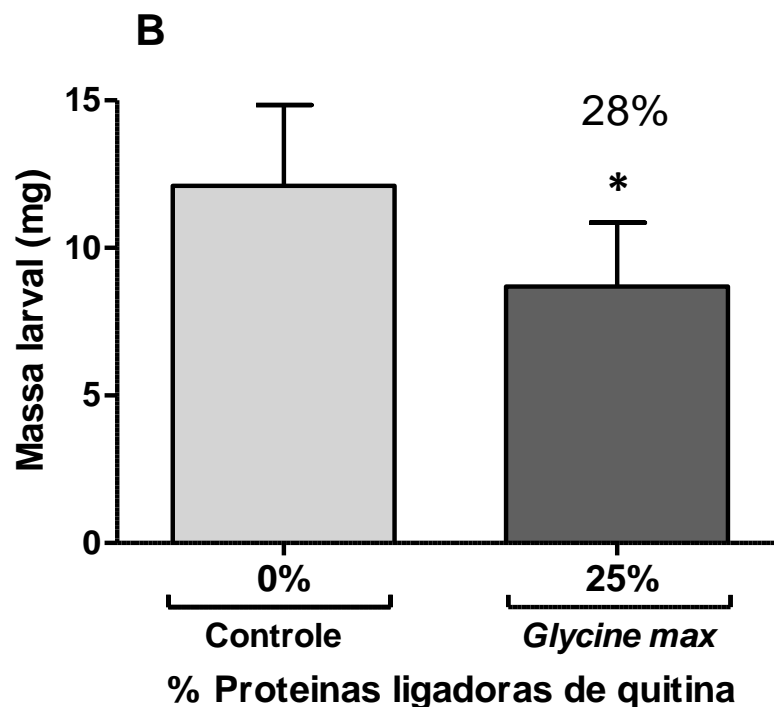
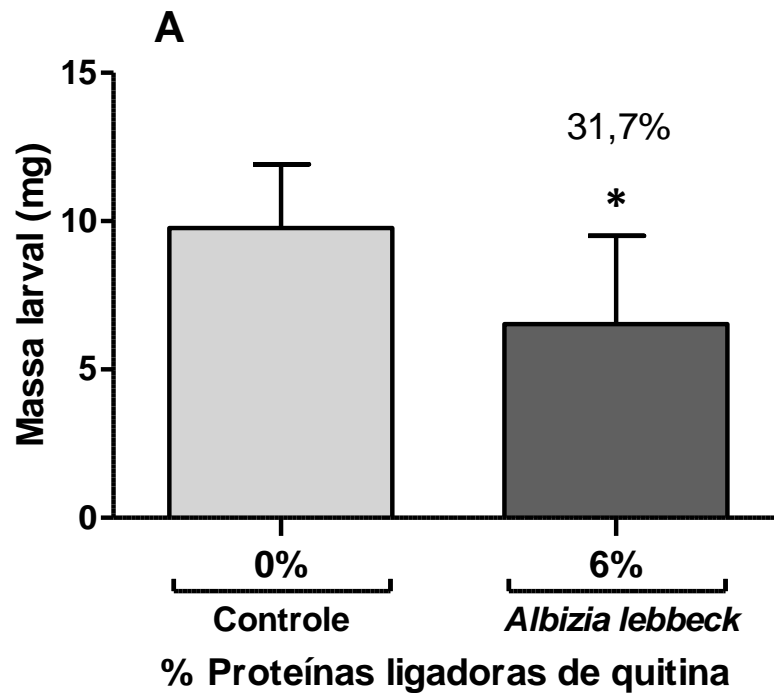


Figura 9: Visualização gráfica da massa das larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais contendo as frações proteicas ligadoras de quitina de tegumentos de *A. lebeck* (A) e *G. max* (B). Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados representam a média desses resultados. * Indica resultado estatisticamente diferente do respectivo controle de acordo com o teste t de Studart ($P < 0,05$).

4.9- Acompanhamento da ingestão e excreção de proteínas ligadoras de quitina marcadas com FITC de tegumento de *A. Lebbeck* em larvas de *C. maculatus*

Para acompanhar a trajetória das proteínas ligadoras de quitina de tegumento de *A. lebbeck* no trato digestivo das larvas de *C. maculatus*, estas proteínas foram marcadas com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e depois adicionadas a tegumentos artificiais em concentração de 6%. A presença de proteínas ligadoras de quitina marcadas foram observadas no trato intestinal e fezes das larvas de 19 DAO. Nossos resultados mostraram não haver marcação no intestino médio das larvas que se desenvolveram em sementes com tegumentos artificiais sem a fração proteica marcada (sementes controle) (figura 10A-B). Na figura 10C-D visualizamos a presença de proteínas marcadas com FITC no interior do intestino das larvas alimentadas com as proteínas marcadas, mostrando que há realmente a ingestão dessas proteínas do tegumento pelas larvas. Um dado interessante é que essas proteínas mesmo sendo ingeridas no início do desenvolvimento larval ainda permanecem no intestino das larvas 19 DAO. Quando o intestino das larvas foi submetido a lavagem com solução salina, ainda foi possível observar fluorescência, indicando uma possível retenção dessas proteínas no trato intestinal (figura 10E-F). A presença das proteínas marcadas também foi observada nas fezes das larvas 19 DAO (figura 10G-H) indicando que também há excreção desse material.

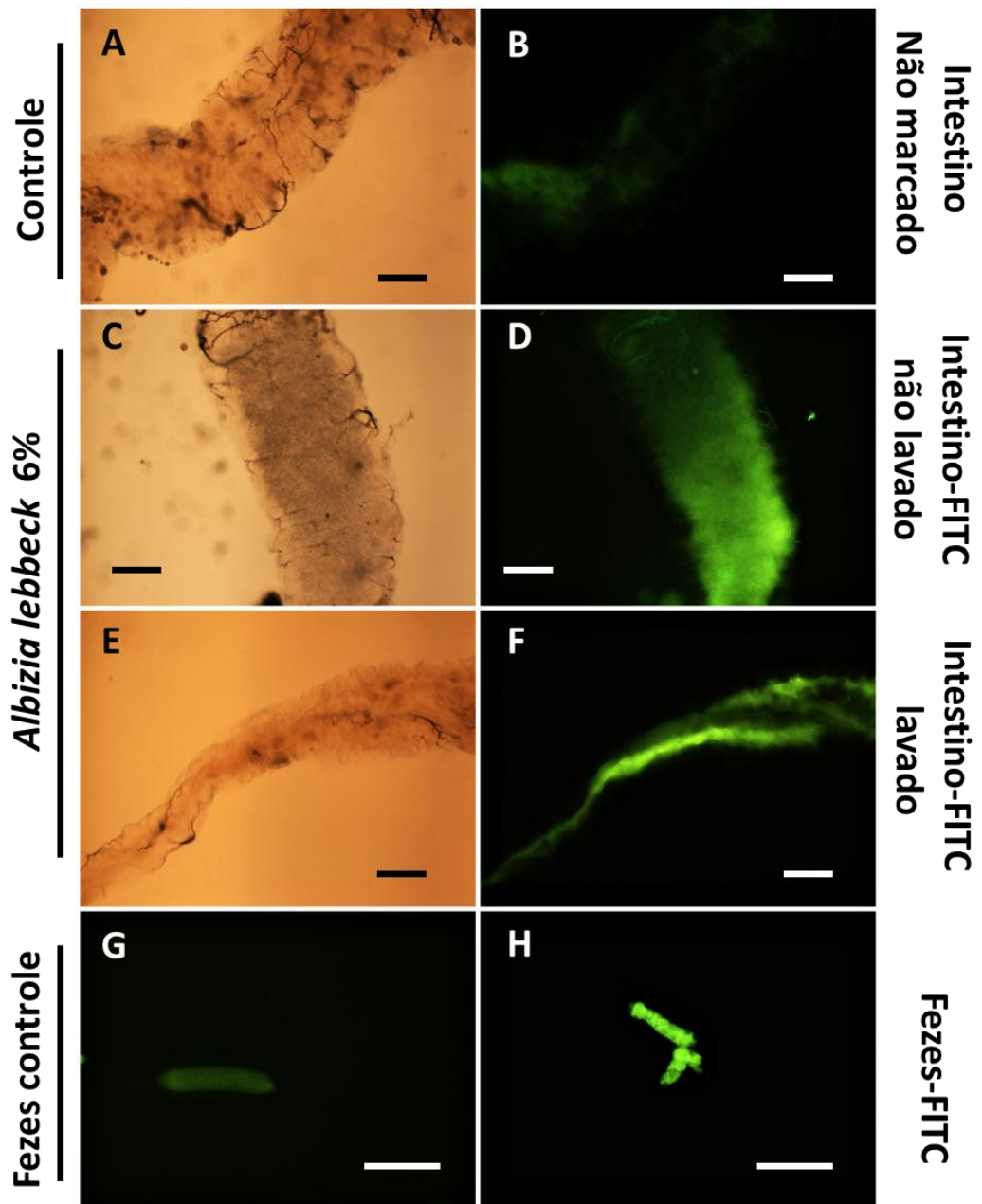


Figura 10: Fotomicrografia por microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de *Callosobruchus maculatus* aos 19 DAO que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 6 % das proteínas ligadoras à quitina marcadas com FITC. A-B: intestino de larvas 19 DAO que se desenvolveram em sementes artificiais contendo tegumentos artificiais sem proteína fluorescentes. C-D intestino não lavado de larvas que atravessaram tegumento artificial contendo 6% da fração proteica retida em coluna de quitina de tegumentos de *A. lebbeck* marcados com FITC; E-F: intestino não lavado de larvas que atravessaram tegumento artificial contendo 6% da fração proteica retida em coluna de quitina de tegumentos *A. lebbeck* marcados com FITC. G: Fezes de larva controle. H: Fezes de larvas que atravessaram tegumento artificial contendo 6% da fração proteica retida em coluna de quitina de tegumentos *A. lebbeck* marcados com FITC. A,C e E,: Campo claro; B, D e F: Fluorescência no intestino; G e H: Fluorescência nas fezes; Barras = 100 µm.

