

**PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
Howard COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AÇÃO
BIOINSETICIDA**

DAYANNI DE SOUZA PADUA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Junho 2020

**PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AÇÃO BIOINSETICIDA**

DAYANNI DE SOUZA PADUA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Junho 2020

**PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AÇÃO BIOINSETICIDA**

DAYANNI DE SOUZA PADUA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular”.

Aprovada em:04/06/2020

Comissão examinadora:

Dr. André de Oliveira Carvalho - UENF

Dra. Jucélia da Silva Araújo - UENF

Dra. Nathália Bastos Lima de Andrade - IFF

Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes - UENF
(Orientadora)

“Com imensa
gratidão, dedico
este trabalho a
Deus. Devo a Ele
tudo o que sou.”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Kátia Valevski Sales Fernandes, pelos ensinamentos científicos e sempre com muita paciência;

Aos membros da Banca e o Revisor, muito obrigada por terem aceitado!

A todos os colegas do LQFPP e LFBM;

Aos professores da UENF, pessoas especiais durante a nossa trajetória;

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ;

À UENF, por nos inserir no mundo científico;

Aos que me deram muito apoio, Érica de Oliveira Mello, Gabriel Bonan Taveira, Jucélia da Silva Araújo, Jaqueline Resende, Larissa Resende;

Aos amigos que me incentivaram e me ensinaram durante todas as etapas: Gustavo Lemos Rocha, Nathália Bastos Lima, Lucilene Ollivier de Oliveira, Janaína de Campos Machado, Aline Alves do Nascimento;

À minha mãe, Elizabeth Pereira de Souza, sempre com muito esforço para melhorar nossa vida;

Ao meu pai, Eduardo Padua (*in memoriam*), por deixar conosco a sua alegria;

Aos meus irmãos, Danielle de Souza Pádua e Rafael Pereira de Souza;

À minha sobrinha Alice Silva Padua;

À minha família, por entender as ausências;

Aos meus amigos especiais: Laryssa Canhaço de Assis, Mara Silva, Flávio do Nascimento Azevedo Filho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard.....	1
1.2. Proteínas tóxicas de sementes.....	2
1.3. Vicilinas.....	6
1.4. Quitinases	9
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO 1 – Proteínas bioinseticidas de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard	13
CAPÍTULO 2 – Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard	43
3. MATERIAIS	43
3.1. Materiais biológicos	43
4. MÉTODOS.....	44
CAPÍTULO 2: Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard	44
4.1. Obtenção de células de leveduras.....	44
4.2. Obtenção de esporos de fungos filamentosos	44
4.3. Análise de inibição do crescimento de leveduras e dos fungos filamentosos.....	44
4.4. Zimografia do extrato micelial dos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i>	45
5. RESULTADOS	45
CAPÍTULO 2: Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard	45
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO.....	55
8- REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard.....	2
Figura 2: Visualização esquemática da estrutura tridimensional da vicilina (SM80.1) de <i>Solanum melongena</i>	9
Figura 3: Visualização esquemática da estrutura tridimensional dos domínios catalíticos de quitinase da classe I de <i>Vigna unguiculata</i> (VuChil).....	12
Figura 4: Ensaio de crescimento de <i>C. albicans</i> na presença dos picos P1 e P2 da cromatografia de exclusão molecular de Sephadex G-50.....	46
Figura 5: Ensaio de crescimento de <i>C. buinensis</i> na presença dos picos P1 e P2 da cromatografia de exclusão molecular de Sephadex G-50.....	47
Figura 6: Ensaio de crescimento de <i>F. solani</i> na presença dos picos P1 e P2 da cromatografia de exclusão molecular de Sephadex G-50.....	48
Figura 7: Ensaio de crescimento de <i>F. oxysporum</i> na presença dos picos P1 e P2 da cromatografia de exclusão molecular de Sephadex G-50.....	49
Figura 8: Imagem em zimografia em SDS-PAGE a 12% contendo 0,1% gelatina. Controle de <i>F. oxysporum</i> 48h (C); <i>F. oxysporum</i> 48h + P1 (P1); <i>F. oxysporum</i> 48h + P2 (P2); Controle de <i>F. solani</i> 72h (C); <i>F. solani</i> 72h + P1 (P1); <i>F. solani</i> 72h + P2 (P2); <i>F. solani</i> 72h + P2' (P2).....	50

ABREVIATURAS

ABS- Absorbância

AC- Anidrase carbônica

BCA- do inglês, bicinchoninic acid

BCE- Boiled crude extract

Bis-acrilamida- N,N'-metileno bisacrilamida

BSA- do inglês, bovine sérum albumin

Da- Dalton

DAD- Detector de arranjo de diodo

EB- Extrato bruto

EBF- Extrato bruto fervido

EC₅₀- Concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

kDa- Quilodaltons

M- Marcador de massa molecular

nm- Nanômetro

OVA- Ovalbumina

P1- Fração P1 da cromatografia de exclusão molecular

P2- Fração P2 da cromatografia de exclusão molecular

PAGE- do inglês, Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS- Tampão fosfato salino