4.10- Acompanhamento da ingestão e excreção de proteínas ligadoras de quitina de tegumento de *G. max* em larvas de *C. maculatus*

Proteínas ligadoras de quitina de tegumentos de *G. max* foram marcadas com FITC e incorporadas em concentração de 25% em tegumentos artificiais. A trajetória dessas proteínas foi acompanhada no trato digestivo e fezes de larvas de *C. maculatus* 19 DAO. A presença das proteínas marcadas com FITC foi observada em todas as porções do intestino, mesmo após a lavagem e ainda nas fezes das larvas (Figura 11). Na figura 11A-B, observamos um pouco de autofluorescência no bolo alimentar das larvas controle. Na figura 11C-D observamos que a fluorescência ainda permanece no intestino após lavagem com solução salina, essa fluorescência mostrou intensidade similar ao intestino não lavado (11E-F). A fluorescência está presente tanto na região posterior (11G-H) como na região anterior do trato digestivo da larva (11I-J). As fezes dessas larvas também mostraram fluorescência bem maior (figura 11L) quando comparadas com as fezes controle (figura 11K).

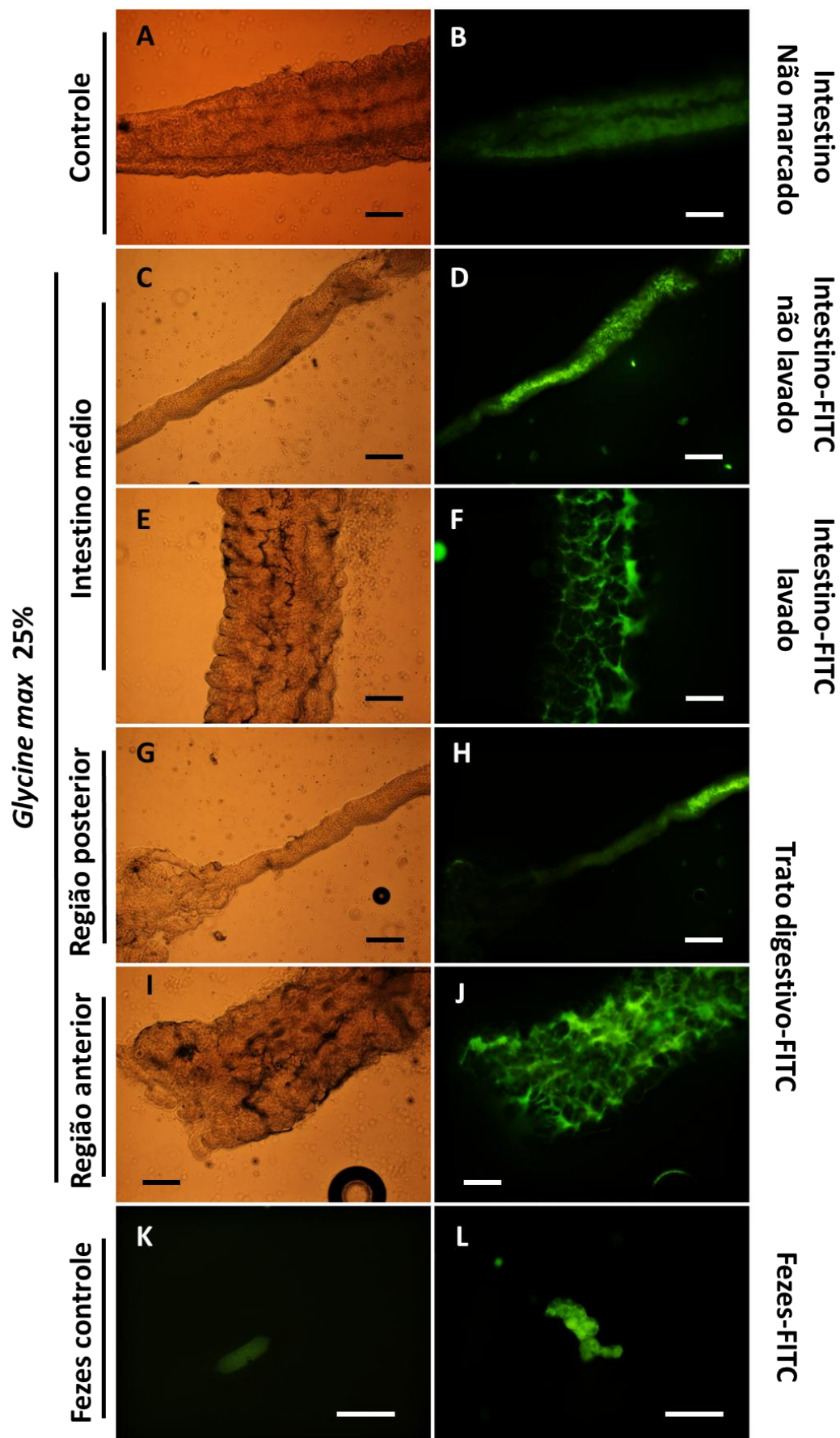


Figura 11: Fotomicrografia por microscopia de fluorescência de intestinos e fezes de larvas de *Callosobruchus maculatus* 19 DAO que atravessaram os tegumentos artificiais contendo 25% das proteínas ligadoras à quitina marcadas com FITC. A-B: Trato intestinal de larvas 19 DAO que se desenvolveram em sementes artificiais com tegumentos artificiais sem proteína fluorescente; **C-D e E-F:** intestino de larvas que se desenvolveram após atravessarem tegumentos artificiais contendo 25% de proteína ligadora de quitina de tegumento de *G. max* marcadas com FITC; **G-H:** Região posterior do trato intestinal; **I-J:** Região anterior do trato digestivo; **K-** Fezes das larvas controle; **L:** Fezes das larvas que atravessaram os tegumentos fluorescentes. **A,C,E,G-I:** Campo claro; **B,D,F,H-J:** Fluorescência no trato digestivo; **K e L:** Fluorescência nas fezes; Barras = 100 µm.

4.11- Avaliação da longevidade dos insetos adultos desenvolvidos a partir de ovos ovipositados por fêmeas que se desenvolveram após a travessia dos tegumentos artificiais contendo proteínas de tegumento de *A. lebbeck*

Para acompanhar a longevidade dos insetos adultos nascidos de fêmeas que se desenvolveram em sementes artificiais com tegumentos artificiais (20 mg) contendo 6% das proteínas ligadoras de quitina de tegumento de *A. lebbeck* foi feito o acompanhamento do tempo de vida dos insetos até todos os insetos se encontrarem mortos. Os resultados mostraram que no 30 DAO (1º dia após a emergência) o número de adultos emergidos foram contados e nossos resultados mostraram a presença de 39 insetos adultos emergidos das sementes infestadas com as fêmeas nascidas das sementes artificiais, enquanto das sementes controle emergiram 66 insetos adultos. Passados sete dias após a emergência (37 DAO) foi observado que todos os insetos emergidos dos ovos postos pelas fêmeas tratadas estavam mortos, enquanto dos insetos oriundos das sementes controle ainda observávamos cerca de 30 insetos vivos. No 14º dia após a emergência 11 insetos controle ainda permaneciam vivos. 19 dias após a emergência (49 DAO) todos os insetos estavam mortos (figura 12).