R1- Pico R1 da cromatografia de afinidade

R2- Pico R2 da cromatografia de afinidade

RIP- do inglês, Ribosome inactivating proteins

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TCA- Ácido tricloroacético

TEMED- N, N, N', N' -tetrametiletlenodiamina

TFA- Ácido trifluoroacético

Tris- Tris-hidroximetil-aminometano

RESUMO

Clitoria fairchildiana é uma espécie arbórea, leguminosa, não domesticada e apresenta um arsenal químico de defesa em suas sementes com alto potencial biotecnológico. Dentre este arsenal estariam proteínas antimicrobianas e com ação bioinseticida. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de proteínas isoladas de sementes de *C. fairchildiana* sobre o crescimento de leveduras e fungos fitopatogênicos e insetos de relevância agrônômica. A farinha preparada a partir da trituração de cotilédones de sementes quiescentes foi despigmentada, antes dos procedimentos de extração de proteínas. As proteínas extraídas foram precipitadas com sulfato de amônio a 0-60 e 60-90% de saturação, quantificadas e visualizadas por SDS-PAGE. Como a complexidade e a riqueza de proteínas da fração proteica não precipitada (sobrenadante final) foi menor, essa amostra foi submetida a cromatografia de exclusão molecular e visualizada por tricina-SDS-PAGE e os picos obtidos (P1 e P2) foram analisados quanto às suas atividades de inibição do crescimento de fungos e leveduras, inibição *in gel* da atividade de proteases do extrato micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, inibição do desenvolvimento larval do inseto *Callosobruchus maculatus* e de atividade *in vitro* de ação quitinásica. O P1 inibiu 32,5% e o P2 21,5% do crescimento de *Candida albicans*. O P1 inibiu 10,7%, e o P2 15,9% o crescimento de *F. oxysporum*. Redução da atividade de proteases do extrato micelial do fungo *F. solani* foi observada por zimografia. O ensaio de toxicidade *in vivo*, onde a dieta natural da larva foi suplementada com diferentes concentrações dos picos, revelou uma drástica redução do peso larval, com maior pontuação para a dieta suplementada com 1,5% de P1, capaz de reduzir o peso das larvas em 91,7% em comparação à redução de 74% causada pela suplementação com 1,5% de P2. Além disso, o P1 foi submetido à cromatografia de afinidade à quitina, cujo perfil mostrou dois picos retidos. As bandas de proteínas do P1 da Sephadex G-50 (29 kDa e 12 kDa) foram analisadas por espectrometria de massa tendo sido estabelecidas associação dos peptídeos originados a partir de sua hidrólise com proteínas do tipo quitinase e vicilina, respectivamente. A atividade quitinásica da proteína de 29 kDa foi reforçada por ensaio *in vitro* contra o substrato quitina azure.

Palavras-chave: *Clitoria fairchildiana*; Proteínas inseticidas; quitinase; vicilina; *Callosobruchus maculatus*.

ABSTRACT

Clitoria fairchildiana is an arboreal, leguminous, non-domesticated species and has a chemical defense arsenal in its seeds with relevant biotechnological potential. Among this arsenal, there would be antimicrobial and bioinsecticidal proteins. The objective here was to evaluate the action of proteins isolated from *C. fairchildiana* seeds on the growth of yeasts and phytopathogenic fungi and of insect pests of agronomic relevance. The flour prepared from the grinding of quiescent seed cotyledons was depigmented before the protein extraction procedures. The extracted proteins were precipitated with ammonium sulfate at 0-60 and 60-90% saturation, quantified and visualized by SDS-PAGE. As the complexity and protein richness of the non-precipitated fraction (final supernatant) were lower, this sample was subjected to molecular exclusion chromatography and visualized by tricine-SDS-PAGE and the obtained peaks (P1 and P2) were analysed in relation to their capacity to inhibit the growth of fungi and yeasts, to *in gel* inhibit the protease activity of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* mycelial extract, to *in vivo* inhibit the larval development of *Callosobruchus maculatus* insect, and to display *in vitro* chitinase activity. P1 inhibited 32.5% and P2, 21.5% of *Candida albicans* growth. P1 inhibited 10.7% and P2, 15.9% growth of *F. oxysporum*. Reduction of the protease activity of the mycelial extract of the fungus *F. solani* was observed in zymography. The *in vivo* toxicity test, in which the natural diet of the insect larva was supplemented with different concentrations of the seed fractions, revealed a drastic reduction in the larval weight, with a higher score for the diet supplemented with 1.5% P1, capable of reducing the larval weight by 91.7% compared to the 74% reduction caused by supplementation with 1.5% P2. In addition, P1 was subjected to chitin affinity chromatography, whose profile showed two retained peaks. The protein bands (29 kDa and 12kDa) of the Sephadex G-50 P1 were analyzed by mass spectrometry with the association of the peptides originated from their hydrolysis with proteins similar to chitinase and vicilin-type proteins. Chitinase activity of the 29 kDa protein was reinforced by *in vitro* assay against the blue chitin azure substrate.

Keywords: *Clitoria fairchildiana*; Insecticidal proteins; chitinase; vicilin; *Callosobruchus maculatus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard

A espécie arbórea *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard (figura 1) é nativa do Brasil, faz parte da classe Eurosidaeae, ordem Fabales, família Fabaceae ou Leguminosae, subfamília Faboideae e gênero *Clitoria*. Bastante conhecida como sombreiro, sobreiro, palheteira e sombra de vaca, sua principal ocorrência é no Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins, na floresta amazônica de terra firme (Lorenzi, 2002). É uma árvore com altura entre 6 e 12 metros, muito aproveitada para a arborização urbana e rural, como já vem sendo amplamente utilizada nas regiões Sudeste e Norte do Brasil (Lorenzi, 2002). É uma planta que se adapta melhor em solos férteis e úmidos. Em algumas regiões, seu florescimento se estende até abril e maio, e o amadurecimento do fruto ocorre com a queda das folhas em maio e junho (Lorenzi, 2002).

Os frutos são caracterizados do tipo baga, um pouco curvos, longos, secos e deiscentes, quando maduros apresentam a coloração castanha. As sementes são de coloração castanha, exalbuminosas, orbiculares plano-convexas. A germinação é do tipo fanerocotiledonar e epígea, começando no quinto dia após a sementeira. A morfologia do fruto e da semente, assim como a formação das plântulas se apresentam homogêneas em todas as fases, demonstrando aspectos que são utilizados para a identificação da espécie. A semente de *Clitoria* apresenta uma anatomia padrão para a maioria das leguminosas, com o tegumento diferenciado em três estratos celulares distintos. O embrião é do tipo cotiledonar na cor amarelo-esverdeado (Costa *et al.*, 2014).

Julgando pelas observações diretas de nosso grupo de pesquisa e pelos poucos dados na literatura acerca de predadores naturais de sementes de *Clitoria fairchildiana*, sugere-se que tais órgãos reprodutivos desta espécie apresentem um arsenal químico de defesas, com relevante potencial praguicida e pesticida. Na literatura, relatam-se unicamente insetos-pestes das folhas desta espécie, como os lepidópteros desfolhadores, *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Hesperiidae), (Silva, 1995; Machado, 2000; Trevisan *et al.*, 2004) e *Hyperchiria incisa incisa* (Zanuncio *et al.*, 2013) e o psilídeo *Euphalerus clitoriae* (Gondim-Júnior *et al.*, 2005),

que suga ramos e folhas jovens, causando enormes prejuízos ao indivíduo acometido pela infestação. A planta geralmente se mantém décadas sem sofrer qualquer ataque por tais predadores, mas quando infestada sofre severos danos em sua parte aérea. A figura 1 mostra a árvore de *C. fairchildiana*, seus frutos, flores e sementes.