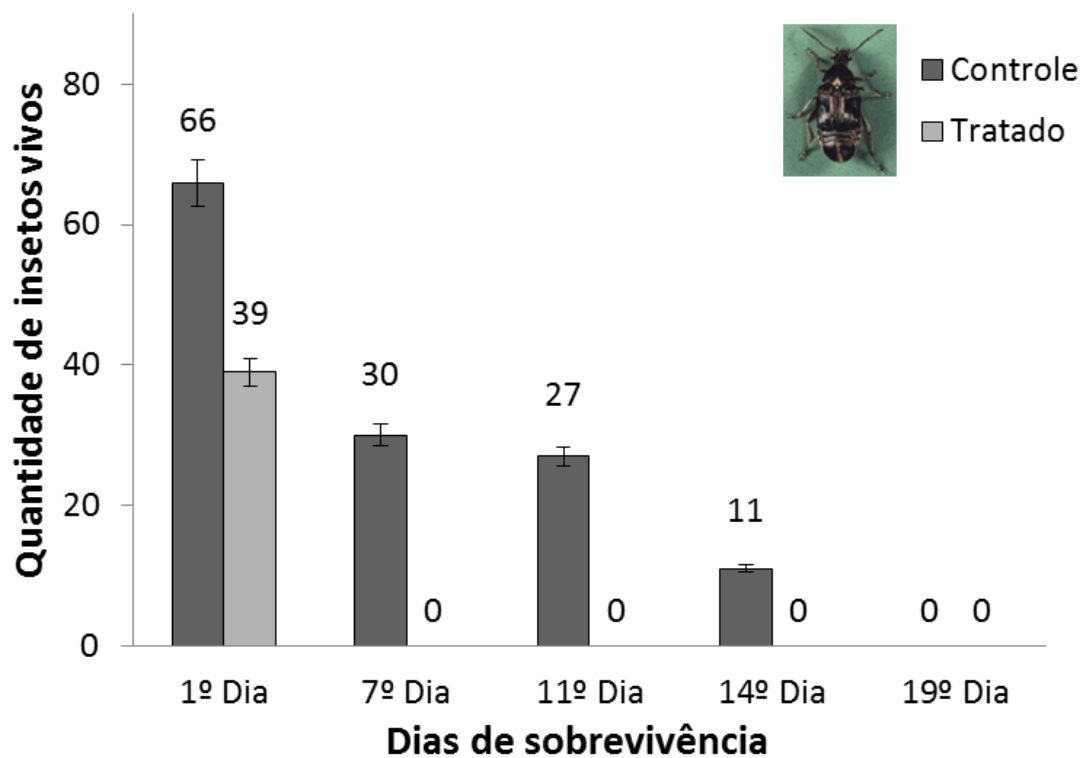


Figura 12: Visualização gráfica da longevidade dos insetos de *Callosobruchus maculatus* provenientes de fêmeas nascidas de sementes artificiais com tegumentos artificiais contendo proteínas ligadoras de quitina de *Albizia lebbek*. A longevidade foi acompanhada a partir do 30 DAO (1º dia de emergência) até 49 DAO (19 dias após o início da emergência).

4.12-Influência da espessura do tegumento artificial sobre o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*

Para avaliarmos se a espessura do tegumento artificial influenciaria no desenvolvimento de *C. maculatus*, confeccionamos tegumentos artificiais mais espessos, com uma massa final de 30 mg, ao invés de 20 mg. A esses tegumentos foram adicionados 25% da fração proteica ligadora de quitina de tegumento de *G. max*, visto que essa fração nessa concentração havia se mostrado menos tóxica que 6% da fração de *A. lebeck*. Todos os tempos analisados e parâmetros de desenvolvimento foram feitos seguindo a mesma metodologia dos experimentos com tegumentos artificiais menos espessos (com massa final de 20 mg). Nossos resultados mostraram que no 3º DAO as larvas desenvolvidas sobre os tegumentos controle ou contendo 25% da fração de *G. max* já se encontravam formadas no interior dos ovos. No 6º DAO as larvas controle completaram a travessia pelo tegumento artificial enquanto que grande parte das larvas sobre o tegumento artificial contendo a fração de *G. max* encontravam-se mortas no interior dos ovos (figura 13).

4.13- Avaliação da mortalidade larval de *C. maculatus* após atravessar tegumento artificial mais espessos contendo 25% de fração proteica ligadora de quitina de tegumentos de *G. max*

Uma nova avaliação da mortalidade larval de *C. maculatus* foi realizada utilizando agora esses tegumentos mais espessos. Nossos resultados mostraram uma mortalidade de 90% das larvas nos experimentos com a fração ligadora de quitina de *G. max*, enquanto nas sementes controle a mortalidade larval foi de apenas 18,1% (figura 14).

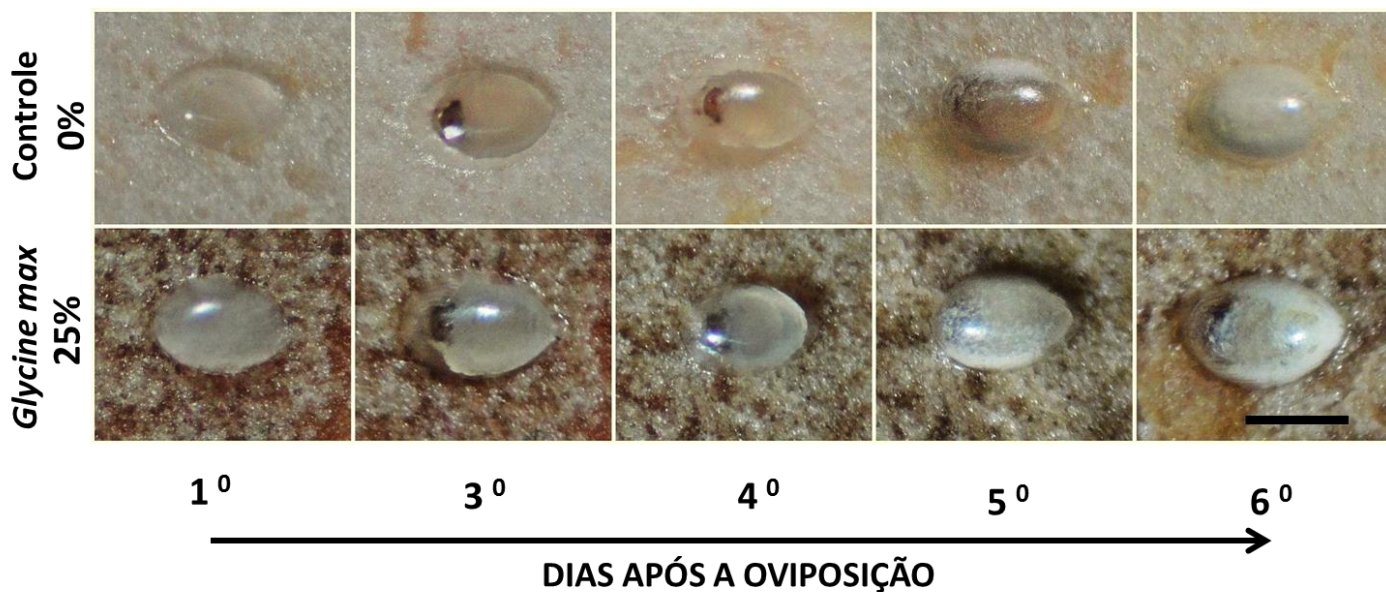


Figura 13: Desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus* dentro dos ovos ovipositados sobre 30 mg de tegumentos artificiais de semente do 1º ao 6º DAO. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. O desenvolvimento larval foi acompanhado nos primeiros seis dias depois da oviposição (DAO). Barra= 0,5 mm.

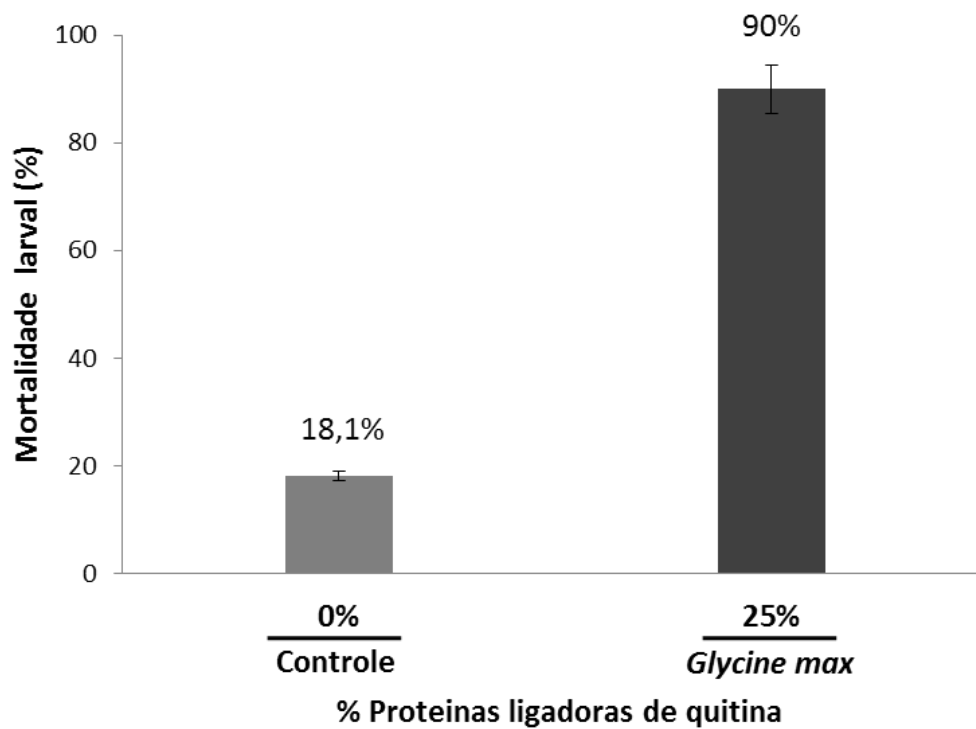


Figura 14: Visualização gráfica da mortalidade larval de *Callosobruchus maculatus* após 19 DAO pelas fêmeas em experimentos com 30 mg de tegumentos artificiais. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédono de *Vigna unguiculata*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados representam a média desses resultados.