Figura 1: Imagens da planta *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard (Imagens obtidas de <https://sobasombradasarvores.wordpress.com/pau-brasil/sombreiro-clitoria-fairchildiana>; <http://www.cluny.com.br/?pageid=9370>; <http://ecoeantigos.blogspot.com/2013/01/omisteio-de-clitora-andre-de-meijer.html>; <https://www.sitiodamata.com.br/especies-deplantas/sementes-deplantas/sombreiro-clitoria-fairchildiana>).

1.2. Proteínas tóxicas de sementes

As plantas sendo organismos sésseis e produtoras primárias com tecidos ou órgãos ricos em reservas são extremamente expostas a fatores de estresse ambiental e a ataque de diversos predadores. Para enfrentar o estresse e as

ameaças dos predadores, as plantas sofreram adaptações evolutivas selecionando estratégias de defesa, como por exemplo, a síntese de proteínas tóxicas (Dang & Van Damme, 2015). Até o momento muitas dessas proteínas foram descobertas em vegetais: os inibidores de proteases, inibidores de α -amilase, peptídeos antimicrobianos, defensinas, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), ureases, arcelinas e toxinas formadoras de poros. Estas proteínas exibem vários níveis de toxicidade contra insetos e microrganismos (Dang & Van Damme, 2015).

Os inibidores de proteases são ditos agentes antimetabólicos (Aguiar *et al.*, 2006; Rufino *et al.*, 2013; Abd El-latif & Oukasha 2015; Valdès-Rodríguez *et al.*, 2015), já que um dado organismo, quando afetado por esses inibidores, se depara com a redução da disponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas cruciais para o seu desenvolvimento e crescimento. Esses inibidores têm a capacidade de regulação de eventos de proteólises endógenas ou exógenas e devem estar envolvidos nos processos de degradação de proteínas intracelulares e extracelulares (Turk & Bode, 1991). Os inibidores de proteases são discriminados, especificamente de acordo com as classes de proteases sobre as quais agem, em: inibidores de proteases serínicas, inibidores de proteases cisteínicas, inibidores de proteases aspárticas e inibidores de metaloproteases. Muito abundantes em sementes são os inibidores de proteases serínicas e cisteínicas (De Leo *et al.*, 2002). Muitos trabalhos mostram a ação de inibidores de proteases contra diversos predadores de plantas (Rufino *et al.*, 2013; Zhu-Salzman, 2015; Banerjee *et al.*, 2016; Hamza *et al.*, 2018). E muitos outros trabalhos relatam a ação de inibidores de α -amilases no controle da atividade de α -amilases endógenas, assim como na defesa contra patógenos e pestes (Becker- Ritt & Carlini, 2012; Dang & Van Damme, 2015). Os inibidores de α -amilases são encontrados em leguminosas e em cereais e esses inibidores interferem na ação das α -amilases de insetos, microrganismos e animais (Franco *et al.*, 2002; Amirhusin *et al.*, 2007; Becker-Ritt & Carlini, 2012).

Além dos inibidores de proteases e inibidores de α -amilase, as plantas para se protegerem dos ataques microbianos também sintetizam diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs podem ser sintetizados constitutivamente ou induzidos mediante algum estresse biótico ou abiótico (Tam *et al.*, 2015; Holaskova *et al.*, 2015). Os AMPs possuem baixa massa molecular, são onipresentes em plantas e dividem-se em diferentes classes: defensinas, ciclotídeos, proteínas

transportadoras de lipídeos, tioninas, peptídeos do tipo heveína e peptídeos do tipo vicilina. De maneira geral, os AMPs de plantas apresentam um mecanismo de ação que envolve a interação com diferentes estruturas de membrana, levando à formação de canais iônicos, culminando no aumento da permeabilidade e podendo levar à morte celular (Goyal & Matto, 2014).

Muitas plantas contêm um grupo heterogêneo e complexo de proteínas denominadas lectinas, aglutininas ou hemaglutininas, que são proteínas que se ligam a carboidratos. São divididas em quatro grandes grupos, em função de aspectos estruturais e evolutivos: as lectinas de leguminosas; o tipo 2, de proteínas inativadoras de ribossomos; as lectinas de ligação à quitina, compostas de domínios heveínicos e as lectinas de ligação à manose, de monocotiledôneas (Van Damme *et al.*, 1998). Sabe-se que as lectinas reconhecem e interagem com monossacarídeos, mas em geral as lectinas de plantas se ligam seletivamente a oligossacarídeos mais complexos como os N- e O-glicanos (Ghazarian *et al.*, 2011). Trabalhos demonstram que as lectinas podem interferir severamente na fecundidade e no desenvolvimento dos insetos. Muitas lectinas foram testadas contra insetos (Van Damme *et al.*, 1998; Sadeghi *et al.*, 2006; Dang & Van Damme, 2015). É aceito, na literatura, que a ligação específica de lectinas a estruturas de carboidratos no corpo do inseto é crucial para o efetivo papel tóxico das lectinas (Van Damme *et al.*, 2011; Dang & Van Damme, 2015).

Outro exemplo de proteína tóxica são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), que são uma classe de enzimas citotóxicas com alta atividade específica de rRNA-glicosidases com potencial de inativar cataliticamente os ribossomos de procariotos ou eucariotos. Além de sua atividade de rRNA N-glicosidase e de polinucleotídeo: adenosina glicosidase, outras atividades não estão relacionadas a atividades de nucleases (Pneuman *et al.*, 2001). As RIPs são classificadas de acordo com sua estrutura global em dois grandes grupos: RIPs 1 que possui apenas o RNA-N-Glicosidase e RIPs 2 que apresenta um domínio de lectina, além do domínio glicosidase. As RIPs em plantas foram muito estudadas, como por exemplo, RIP do tipo 2 de mamonas. Várias RIPs do tipo 1 e 2 apresentaram atividade inseticida demonstrado através de experimentos com alimentação artificial, assim como em plantas transgênicas. Também foi relatado atividade antifúngica para muitas RIPs do tipo 1 (Dang & Van Damme, 2015).