4.14- Avaliação da toxicidade das proteínas ligadoras de quitina de tegumentos de *G. max* no desenvolvimento das larvas quando incorporadas em tegumentos mais espessos

As Larvas que sobreviveram a travessia desses tegumentos mais espessos contendo 25% da fração ligadora de quitina de *G. max* foram retiradas das sementes artificiais 19 DAO e pesadas. Observamos que as larvas que atravessaram os tegumentos artificiais contendo a fração proteica de *G. max* tiveram uma redução da massa corporal em 87,18% (figura 15) confirmando as propriedades tóxicas dessas proteínas quando em tecidos mais espessos. Como a mortalidade larval foi muito alta o n amostral (nº de larvas) não foi suficiente para a realização das análises estatística.

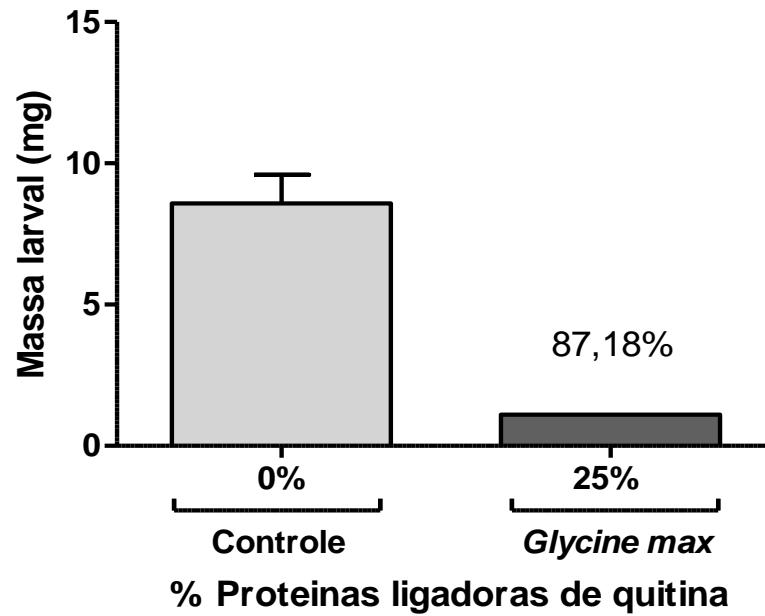


Figura 15: Visualização gráfica da massa das larvas de *C. maculatus* 19 DAO desenvolvidas em sementes artificiais cobertas com 30 mg de tegumento artificial com fração proteica ligadora de quitina de tegumentos de *G. max*. Sementes controle (0%) foram confeccionadas usando a farinha de cotilédone de *Vigna unguiculata*. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados representam a média desses resultados.

5. DISCUSSÃO

Sementes de plantas constituem uma das principais fontes alimentícias da população mundial, sendo assim uma importante fonte lucrativa para a economia de diversos países (Duranti e Gius, 1997). Anualmente, o potencial de sua comercialização e consumo tem sido altamente prejudicado devido a constantes ataques de predadores aos grãos armazenados, que diminuem e/ou inviabilizam o uso dessas sementes para consumo e comercialização (Fazolin *et al.*, 2009).

O inseto *C. maculatus* representa um importante inseto praga de grãos armazenados do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). O consumo da massa dessas sementes pelas larvas do inseto reduz o peso das sementes, compromete seu vigor germinativo e compromete sua qualidade nutricional e comercial. Esse ataque pode comprometer até 90% das sementes num período de seis meses (Almeida *et al.*, 2004).

O desenvolvimento pelas plantas de um sofisticado mecanismo de defesa para se protegerem dos constantes estresses bióticos e abióticos tem permitido a sua sobrevivência. Estas plantas depositam em suas sementes de modo constitutivo, compostos químicos, como proteínas que atuam como barreira de defesa contra pragas e patógenos (Xavier-Filho, 1993; Mithofer e Boland, 2012). Esses compostos podem ainda participarem em respostas induzidas pela agressão. Trabalhos têm descrito as importantes propriedades tóxicas exercidas por estas proteínas contra o desenvolvimento de pragas e patógenos (Oliveira *et al.*, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Muitas dessas proteínas possuem afinidade à quitina, podendo esta afinidade estar relacionada aos seus mecanismos de toxicidade contra agressores que possuem quitina como constituinte estrutural. Dentre as proteínas de afinidade a quitina, destaca-se as proteínas que possuem um sítio clássico de ligação à quitina com uma sequência de 30 a 43 aminoácidos, rico em glicinas e cisteínas. Outras proteínas que também se ligam a quitina não apresentam esse sítio clássico de ligação, mesmo assim são capazes de se ligar fortemente a esse polímero (Beintema, 1994).

A participação dos tegumentos de sementes como barreira de defesa tem sido descrita, e a participação de compostos químicos nessa barreira tem sido relatada por muitos trabalhos (Janzen, 1977; Thiery, 1984; Oliveira *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012). Estes trabalhos têm

comprovado que não só os cotilédones das sementes são capazes de armazenar proteínas de defesa de maneira constitutiva, mas também os tegumentos.

Neste estudo, investigamos a eficiência dos tegumentos como barreira de proteção contra *C. maculatus*. Isolamos e caracterizamos proteínas com afinidade à quitina presentes nos tegumentos de sementes de *A. lebeck* e *G. max* e investigamos a eficiência dessas proteínas como barreira química de proteção contra a penetração das larvas de *C. maculatus* quando incorporadas em tegumentos artificiais.

Através de experimentos com sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais com diferentes concentrações de farinha de tegumentos naturais de *A. lebeck* e *G. max*, observamos que estas farinhas não interferiram no desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, além de não ocasionarem atrasos na penetração da larva nos cotilédones artificiais (figura 1). Inibição da oviposição nos tegumentos artificiais também não foi observada. Embora não tenhamos visualizado interferências do tegumento artificial contendo as farinhas de *G. max* e *A. lebeck* na oviposição ou no tempo de travessia pelo tegumento, trabalhos similares realizados com tegumentos de *Phaseolus vulgaris* reduziam em 48% a oviposição pelas fêmeas de *C. maculatus* e aumentaram o tempo da penetração das larvas em 83% (Sá *et al.*, 2014). Ainda neste trabalho foi observado que nenhum efeito ocorria nos principais eventos da embriogênese do inseto dentro dos ovos postos sobre estes tegumentos (Sá *et al.*, 2014), resultados também observados no nosso trabalho (figura 1). Anteriormente, nosso grupo havia demonstrado um alto percentual de mortalidade de larvas neonatais de *C. maculatus* no interior dos ovos ovipositados sobre tegumentos naturais de *Canavalia ensiformis* e *Dioclea altissima* em sementes artificiais, ocorrendo ainda problemas na aderência dos ovos postos sobre estes tegumentos (Souza *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostraram não haver atraso na embriogênese e no tempo de penetração das larvas sobreviventes em experimentos com *G. max* e *A. lebeck*, contudo verificamos uma alta mortalidade das larvas após a travessia do tegumento artificial contendo 2% e 3% da farinha de tegumentos de *A. lebeck* (figura 2A) indicando que o contato das larvas com essa farinha durante a travessia do tegumento impede a sobrevivência. Essa mortalidade foi de 100% em tegumentos contendo 3% dessa farinha (figura 2A-B).

A mortalidade larval observada na tentativa de perfuração do tegumento artificial pode estar diretamente relacionada à presença de compostos químicos tóxicos que podem ter sido ingeridos pela larva durante a escavação. Souza *et al.*, (2011) ao investigar os efeitos de diferentes tegumentos de sementes não hospedeiras para *C. maculatus* demonstrou que tanto tegumentos de sementes domesticadas como de sementes silvestres podem ser extremamente tóxicos para o inseto. Nesse trabalho os autores não observaram diferenças nas propriedades físicas desses tegumentos, como espessura, textura ou coloração, que justificassem as diferenças na toxicidade. Portanto os autores sugeriram que diferenças na composição desses tecidos justificam essas diferenças na toxicidade (Souza *et al.*, 2011).