Dentre as proteínas tóxicas, também existem as ureases, primeira enzima a ser cristalizada, um tipo de metaloenzima que hidrolisa a ureia formando amônia e dióxido de carbono (Carlini & Ligabue - Braun *et al.*, 2015). A canotoxina é uma isoforma da urease, isolada pela primeira vez a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) (Carlini & Guimaraes, 1981). A canatoxina é liberada a partir da hidrólise da urease pelas enzimas digestivas dos insetos (Carlini & Ligabue - Braun *et al.*, 2015). A canotoxina isolada de frações proteicas obtidas de sementes de *C. ensiformis* (feijão-de-porco) mostrou-se efetivamente tóxica, a uma concentração de 2%, na inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Macrophominia phaseolina*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Sclerotium rolfsii* (Oliveira *et al.*, 1999).

As arcelinas são outra classe de proteínas tóxicas de sementes, que pertencem a família arcelina/fito-hemaglutinina/inibidor de α -amilase (APA), um grupo de sequências codificadas em um mesmo locus da APA. As arcelinas têm efeito tóxico para os bruquídeos de feijões, como o *Zabrotes subfasciatus*, o que foi demonstrado através da adição de arcelinas purificadas em sementes artificiais (Osborn *et al.*, 1988). Atualmente, 8 variantes de arcelinas (arcelinas 1-8) tem sido relatado, com pesos variando de 27 a 42 kDa (Dang & Van Damme, 2015). Dang & Van Damme (2015) destacam uma outra proteína tóxica de plantas com atividade inseticida, as toxinas formadoras de poros. São mais bem caracterizadas em bactérias, mas também encontradas em plantas. Em plantas, a toxina formadora de poros melhor estudada é a enterolobina, de 54,8 kDa, de sementes de *Enterolobium contortilisiquum* (orelha de negro), que demonstrou alta toxicidade as larvas de *Callosobrucus maculatus*, causando 100% de mortalidade a uma concentração de 0,025%. Canais formados por essas proteínas afetam diferencialmente a permeabilidade da membrana alvo (Bischofberger *et al.*, 2012).

Proteínas de reserva de sementes também podem ter funções duais e serem altamente tóxicas a predadores herbívoros. Recentemente, foi relatado uma proteína de reserva multifuncional, a talisina, de sementes de *Talisia esculenta*. A talisina apresentou efeitos antinutricionais para as larvas de *Spodoptera frugiperda*, considerada a principal praga do milho. Dietas contendo 1% de talisina fizeram com que a massa de larvas do quinto ínstar diminuísse em cerca de 73%. A análise histológica do intestino médio de larvas alimentadas com talisina apresentou

alterações no epitélio intestinal e ruptura da membrana peritrófica, possivelmente causando um aumento da atividade da aminopeptidase no lúmen do intestino médio. A talisina foi resistente à degradação pelas enzimas digestivas de *S. frugiperda* (Oliveira *et al.*, 2020).

Além de todas essas proteínas, vicilinas e quitinases, ambas proteínas detentoras de domínios de ligação à quitina, também são relatadas como protagonistas na defesa das plantas contra insetos e fungos (Souza *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2012, Bard *et al.*, 2014). Como tais proteínas são alvos mais diretos do presente trabalho. Muitas proteínas de plantas possuem domínios ligantes de quitina semelhantes à heveína, algumas apresentam 1 domínio e outras 2, 3 ou 4 domínios. Proteínas de ligação à quitina (polímero de N-acetil-glicosamina) possuem o domínio heveína. O chamado domínio 'heveína' refere-se a uma proteína de 43 resíduos de aminoácidos, encontrada no látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira) (Waljuno *et al.*, 1975). O modelo de interação proteína-carboidrato que envolve as proteínas ligantes à quitina é um dos mais estudados. Na molécula da heveína existe um elemento estrutural ("motif") de 30-43 aminoácidos e fazem parte de sua estrutura uma serina e três resíduos de aminoácidos aromáticos em adição de oito ou seis cisteínas, arranjando-se em pontes dissulfeto em posições em regiões conservadas. Proteínas que possuem esses domínios em sua estrutura têm a habilidade de se ligarem a matrizes quitinosas (Michiro *et al.*, 2000).

1.3. Vicilinas

As vicilinas são proteínas muito estudadas quanto aos seus papéis de defesa nas plantas, contribuindo para a resistência contra diversos predadores. As vicilinas são proteínas de reserva que representam cerca de 70 a 80% do total de proteínas de sementes (Derbyshire *et al.*, 1976). A massa molecular das vicilinas varia de 150 a 170 kDa, sua estrutura compõe-se de uma organização trimérica e cada subunidade tem massa molecular com cerca de 40 a 70 kDa, não possuem ligações dissulfeto, já que possuem poucos resíduos de cisteína em suas sequências (Cândido *et al.*, 2011). Essas proteínas podem possuir uma variedade de pequenos polipeptídeos associados às suas subunidades principais, gerados pelas alterações proteolíticas durante o processamento pós-tradução, o que também pode resultar da adição de cadeias laterais de oligossacarídeos incompletas ou degradação parcial

destas na proteína (Marcus *et al.*, 1999). Subunidades de vicilina com peso molecular entre 12,5 e 35 kDa emergem após proteólise e glicosilação pós-tradução (Boulter, 1984). A estrutura terciária das vicilinas normalmente apresenta uma folha β barril, seguida por duas α hélices antiparalelas (Macedo *et al.*, 1993).