As larvas de *C. maculatus* que atravessaram os tegumentos artificiais possuindo respectivamente 2% e 25% das farinhas de tegumento de *A. lebeck* e *G. max* mostraram consideráveis reduções em suas massas (figura 3). Essas reduções foram de 82,5% para larvas que se desenvolveram em sementes artificiais com a farinha do tegumento de *A. lebeck* e de 43,8% para larvas que se desenvolveram em sementes artificiais com a farinha do tegumento de *G. max* (figura 3). Anteriormente, Oliveira *et al.* (2009) observaram que as poucas larvas que conseguiram sobreviver a travessia dos tegumentos de alguns cultivares de *G. max*, tinham reduções de mais de 30% no seu peso após 20 dias de desenvolvimento. A incorporação da farinha desses tegumentos na dieta do inseto mostrou ainda WD_{50} (dose que reduz a massa larval para 50%) em torno de 1,5% (Oliveira *et al.*, 2009).

Tendo observado toxicidade das farinhas de tegumentos sobre o desenvolvimento das larvas do inseto *C. maculatus*, partimos então para a identificação de compostos químicos presentes nessas farinhas. Para isso, realizamos uma extração proteica seguida por precipitação com sulfato de amônio e a fração obtida foi fracionada em cromatografia de afinidade a quitina (figura 4). As frações retidas na coluna de quitina foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, onde diversas bandas com massas moleculares entre 14 kDa e 66 kDa foram visualizadas (figura 5). As bandas protéicas majoritárias da fração proteica de *G. max* e da fração proteica de *A. lebeck* foram recortadas e submetidas a análise por espectrometria de massas.

Duas bandas protéicas foram recortadas do gel da fração de *G. max*, com massas moleculares aproximadas de 36 kDa (banda 1) e 24 kDa (banda 2). Dois

peptídeos oriundos da hidrólise da banda 1 foram obtidos e ambos mostraram similaridades com uma quitinase da classe I de 34,3 kDa de *G. max* (gi351723511). A partir da banda 2 também obtivemos dois peptídeos, ambos similares a uma proteína de 24 kDa de tegumentos de *G. max* (gi351721970) ainda sem função definida (Tabela 1). A caracterização de uma quitinase da classe I com peso molecular de 32 kDa de tegumentos de *G. max* já foi previamente relatada por Gijzen *et al.* (2001). Neste trabalho os autores sugerem que a presença dessa quitinase nos tegumentos de *G. max* esteja associada a defesa da planta contra à infecção por agentes patogênicos. Foi mostrado também que esta quitinase possui um peptídeo sinal de 23 aminoácidos seguido por um domínio de ligação a quitina e um domínio catalítico contendo dois resíduos conservados de Glu, necessários para a atividade catalítica desta classe de hidrolases (Gijzen *et al.*, 2001).

As bandas com massas aproximadas de 29 kDa, 20 kDa e 14,2 kDa de *A. lebeck* também foram analisadas. A partir das 3 bandas apenas um único peptídeo, (idêntico para as três bandas) foi identificado e apresentou 100% de similaridade com a cadeia A da mexicaina de *Jacaratia mexicana* e 97 % de similaridade com vignaina de *Vitis vinífera* (Tabela 2).

A mexicaina é uma protease cisteínica que foi descrita pela primeira vez por Castaneda-Agulló *et al.* (1945) isolada do latex da planta tropical *Pileus maxicanus* (também chamada *Jacaratia mexicana*). Pertence a família da papaína e mostra alta similaridade de sequência com a protease cisteínica de *Carica candamarcensis* (73,8%) e para quimopapaína de *Carica papaya* (69,42%). Posteriormente, outros trabalhos mostraram que o produto chamado mexicaina era na verdade composto por pelo menos cinco proteases, denominados de PI a PV, com pesos moleculares e pontos isoelétricos semelhantes. Assim a fração mais abundante, a protease IV, foi chamada mexicaina (Oliver-Salvador *et al.*, 2004; Ramos-Martínez *et al.*, 2012). Uma alta atividade proteolítica sobre caseína, hemoglobina e gelatina foi visto para a mexicaina, e quando comparada a outras proteases cisteínicas, a mexicaina mostrou estabilidade a altas temperaturas e variações de pH para sua atividade (Gavira *et al.*, 2007).

Vignaina (*Vignain*) é uma endopeptidase cisteínica da família da papaína que foi primeiramente identificada e caracterizada por Kembhavi *et al.* (1993) a partir de sementes de *Vigna aconitifolia*. Associada aos processos germinativos da semente, a vignaina foi visualizada em gel de poliacrilamida como uma única banda proteica

de 27 kDa e quando posteriormente foi caracterizada, apresentou uma atividade ótima em pH 7,4 e uma forte inibição por inibidores E-64 (Kembhavi *et al.*, 1993).

Embora nenhuma atividade contra insetos tenha sido descrita anteriormente para a mexicaina e vignaína, os dados obtidos no nosso trabalho mostraram que 6% da fração proteica contendo essas proteínas foi tóxica para o inseto *C. maculatus* ocasionando uma mortalidade larval de 42% (figura 8) e uma redução de 31,7% da massa corporal larval (figura 9A).

As proteases cisteínicas são uma classe de proteases que possuem um resíduo de cisteína localizado no seu centro ativo. Estas enzimas são amplamente distribuídas nos organismos vivos, são encontradas desde os vírus até os mamíferos, sendo bem abundantes em plantas (Priolo *et al.*, 2000). Em plantas, as proteases cisteínicas participam de diversas funções como no processamento e degradação de proteínas de reserva nas sementes, na morte celular programada, no “turnover” protéico, na senescência em flores e folhas, estando ainda envolvidas nas respostas a estresses bióticos e abióticos (Solomon *et al.*, 1999; Asp *et al.*, 2004).

Na defesa de plantas, a participação de proteases tem sido observada em resposta ao ataque de microorganismos. Uma proteínase de 69 kDa denominada P69 foi induzida e acumulada nas plantas de tomate em resposta ao ataque de patógenos (Tornerio *et al.*, 1996). Uma protease cisteínica chamada bromelaina, obtida do caule do abacaxi (*Ananas comosus*) se mostrou altamente tóxica, inibindo em 90% o crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides* (López-García, *et al.*, 2012). Foi visto também que genes de proteases cisteínicas em planta de batata eram expressos precocemente na presença do oomiceto *Phytophthora infestans* (Avrova *et al.*, 1999). Liu *et al.* (2001) sugeriu a participação do gene GmMMP2, que codifica uma metaloproteínase de soja, na resposta de defesa da soja contra infecções patogênicas. Neste trabalho foi observado que os níveis de transcrição do gene GmMMP2 aumentavam rapidamente durante as interações dos tecidos de soja com o oomiceto patogênico *Phytophthora sojae* e com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae*. A expressão desse gene também foi ativado em respostas a ferimentos e a estresse hídrico como desidratação. No latex de mamão papaia (*Carica papaya*) proteases cisteínicas mostraram-se bastante tóxicas inibindo o crescimento de insetos da ordem Lepidoptera (Konno *et al.*, 2004).

A propriedade de ligação à quitina de proteínas tem sido relacionada aos mecanismos de defesa vegetal há décadas. Foi visto que vicilinas de sementes de

Vigna unguiculata possuíam a capacidade de se ligar a membrana peritrófica do inseto *Diatraea saccharalis* e essa ligação foi relacionada a interferência dessas proteínas com a taxa de sobrevivência do inseto (Mota *et al.*, 2003). Foi visto ainda que estas vicilinas ligavam-se a estruturas contendo quitina presentes no intestino do inseto *Tenebrio molitor* (Paes *et al.*, 2008). Vicilinas ligadoras de quitina de sementes de *Enterobium contortisiliquum* quando adicionadas na dieta dos insetos *C. maculatus* e *Zabrotes subsfasciatus* causando 50% de mortalidade em concentrações de 1,1% e 0,43% (Moura *et al.*, 2007). Em 2009, foi observado que peptídeos oriundos da hidrólise proteolítica de vicilinas de *V. unguiculata*, que mantinham sua capacidade de ligação à quitina, mantinham suas propriedades tóxicas para *C. maculatus*, reduzindo em 86% a massa corporal das larvas. Esses peptídeos também foram tóxicos para fungos, inibindo o crescimento em 84% do *Fusarium oxysporum*, 73% do *Colletotrichum musae* e 61% do *Saccharomyces cerevisiae* (Uchôa *et al.*, 2009). Vicilinas isoladas do tegumento de sementes de *Albizia lebbek* também apresentaram capacidade de ligação à quitina e foram tóxicas para *C. maculatus*. A adição de 0,1% dessas proteínas na dieta do inseto ocasionou uma redução de 78% na massa corporal das larvas (Souza *et al.*, 2012).

Ensaio para a análise da toxicidade da fração proteica contendo a quitinase da classe I de tegumento *G. max* também foram realizados, inicialmente com tegumentos artificiais formados com massa final de 20 mg contendo 25% da fração. Nossos resultados mostraram não haver alterações morfológicas no desenvolvimento das larvas (figura 7) ou na mortalidade larval (dados não mostrados) durante a travessia do tegumento. Entretanto, as larvas apresentaram 28% de redução na massa corporal no 19 DAO (figura 9B). Para analisarmos se a espessura do tegumento artificial alteraria a toxicidade para o inseto, tegumentos com massa final de 30 mg foram confeccionados contendo também 25% da fração. Os resultados obtidos mostraram uma mortalidade larval de 90% (figura 14) e redução em 87,18% da massa corporal das larvas 19 DAO (figura 15). Foi visto ainda que muitas larvas morreram no interior dos ovos após iniciarem a escavação do tegumento (figura 13).

A presença de compostos tóxicos nos tegumentos de *G. max*, capazes de inibir o desenvolvimento de larvas do inseto *C. maculatus* e o crescimento de fungos fitopatogênicos já havia sido descrita pelo nosso grupo (Santos *et al.*, 2008). Estudo com tegumentos naturais de sete cultivares diferentes de *G. max*, realizado pelo

nosso grupo mostrou não haver nenhuma correlação entre espessura, coloração ou textura dos tegumentos com a habilidade da larva de *C. maculatus* em atravessá-los ou não. A redução na oviposição alcançou até 100% dependendo do cultivar. A eclosão larval também foi afetada, chegando a 82.5% de redução (Oliveira *et al.*, 2009). Já em plantas transgênicas, Ding *et al.* (1998) observaram que plantas expressando quitinase reduziram significativamente a sobrevivência e o crescimento das larvas de *Heliothis virescens*. Nishizawa *et al.* (1999) observaram o aumento da resistência de plantas de arroz, expressando gene de quitinases classe I, contra o patógeno *Magnaporthe grisea*.

A trajetória dessas frações com propriedades de ligação a quitina pelo trato digestivo das larvas de *C. maculatus* também foi avaliada no nosso trabalho (figuras 10 e 11). Para isso foram confeccionadas sementes com tegumentos artificiais contendo as proteínas com afinidade a quitina isoladas do tegumento de *G. max* e *A. lebeck* marcadas com FITC. Os resultados mostraram que estas proteínas encontram-se presentes no interior do trato intestinal dessas larvas, mesmo após a lavagem com solução salina (figuras 10E-F e 11C-D). Marcação também foi detectada nas fezes do inseto (figuras 10G-H e 11K-L). Estes resultados mostram claramente que as proteínas com afinidade a quitina dos tegumentos foram ingeridas pelas larvas no momento em que elas atravessavam o tegumento artificial e que embora estejam sendo excretada junto com as fezes, parte das proteínas ainda permanecem no trato digestivo da larva do inseto 19 DAO. Esses dados indicam uma possível retenção de parte desse material no trato intestinal das larvas, o que pode está relacionado à sua afinidade por quitina, que já foi previamente detectado como um constituinte do trato intestinal de *C. maculatus* (Sales *et al.*, 2001).

Curiosamente, vimos ainda que os insetos-filho provenientes de fêmeas crescidas em sementes com tegumento artificial contendo 6% das proteínas de tegumentos de *A. lebeck* tiveram um tempo de vida menor do que os insetos-filhos de fêmeas que não tiveram contato com essas proteínas (figura 12). Esta curta longevidade dos descendentes pode indicar uma toxicidade crônica ou ainda a absorção de parte dessas proteínas e uma possível transferência aos ovos. Trabalhos anteriores haviam sugerido que vicilinas acumulavam-se no corpo gorduroso após absorção intestinal onde eram parcialmente degradadas e os peptídeos resultantes eram mantidos durante todo o desenvolvimento do inseto,

sendo então eventualmente sequestrados para os ovos (Souza *et al.*, 2010). Sendo assim, é possível que nossas fêmeas também tenham transferido alguns fragmentos tóxicos ou as proteínas com afinidade a quitina de tegumentos de *A. lebeck* para os seus ovos, o que explicaria os efeitos visualizados nos insetos-filho (figura 12). Entretanto mais pesquisas deverão ser realizadas para confirmação dos dados.

Estudos têm sugerido que proteínas de plantas com afinidade a quitina possuem a habilidade de se ligarem a estruturas quitinosas da membrana peritrófica de insetos (Sales *et al.*, 2001; Paes *et al.*, 2008). A membrana peritrófica dos insetos é uma estrutura de extrema importância, pois facilita a reciclagem de enzimas digestivas do inseto e protege o epitélio intestinal contra ataques patogênicos e partículas abrasivas do bolo alimentar (Terra, 2001). Assim sendo, Sales *et al.* (2001), viram que proteínas de leguminosas do tipo vicilina eram capazes de se ligarem a quitina presente no intestino do inseto *C. maculatus*. Anteriormente, Yunes *et al.* (1998), mostrou que vicilinas presentes em sementes das leguminosas *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *G. max*, *Canavalia ensiformes*, dentre outras, ligavam-se a matrizes de quitina. Já em 2006, foi mostrado que uma protease cisteínica de genótipos resistentes de milho, a Mir1-CP, acumulava-se rapidamente em locais da folha atacadas pelo inseto *Spodoptera frugiperda* sendo capazes de inibir o crescimento das larvas. Os testes *in vitro* mostraram ainda que estas proteases cisteínicas causavam a permeabilização da membrana peritrófica desses insetos ao ocasionar sérios danos a essa membrana (Mohan *et al.*, 2006). Recentemente, nosso grupo observou que larvas de *C. maculatus* que ingeriram as proteínas da farinha do tegumento de *Phaseolus vulgaris* marcadas com FITC ao atravessarem os tegumentos artificiais apresentaram uma forte fluorescência no intestino e uma menor fluorescência nas fezes, indicando que possivelmente ocorre uma retenção dessa farinha de tegumento no intestino da larva, o que pode ser o motivo da sua toxicidade (Sá *et al.*, 2014).

Nossos resultados sugerem que a habilidade de ligação a estruturas de quitina exercidas pelas proteínas obtidas por cromatografia de afinidade, pode estar relacionada ao seu mecanismo de ação, ocasionando toxicidade as larvas do inseto *C. maculatus* por restrições nos processos de digestão e absorção de nutrientes pelo inseto. Desta forma, o armazenamento do conteúdo energético em forma de corpo gorduroso torna-se menor, o que explicaria a perda de massa corporal larval. Isto pode prejudicar posteriormente a sobrevivência do inseto adulto que durante

este período não se alimentam mais. Quanto à eficiência das proteínas de ligação a quitina como barreira química de proteção, este trabalho mostrou que estas proteínas quando são acumuladas apenas no tegumento oferecem uma barreira química de proteção eficiente contra a penetração do inseto.

6- CONCLUSÕES

- Não foram visualizadas alteração morfológica nas larvas de *C. maculatus* durante o desenvolvimento embrionário em ovos postos sobre tegumentos artificiais contendo as farinhas ou as proteínas de tegumentos de *A. lebbeck* e *G. max*;
- Os tegumentos artificiais contendo as farinhas ou as proteínas de tegumentos de *A. lebbeck* e *G. max* não foram capazes de retardar de maneira significativa a penetração das larvas do inseto *C. maculatus*;
- Tegumentos artificiais contendo 3% da farinha do tegumento de *A. lebbeck* ocasionaram uma mortalidade larval de até 100%;
- A massa corporal das larvas *C. maculatus*, que atravessaram tegumentos artificiais contendo as farinhas de *G. max* e *A. lebbeck* foi reduzida em 43,8% e 82,5%, respectivamente;
- Proteínas com afinidade a quitina com massas moleculares de 29, 20 e 14,2 kDa foram isoladas dos tegumentos naturais de *A. lebbeck*. Peptídeos oriundos dessas bandas mostraram similaridade de 100% com a cadeia A da protease cisteínica mexicana e 97% de similaridade com a protease cisteínica vignaina;
- Proteínas com afinidade a quitina com massas moleculares de 36 e 24 kDa foram isoladas dos tegumentos naturais de *Glycine max*. Peptídeos oriundos dessas bandas mostraram similaridades com uma quitinase da classe I e com a proteína de 24 kDa de tegumento de *G. max* respectivamente;
- Tegumentos artificiais contendo 6% das proteínas de ligação à quitina de *A. lebbeck* ocasionaram uma mortalidade larval de 42%;
- As frações protéicas de afinidade à quitina dos tegumentos de *A. lebbeck* e *G. max* foram tóxicas para as larvas de *C. maculatus*, reduzindo a massa corporal larval em 31,7% e 28% respectivamente;
- Proteínas de ligação à quitina de tegumentos de *A. lebbeck* e *G. max* marcadas com FITC foram detectadas no trato intestinal e nas fezes larvas de