A presença de oligossacarídeos ligados covalentemente a cadeias laterais de vicilinas interfere com o processo de digestão por insetos e fungos (Cândido *et al.*, 2011). As vicilinas de várias sementes de leguminosas têm demonstrado ser altamente tóxicas para os bruquídeos (Sales *et al.*, 2001; Yunes *et al.*, 1998). A atividade antifúngica de vicilinas sobre leveduras e fungos fitopatogênicos também tem sido relatada (Bard *et al.*, 2014). Vicilinas ditas resistentes são capazes de se ligar a estruturas quitinosas encontradas no intestino destes insetos, além de apresentar baixa digestibilidade por proteases de besouros bruquídeos (Yunes *et al.*, 1998; Sales *et al.*, 2001). No trabalho de Sales *et al.* (1992), foi demonstrado que as vicilinas presentes em variedades africanas resistentes de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) eram mais refratárias à digestão enzimática do que as de variedades de feijão-caupi suscetíveis. Uma vez ingeridas por *C. maculatus*, as vicilinas são absorvidas pelo epitélio intestinal, movem-se para a hemolinfa na forma de um trímero e são depositadas no corpo gorduroso. Dentro do corpo gorduroso, elas são parcialmente hidrolisadas e os fragmentos produzidos são enviados para os ovos, nas fêmeas. Sugere-se que esse depósito nos ovos seja um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos (Alexandre *et al.*, 2011).

Quanto a atividade antifúngica de vicilinas, foi relatado que as vicilinas de *V. unguiculata* se ligam, possivelmente às estruturas da parede celular dos fungos que possuem quitina (Gomes *et al.*, 1996). Vicilinas isoladas de *Vigna unguiculata* interferiram na germinação dos conídios dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum musae*, *Phytophthora capsici*, *Neurospora crassa* e *Ustilago maydis*. A vicilina de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) inibiu em até 70% o crescimento dos fungos *Ustilago maydis* e *Phytophthora capsici*. As vicilinas de sementes resistentes de *V. unguiculata* (IT81D-1045) mostraram ser mais eficazes na inibição do crescimento de *F. solani* e *C. musae* do que as vicilinas das sementes suscetíveis (CE-31) e para o crescimento de *F. oxysporum* não houve diferença quando ambas as vicilinas foram comparadas. O ensaio de disco difusão em placa utilizando vicilinas das cultivares suscetíveis e resistentes de feijão-caupi mostraram

que essas proteínas não interferiram no desenvolvimento hifal dos fungos *F. oxysporum*, *F. solani* e *C. musae* (Gomes *et al.*, 1997).

Vicilinas isoladas de sementes de leguminosas apresentaram inibição do crescimento de leveduras e da acidificação do meio estimulada por glicose em células de leveduras (Gomes *et al.*, 1998). O nível de inibição do crescimento de leveduras foi maior para vicilinas de *V. unguiculata*, 90% e 65% para vicilinas de *Vigna radiata*, no caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Sugeriu-se que vicilinas ligam-se a estruturas contendo quitina de células de leveduras e que essa associação pode resultar na inibição do bombeamento de H⁺, crescimento celular e formação de esporo. Na presença das vicilinas as células de *S. cerevisiae* formam esporos ficando dormentes, ou seja, impedindo assim a emissão do tubo germinativo e seu crescimento, até que o meio esteja favorável à sua germinação e crescimento normal (Gomes *et al.*, 1998).

Em um trabalho mais recente, foi relatada a estrutura cristalina de uma vicilina (SM80.1) purificada de *Solanum melongena* (berinjela), através do método de fracionamento por sulfato de amônio e por cromatografia de exclusão molecular. A determinação da estrutura por cristalografia de raios X mostrou que a estrutura tridimensional da proteína é quaternária. Cada monômero de SM80.1 consiste em dois domínios semelhantes com bolso de ligação hidrofóbica que acomoda cada diferente ligante, acetato e piroglutamato. A estabilidade relativamente alta desses ligantes aniônicos independentes em bolsos semelhantes pressupõe uma exigência estrita de estabilização pelas ligações de hidrogênio com os resíduos carregados, propondo um nível de plasticidade no interior do bolso de ligação (Jain *et al.*, 2016).

A estrutura cristalina geral da vicilina de *Solanum melongena* possui 392 resíduos, consiste em α -hélices, folhas β e alças flexíveis. Um monômero está localizado na unidade assimétrica, e examinando a região em torno da unidade assimétrica, foi revelado que a proteína existe como um homotrímero. A trimerização ajuda a fornecer termoestabilidade à proteína. Em cada monômero é observado a formação da região central por par de β -barris e α -hélices que se projetam para o exterior de cada núcleo para interagir com os monômeros vizinhos, formando um trímero. A estrutura quaternária é estabilizada pelas interações eletrostáticas. O monômero pode ainda ser dividido através de um eixo pseudo-díade em duas

metades similares, possuindo uma região central e braços estendidos, formando dois domínios nomeados N e C-terminal. O íon magnésio (Mg^{+2}) também está presente na estrutura, na interface dos monômeros (Jain *et al.*, 2016). A figura 2 apresenta a estrutura geral da vicilina (SM80.1) de *Solanum melongena* (Jain *et al.*, 2016).

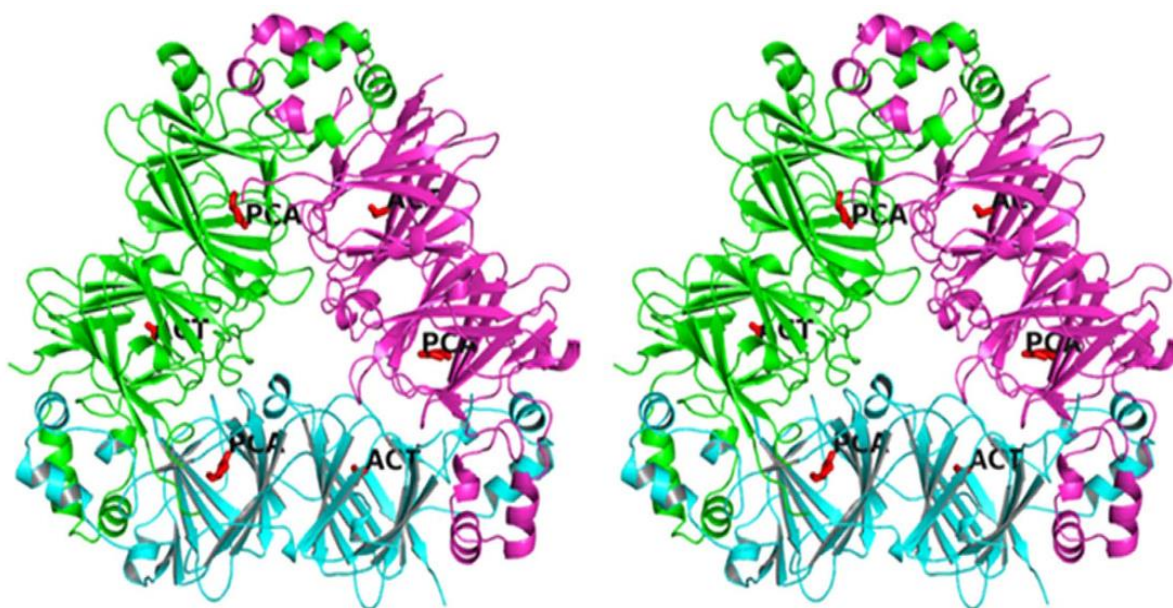


Figura 2: Visualização esquemática da estrutura tridimensional da vicilina (SM80.1) de *Solanum melongena*. Vista estéreo do diagrama de fita da proteína trimérica ao longo do eixo de três dobras de simetria mostrando a estrutura geral da proteína SM80.1. PCA e ACT são piroglutamato e acetato identificados em dois domínios da proteína SM80.1 (Adaptado de Jain *et al.*, 2016).

1.4. Quitinases

As quitinases são enzimas que catalisam a quebra da quitina, componente essencial do exoesqueleto dos insetos. As quitinases possuem massa molecular variando de 20 a 90 kDa. As plantas sintetizam quitinases em resposta a diferentes tipos de estresse. A secreção de quitinases nas plantas ocorre essencialmente como uma substância lítica, direcionada contra patógenos fúngicos ou organismos contendo quitina (Malik & Preeti, 2019). Além disso, elas fazem parte das etapas de crescimento e amadurecimento de frutas, envolvidas no processo de morte celular,

neutralizam metais pesados, o estresse oxidativo e atuam sobre proteínas de armazenamento que ligam íons cálcio com muita eficiência (Collinge *et al.*, 1993). No geral, existem duas classes de quitinases com base na sua ação de hidrólise; endoquitinases e exoquitinases. Endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam a quitina internamente em posições aleatórias e geram multímeros de N-acetil glucosamina. As exoquitinases são subcategorizadas como (i) quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a clivagem da extremidade não redutora da quitina e liberam diacetilquitobiose, ii) N-acetil β -1-4-glucosaminidases (EC 3.2.1.30), que degradam os produtos finais das quitobiosidases; e as endoquitinases, que liberam monômeros de N-acetil glucosamina (Malik & Preetly, 2019).

As quitinases são agrupadas como famílias de glicosil hidrolases (GH): família GH18; família GH19 e família GH20. Diversas funções são efetivadas por essas proteínas que as distinguem em sua localização celular, conformação, domínio catalítico e assim, sua família de genes foi classificada em seis classes: Classe I - estão localizadas no vacúolo, majoritariamente básicas e possuem um domínio catalítico N-terminal com quase 33 kDa; Classe II - estão localizadas extracelularmente em seu apoplasto ou protoplasto, comumente ácidas, com massa molecular de quase 28 kDa. São encontradas principalmente em cotilédones e não exibem atividade antifúngica por não terem o domínio catalítico rico em cisteína; Classe III - hidrolases extracelulares ácidas, com massa molecular de quase 28 kDa; Classe IV - apresentam atividade bifuncional de lisozima/quitinase; Classe V - contêm dois domínios de ligação à quitina; Classe VI - têm um domínio de ligação à quitina truncado e um logo espaçador rico em prolina, mas não são bem caracterizadas (Malik & Preetly, 2019).

Genótipos de sorgo foram analisados quanto à sua resposta ao estresse causado pelo fungo *Fusarium moniforme* ou quando expostos a pulgões. Foram experimentadas situações de infecção pelo fungo, lesões alimentares causadas por insetos pragas como os pulgões e por ferimentos mecânicos. Através desses experimentos, foi observada a expressão de quitinases e β -1-3-glucanases nos tecidos das plantas. Em relação a exposição com os insetos, as atividades das enzimas foram maiores na fase tardia após o ataque dos insetos. O aumento dos níveis de quitinases foi proporcional à intensidade das lesões e ao aumento da população de insetos. As atividades induzidas de quitinase e β -1-3-glucanase

ocorreram em espaços intracelulares e apoplásticos (Krishnaveni *et al.*, 1999). Também foi demonstrada atividade inseticida para quitinase e β -1-3-glucanase isoladas de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) que afetaram drasticamente o desenvolvimento de *C. maculatus* usando um sistema de sementes artificiais (Gomes *et al.*, 1996).

A resposta primária das plantas à ataque de patógenos fúngicos envolve secreção de quitinases degradando a parede celular dos fungos. Inicialmente, as pontas hifais do fungo sofrem inchaço na secreção de quitinases vegetais e depois hifas. Finalmente, estudos apontaram a destruição da parede celular, liberação de diferentes oligossacarídeos e citoplasma vazamento da parede celular. Com tudo, a interação do patógeno fúngico com as plantas resulta indução de várias respostas bioquímicas, incluindo rápido acúmulo de quitinases e β -1, 3-glucanase que degradam quitina e β -1, 3-glucano, o componente crucial da parede celular dos fungos, respectivamente (Collinge *et al.*, 1993, Malik & Preeti 2019).

Quitinases da classe I vacuolar e β -1,3 glucanase de *Nicotiana tabacum* (tabaco) agiram sinergicamente contra a germinação de *F. solani*, resultando na inibição do crescimento e lise das pontas hifais (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Em outros trabalhos também são relatados os efeitos de quitinases e β -1,3 glucanase. Essas proteínas de defesas, isoladas de sementes de feijão-caupi *Vigna unguiculata* (feijão-caupi), foram capazes de inibir o desenvolvimento *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *C. musae* (Gomes *et al.*,1996). Uma quitinase isolada de *Dioscorea opposita* Thumb (inhame) mostrou potencial fungicida, isoladamente ou em conjunto com uma β -1,3 glucanase, contra o oídio em folhas de morango; o oídio foi degradado principalmente pela ação da quitinase (Karasuda *et al.*, 2003).