C. maculatus 19 DAO. Essa marcação no intestino permaneceu mesmo após a lavagem do tecido, indicando a retenção de parte dessas proteínas;

- Insetos emergidos dos ovos postos pelas fêmeas que se desenvolveram após a travessia de tegumentos artificiais contendo as proteínas de ligação à quitina de *A. lebeck* possuem um tempo de vida muito mais curto após a emergência;
- A espessura dos tegumentos artificiais interferiu nos parâmetros de desenvolvimento do inseto. Uma mortalidade de 90% foi observada em larvas que tentaram atravessar tegumentos mais espessos contendo 25% da fração ligadora de quitina de soja. As Larvas que sobreviveram a travessia de tegumentos mais espessos tiveram uma redução na massa corporal de 87,18%.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrol, D. P. (1999). Pulse susceptibility to *Callosobruchus chinensis* (L.) (Bruchidae: Coleoptera) under field conditions. *J Tropic Agr*, 76:150.
- Adrangi, S., Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotech Adv*, 31:1786–1795.
- Agrios, G. N. (1988). How plants defend themselves against pathogens. *Plant Pathology*. 3rd. ed., Academic Press Inc., London. 97-115.
- Almeida, S. A., Almeida, F. A. C., Santos, N. R., Araújo, M. E. R., Rodrigues, J. P. (2004). Atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *R Bras Agrociência*, 10. (1). 67-70.
- Appleby, J. H., Credland, P. F. (2004). Environmental conditions affect the response of West African *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) populations to susceptible and resistance cowpeas. *J Stored Prod Res*, 40:269-287.
- Asp, T., Bowra, S., Borg, S., Holm, P. B. (2004). Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymic characterization of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*). *Biochem Biophys Acta*, 1699:111–122.
- Arie, M., Hikichi, K., Takahashi, K., Esaka, M. (2000). Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. *Physiol Plant*, 110:232–239.
- Asensio, J. L., Cañada, F. J., Siebert, H.-C., Laynez, J., Poveda, A., Nieto, P. M., Soedjanaamadja, U. M., Gabius, H.-J., Jiménez-Barbero, J. (2000). Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem Biol*, 7:529–543.
- Avrova, A. O., Stewart, H. E., De Jong, W., Heilbronn, J., Lyon, G. D., Birch, P. R. J. (1999). A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *MPMI*. 12(12):1114–1119.
- Bastos, J. A. M. (1981). Principais pragas de cultivares e seus controles. *Nobel*. 50-84.
- Beintema, J. J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett*, 35:159-163.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994). In: *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2^o ed. New York: Plenum Press, p. 40-50.

Bishop, J. G., Dean, A. M., Mitchell-Olds, T. (2000). Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *PNAS* (97) 10:5327.

Castaeda-Agullo, M., Hernandez, A., Loeza, F., Salazar, W. (1945). Crystallization of mexicain. *J Biol Chem*, 159:751–751.

Castro, M. S., Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Prot Pept Lett*, 12:13–18.

Conceição, J. G. (2008). Quitinases do tegumento de soja (*Glycine max*). Monografia (Licenciatura em Biologia). Campos dos Goytacazes, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., Vad, K. (1993). Plant chitinases. *Plant J*, 3(1):31-40.

Credland, P. F., Dendy, J. (1992). Intraespecific variation in bionomic characters of the mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomol Exp Appl*, 65:39-47.

Datta, K., Tu, J., Oliva, N., Ona, I., Velazhahan, R., Mew, T. W., Muthukrishnan, S., Datta, S. K. (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci*, 160:405–414.

Ding, X., Gopalakrishnan, L. B., Johnson, F. F. White, X. Wang. (1998). Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res*, 7:77-84.

Duranti, M., Gius, C. (1997). Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crop Res*, 53:31-45.

Fahn, A., Shimony, C. (1996). Glandular trichomes of *Fagonia L.* (Zygophyllaceae) species: Satruture, development and secreted materials. *Ann Bot.* 77:25-34.

Fazolin, M. Insetos-praga e seus inimigos naturais. In: Zilli, J. E., Vilarinho, A. A., Alves, J. M. A. A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. Cap. 8, p. 271-304.

Fields, P. G., Xie, Y. S., Hou, X. (2001). Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *J Stored Prod Res.* 37:359-370.

Franz, H. (1988): The ricin story. *Adv Lectin Res*, 1:10-25.

Fung, K. L., Zhao, K. J., He, Z. M., Chye, M. L. (2002). Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 shows antifungal activity *in vitro*. *Plant Mol Biol*, 50:283-294.

Gallo, D., Nakako, O., Silveira Neto, S., Carvallho, R. P. L., Batista, G. C., Berti, E.,

Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D. (1988). Em: Manual de entomologia agrícola. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 649p.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S.B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S., Omoto, C. (2002). Manual de entomologia agrícola. Piracicaba, Feealq, 920p.

Gatehouse, A. M. R., Dewey, F. M., Dove, J., Fenton, K. A., Pusztta, A. (1984). Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*; mechanism of toxicity. J Sci Food Agric, 35(4):373-380.

Gavira, J. A., Gonzalez-Ramirez, Oliver-Salvador, M. C., Soriano-Garcia, M., Garcia-Ruiz, M. (2007). Structure of the mexicain-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. Acta Cryst. 63:555–563.

Gizjen, M., Kuflu, K., Qutob, D., Chernys, J. T. (2001). A class I chitinase from soybean seed coat. J Exp Bot, 52:2283-2289.

Hackman, R. H., Goldberg, M. (1964). New substrates for use with chitinases. Anal Biochem, 8:397-401.

Hartl, M., Giri, A. P., Kaur, H., Baldwin, I. T. (2011). The multiple functions of plant serine protease inhibitors: Defense against herbivores and beyond. Plant Signal Behav, 6(7):1009-1011.

Janzen, D. H. (1977). How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae: *Callosobruchus maculatus*) die on nonhost seeds. Ecol, 58:921-927.

Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases—regulation and function. Cell Mol Biol Lett, 8:809–824.

Kaur, M., Singh, K., Rup, P. J., Kamboj, S. S., Saxena, A. K., Sharma, M., Bhagat, M., Sood, S. K., Singh, J. (2006). A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. J Biochem Mol Biol, 39(4):432-440.

Kaur, I., Yadav, S. K., Hariprasad, G., Gupta, R. C., Srinivasan, A. Batra, J. K., Puri, M. (2012). Balsamin, a novel ribosome-inactivating protein from the seeds of balsam apple *Momordica balsamina*. Amino acid, 43:973-981.

Kembhavi, A. A., Buttle, D. J., Knight, G., Barrett, A. J. (1993). The two cysteine endopeptidases of legume seeds: Purification and characterization by use of specific fluorometric assays. Arch Biochem Biophys, 303(2):208-213.

- Kezuka, Y., Kojima, M., Mizuno, R., Suzuki, K., Watanabe, T., Nonaka, T. (2010). Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. *Protein*, 78:2295–2305.
- Khan, M. R. I., Gatehouse, J. A, Boulter, D. (1980). The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J Exp Bot*, 31:1599.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. *Plant J*, 37:370-378.
- Kozlowski, T. T. (1972). In: *Seed Biology*. V.II. 2nd ed. Wiley, New York, pp 4-1114.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4 . *Nature*, 227:680-685.
- Liu, Y., Dammann, C., Bhattacharyya, M. K. (2001). The matrix metalloproteinase gene *GmMMP2* is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiol*, 127(4):1788-1797.
- López-García, B., Hernández, M., Segundo, B. S. (2012). Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 55:62–67.
- Macedo, M. L. R., Andrade, L. B. S., Moraes, R. A., Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Camp Biochem Physiol*, 105(1):89-94.
- Macedo, L. L. P., Amorin, T., M. L., Uchôa, A. F., Oliveira, A. S., Ribeiro, J. K. C. Macedo, F. P., Santos, E. A., Sales, M. P. (2008). Larvicidal effects of a chitin-binding vicilin from *Erythrina velutina* seeds on the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Agric Food Chem*, 56:802–808.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*, 206:4393–4412.
- Merzendorfer, H. (2009). Chitin. In: Gabius, H.-J. (Ed.), *The sugar code: Fundamentals of glycosciences*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 217–229.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *Eur J Cell Biol*, 90:759-769.
- Mithöfer, A., Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: Chemical aspects.

Annu Rev Plant Biol, 63:431-450.

Moise, A. J., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, A. D., Mikic, A. L. B. (2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In vitro Cell. Devel Biol Plant*, 41(41): 620-644.

Mohan, S., Ma, P. W. K., Pechan, T., Bassford, E. R., Williams, W.P., Luthe, D. S. (2006). Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *J Insect Physiol*, 52:21–28.

Moraes, R. A., Sales, M. P., Pinto, M. S. P., Silva, L. B., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Braz J Med Biol Res*, 33:191-198.

Mota, A. C., DaMatta R. A., Lima Filho, M., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. (2003). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *J Insect Physiol*, 49:873–880.

Moura, F. T., Oliveira, A. S., Macedo, L. L. P., Vianna, A. L. B. R., Andrade, L. B. S., Martins-Miranda, A. S., Oliveira, J. T. A., Santos, E. A., Sales, M. P., 2007. Effects of a chitin binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). *J Agric Food Chem*, 55. 260–266.

Murad, A. M., Laumann, R. A., Lima, T. A., Sarmiento, R. B., Noronha, E. F., Rocha, T. L., Valadares-Inglis, M. C., Franco, O. L. (2006). Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 142(3-4):365-370.

Neuhaus, J-M., Fritig, B., Linthorst, H. J. M., Jr., F. M., Mikkelsen, J. D., Ryals, J. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Biol Rep*, 14(2):102-104.

Nielsen H., Engelbrecht, J., Brunak S., Von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 10(1):1-6.

Nirala, N. K., Das, D. K., Srivastava, P. S., Sopory, S. K., Upadhyaya, K. C. (2010). Expression of a rice chitinase gene enhances antifungal potential in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 49(4):181–187.

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., Hibi, T. (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by

constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet*, 99:383–390.

Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schonbeck, F., Webwr, A. (1994). *Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops*, Elsevier, Amsterdam.

Ohno, J., Tajima, Y., Utsumi, N. (1986). Binding of wheat germ agglutinin in the matrix of rat tracheal cartilage. *Histochem J*, 18(10):537-540.

Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., Watanabe, T. (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol*, 178(17):5065–5070.

Oliveira, A. E. A., Sales, M. P., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (1999). The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC cotyledonary and testa proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)). *Entomol Exp Appl*, 92:249-255.

Oliveira, A. E. A., Sasaki, G. L., Iacomini, M., Cunha, M., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (2002). Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. *Entomol Exp Appl*, 101(3): 25-231.

Oliveira, A. E. A., Fernandes, K. V. S., Souza, A. J., Santos, P. O. (2009). Influence of the Soybean Seed Coat upon Seed Infestation and Development of the insect *Callosobruchus maculatus*. *Soybean and Wheat Crops: Growth, Fertilization, and Yield*. New York: Nova Science Publishers, 2009, p.p. 1-21.

Oliver-Salvador, M. C., Gonzalez-Ramirez, L. A., Gavira, J. A., Soriano-Garcia, M., Garcia-Ruiz, J. M. (2004). Purification, crystallization and preliminar X-ray analysis of mexicain. *Acta Cryst*, 60:2058–2060.

Paes, E. V., Uchôa, A. F., Pinto, M. S. T., Silva, C. P., Fernandes, K. V. S., Oliveira, A. E. A., Xavier-Filho, J. (2008). Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomol Exp App*, 129:11-17.

Park, S. M., Kim, D. H., Truong, N. H., Itoh, Y. (2002). Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). *Enzyme Microb Technol*, 30:697–702

Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 109:347-352.

Pereira, P. R. V. S., Almeida, L. M. (2001). Chaves para identificação dos principais

Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. R Bras Zool, 18(1):271-283.

Priolo, N., Del Valle, S. M., Arribére, M. C., López, L., Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. J Protein Chem, 19(1):39-49.

Quintela, E. D., Neves, B. P. das, Quinderé, M. A. W., Roberts, D. W. (1991). Principais plagas del *caupi* em el Brasil. Goiânia: Embrapa-Cnpaf. (Embrapa-Cnpaf. Documentos, 35).

Quiroga, A., Martinez, N., Rogniaux, H., Geairon, A., Anón, M. C. (2010). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure. J Agric Food Chem, 58:12957–12963.

Raikhel, N. V., Lee H. I. e Broekaert, W. F. (1993). Structure and function of chitin binding proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 591-615.

Ramos-Martínez, E. M., Herrera-Ramírez, A. C., Badilo-Corona, J. A., Garibay-Orijel, C., González-Rábade, N., Oliver-Salvador, M. C. (2012). Isolation cDNA from *Jacaratia mexicana* encoding a mexicanin-like cysteine protease gene. Gen, 502:60-68.

Sá, L. F. R., Wermelinger, T. T., Ribeiro, E. S., Gravina, G. A., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J., Venancio, T. M., Rezende, G. L., Oliveira, A. E. A. (2014). Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). J Insect Physiol, 60:50–57.

Sadeghi, A., Van Damme E. J. M., Peumans, W. J., Smagghe, G. (2006). Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. Phytochem, 67:2078–2084.

Sales, M. P., Macedo, M. L. R., Xavier-Filho, J. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. Comp Biochem Physiol, 103(4):945-950.

Sales, M. P., Gerhardt, I. R., Grossi-de-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiol, 124:515-522.

Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-de-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. Braz J Med Biol Res, 34:27– 34.

Santos, P. O., Santos, I. S., Gomes, V. M., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J., Oliveira, A. E. A. (2008). *In vitro* evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. *J Stored Prod Res*, 44:310-315.

Shin, S., Mackintosh, C. A., Lewis, J., Heinen, S. J., Radmer, L., Dill-Macky, R., Baldridge, G. D., Zeyen, R. J., Muehlbauer, G. J. (2008). Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot*, 59(9):2371–2378.

Silva, L. B., Sales, M. P., Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (2004). The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. *An Acad Bras Cienc*, 76(1):57-65.

Soares, A. M. S., Machado, O. L.T. (2007). Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1):9.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11:431–443.

Southgate, B. J. (1979). Biology of the bruchidae. *Ann Rev Entomol*, 24(1):449-473.

Souza, A. J., Santos, P. O., Pinto, M. S. T., Wermelinger, T. T., Ribeiro, E. S., Souza, S. C., Deus, M. F., Souza, M. C., Xavier-Filho, J., Fernandes, K. V. S., Oliveira, A. E. A. (2011). Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Crop Prot*, 30:651-657.

Souza, A. J., Ferreira, A. T. S., Perales, J., Beghini, D. G., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J., Venancio, T. M., Oliveira, A. E. A. (2012). Identification of *Albizia lebeck* seed coat chitin-binding vicilins (7S globulins) with high toxicity to the larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus*. *Braz J Med Biol Res*, 45(2):118-124.

Souza, S. M., Uchôa, A. F., Silva, J. R., Samuels, R. I., Oliveira, A. E. A., Oliveira E. M., Linhares, R. T., Alexandre, D., Silva, C. P. (2010). The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *J Insect Physiol*, 56:1130-1138.

Tarver, M. R., Shade, R. E., Shukle, R. H., Moar, W. J., Muir, W. M., Murdock, L. M., Pittendrigh, B. R. (2007). Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). *Pest Manag Sci*, 63:440-446.

Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol*, 47:47–61.

Thiery, D. (1984). Hardness of some fabaceous seed coats in relation to larval

penetration by *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*, 20(4):177-181.

Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Plant Biol*, 93:6332-6337.

Uchôa, A. F., Miranda, M. R. A., Souza, A. J., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S., Lemos, F. J. A., Oliveira, A. E. A., Xavier-Filho, J. (2009). Toxicity of hidroyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem*, 57(17):8056-8061.

Van Damme, E. J. M., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J. C., Rouge, P., Van Leuven, F., Does, M., Peumans W. J. (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiol*, 119:1547–1556.

Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., Peumans, W. J. (2008). Plant lectins. *Adv Bot Res*, 48:107–209.

Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J., (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44:135-162.

Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J. (1991). Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Plant*. 183:258–262.

Wan, L., Xia, Q., Qiu, X., Selvaraj, G. (2002) Early stages of seed development in *Brassica napus*: A seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *The Plant J*, 30(1):1-10.

Wang, S., Shao, B., Fu, H., Rao, P. (2009). Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85:313–321.

Williams, J. O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 26:5-10.

Wu, L., Bao, J. K. (2012). Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins. *Glycoconj J*, 30:269–279.

Wu, J. e Baldwin, I. T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Genet*, 44:1-24.

Xavier-Filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra Insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos (OEA). Imprensa

Universitária. UFC. 1-9.

Yunes, A. N. A., Andrade, M. T., Sales, M. P., Morais, R. A., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M., Xavier-Filho, J. (1998). Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *J. Sci. Food Agric*, 76:111-116.

Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho A. O., Dias, G. B., Silva, N. C. M., Santos, I. S., Nascimento, V. V., Miguel, E. C., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2011). Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta*, 1810:375–383.