A ação isolada de quitinases com atividade antifúngica é relatada em outros trabalhos. A expressão de um gene de quitinase (CHIT42) de *Metarhizium anisopliae* em plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* (tabaco) confere uma resistência contra o fungo *Rhizoctonia solani* (Kern *et al.*, 2010). Duas plantas de tabaco selecionadas expressando altos níveis de quitinase (CHIT42) foram firmemente resistentes ao fungo *R. solani*, indicando uma relação direta com a diminuição da região afetada nas folhas prejudicadas pelas lesões fúngicas (Kern *et al.*, 2010). No trabalho de

Pareek *et al.* (2015), mostra-se também a ação sinérgica de quitinases e β -1,3 glucanase induzidas em plantas de *Vigna aconitifolia* resistentes e suscetíveis de 15 dias a 1 mês de idade. A inoculação do patógeno fúngico, *Macrophamina phaseolina*, resultou em uma maior e mais rápida ativação da atividade enzimática, no cultivar resistente que no susceptível, e as atividades foram gradualmente aumentadas ao longo do período de 168h após inoculação quando comparadas ao controle (Pareek *et al.*, 2015).

Em um recente trabalho, uma quitinase de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) classe I (VuChil) foi expressa na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A proteína recombinante de feijão-caupi apresentou 297 resíduos de aminoácidos (número de acesso AIW39714). De acordo com as verificações pelas pesquisas no CDD, a VuChil contém um domínio tipo 1 ChBD (ChtBD1; modelo de domínio CDD: cd06921), também conhecido como domínio heveína (resíduos 1 e 39) e um GH19 CatD (domínio CDD modelo: cd00325; resíduos 51 e 280). A estrutura primária do domínio de ligação à quitina de VuChil (VuChilChBD) contém 8 resíduos de Cys nas mesmas posições encontradas na heveína. A figura 3 mostra a estrutura tridimensional de VuChil (Landim *et al.*, 2017).

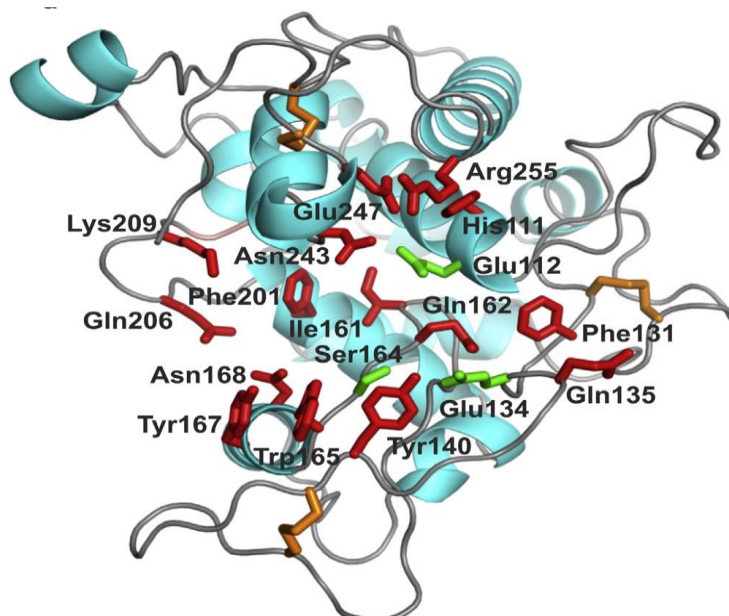


Figura 3: Visualização esquemática da estrutura tridimensional dos domínios catalíticos da quitinase de classe I de *Vigna unguiculata* (VuChil). As cadeias laterais dos resíduos catalíticos são mostrados como bastões verdes, enquanto as cadeias laterais dos outros resíduos que constituem o local de ligação ao substrato são mostradas como bastões

vermelhos. As três ligações dissulfeto são mostrados em laranja (Adaptado de Landim *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a presença de proteínas com potencial de ação inibitória sobre insetos e fungos em sementes da espécie nativa *Clitoria fairchildiana*, com posterior esforço no sentido de isolá-las, caracterizá-las e avaliar os mecanismos de ação destas sobre os organismos-modelo.

2.1. Objetivos específicos

- Fracionar proteínas dos cotilédones de sementes de *C. fairchildiana*;
- Avaliar o potencial de ação inibitória sobre insetos das frações proteicas obtidas;
- Analisar a identidade das proteínas com ações inseticida por espectrometria de massas, ensaios de atividade enzimática e cromatografia de afinidade;
- Avaliar o potencial de ação inibitória sobre fungos das frações proteicas obtidas;
- Avaliar a inibição, *in vitro*, de proteases fúngicas pelas frações proteicas.

CAPÍTULO 1 – Proteínas bioinseticidas de sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard

(O presente capítulo está escrito na forma de artigo, o qual está atualmente submetido a revista Crop Protection, e adota numeração de tópicos independente da numeração dos tópicos anteriormente citados nesta tese. A paginação, entretanto, obedece a paginação da tese.)

Bioinsecticidal proteins from *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard seeds

Dayanni de Souza Padua¹, Gustavo Lemos Rocha¹, André Teixeira da Silva Ferreira², Jonas Perales², Antônia Elenir Amâncio Oliveira¹, Kátia Valevski Sales Fernandes^{1*}.

¹ - Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

² - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Toxinologia, Rio de Janeiro, RJ – Brazil

ORCID of corresponding author: <https://orcid.org/0000-0003-4497-4985>

*Corresponding author: Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000 – Parque California, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil; Phone: (55) 22 27397133; E-mail: cowpkat@uenf.br.

ABSTRACT

Clitoria fairchildiana is a non-domesticated legume tree, whose seeds are exquisitely refractory to insect pests. The chemical arsenal of this species can include proteins with potential insecticide. The present work aimed to identify some of these proteins, using the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* as an insect model. The flour prepared from the crushing of quiescent cotyledons was depigmented before protein

extraction procedures. The extracted proteins were precipitated with ammonium sulfate at 0-60 and 60-90% saturation, and fractionated proteins were quantified and visualized by SDS-PAGE. Because the complexity and richness of the non-precipitated proteins, at the final supernatant, were lower, the sample was subjected to molecular exclusion chromatography and visualized by Tricine-SDS-PAGE. The obtained peaks (P1 and P2) were incorporated into the insect diet through a seed artificial system, in which the natural diet of the insect larva was supplemented with different concentrations of fractions. These bioassays revealed a drastic reduction in the larval weight, with a higher score for the diet supplemented with 1.5% of P1, capable of reducing larval weight by 91.7% compared to the 74% reduction caused by supplementation with 1.5 % of P2. P1 fraction was further subjected to a chitin affinity chromatography, whose profile showed two retained peaks. Protein bands from P1 (29 and 12 kDa) were analyzed by mass spectrometry and revealed similarities to chitinases and vicilins. Chitinase activity was confirmed by the in vitro assay using the blue chitin substrate and chitin affinity chromatography.

Keywords: *Clitoria fairchildiana*; Insecticidal proteins; chitinase; vicilin; *Callosobruchus maculatus*.

Highlights

- *C. fairchildiana* protein fraction reduced at 91.7 % *C. maculatus* larval weight.
- Isolated proteins were a 29 kDa chitinase and a 12 kDa vicilin-like protein.
- Insecticidal proteins displayed a synergic effect when present in P1 fraction.
- The 29 kDa chitinase was active against chitin azure.
- The 29 kDa chitinase was seen to bind to a chitin affinity chromatograph.

1. Introduction

Clitoria fairchildiana (R. A. Howard) is a Fabaceae Brazilian native tree, frequently utilized in rural and urban arborization (Lorenzi, 2002). According to our own observations for the last 15 years and by the scarce data concerning natural insect predators of its seeds, this species seems to harbor a potent defensive chemical arsenal with insecticide activity. The literature brings information only on insect pests that attack leaves of this leguminous such as the lepidopteran *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) and *Hyperchiria incisa* (Zanuncio *et al.*, 2013). There are also records on the psyllid *Euphalerus clitoriae* (Gondim-Júnior *et al.*, 2005), that sucks juvenile branches and leaves, inflicting enormous losses to the plant affected by the infestation.

Throughout evolution, plants have acquired several strategies to defend themselves from predatory herbivorous insects (Barros *et al.*, 2010; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2000). Plants supported the development of defensive strategies, such as the synthesis of toxic proteins (Dang & Van Damme, 2015). Many plant proteins have been discovered with insecticidal abilities: protease inhibitors (Aguiar *et al.*, 2006; Rufino *et al.*, 2013; Abd El-latif, 2015; Valdés-Rodríguez *et al.*, 2015), α -amylase inhibitors (Becker-Ritt & Carlini, 2012; Farias *et al.*, 2007), lectins (Sadeghi *et al.*, 2006), ribosome inactivating proteins (RIPs) (Dang & Van Damme 2015); ureases (Carlini & Ligabue-Braun *et al.*, 2015); arcelins (Osborn *et al.*, 1988).

In addition to these proteins, vicilins and chitinases are also reported as protagonists in the defense of plants against insects. Vicilins are reserve proteins that represent about 70 to 80% of the total seed proteins (Derbyshire *et al.*, 1976). They are formed by combinations of multiple subunits with molecular weight ranging from

20.1 to 94 kDa (Fotso *et al.*, 1994). Vicilin subunits with molecular weight between 12.5 and 35 kDa emerge after proteolysis and post-translation glycosylation (Boulter, 1984). Vicilins from several legume seeds have been shown to be highly toxic to bruchids (Sales *et al.*, 2001; Yunes *et al.*, 1998). In the work of Sales *et al.* (1992), it has been shown that vicilins from resistant african varieties of cowpea seeds were more refractory to enzymatic digestion than those from susceptible cowpea varieties. Resistant vicilins were also seen able to bind to chitinous structures found in insect midguts, besides presenting low digestibility by proteinases from bruchid beetles (Yunes *et al.*, 1998; Sales *et al.*, 2001). Once ingested by *C. maculatus*, vicilins are absorbed through the intestinal epithelium, move into the hemolymph in the form of a trimer and are deposited in the fatty body. Inside the fatty body, they are partially hydrolyzed, and the produced fragments are sent to the eggs, in females. It is suggested that this deposit in eggs is a defense mechanism against the attack of pathogens (Alexandre *et al.*, 2011).

Chitinases are enzymes of about 20 to 90 kDa that catalyze the breakdown of chitin, which is the main constituent of the exoskeleton of insects. Plants synthesize chitinases in response to different types of stress. Expression of chitinases and β -1-3-glucanases was observed in wheat genotypes in response to either infection by the *Fusarium moniforme* fungus or exposition to aphids or mechanical wounding. Regarding to the exposure to insects, these enzyme activities were higher in the latest phases after the attack by insects. The increase in chitinase levels was proportional to the intensity of the lesions and to increases in the insect population. The induced chitinase and β -1-3-glucanase activities were reported in intracellular sites and apoplastic spaces (Krishnaveni *et al.*, 1999). Insecticidal activity was also demonstrated for a chitinase isolated from cowpea seeds (*Vigna unguiculata*) that

drastically affected the development of *C. maculatus* using an artificial seed system (Gomes *et al.*, 1996). The authors have suggested that these defense proteins isolated from legumes could be used, at controlled levels, to promote more protection against insect pests.

In the present work, we identified protein fractions of *C. fairchildiana* seeds, containing a vicilin and a chitinase, which caused relevant weight reduction for the *C. maculatus* larvae.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Mature seeds of *Clitoria fairchildiana* were collected on the municipality of Bom Jesus do Itabapoana - RJ and at the campus of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. They were then dried at 28° C and stored for further work. The voucher number HUENF 9492 has been allocated for the plant material exsiccate deposited in the University Herbarium. The collected seeds were dehulled and seed coats were discarded. The cotyledons were utilized for the obtention of the samples for all the subsequent tests.

2.2. Insect colony

A colony of *C. maculatus* beetle was established and maintained, under controlled conditions, at transparent flasks with perforated covers containing commercial cowpea (*V. unguiculata* cv. fradinho) seeds, purchased from local markets at Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. The flasks were kept on growth chambers at 28 °C and 65 % of relative humidity, at a 12 h light/12 h dark photoperiod.

These insects grown under their natural preferential diet were established as control insects for all the altered feeding tests on the present work.

2.3. Protein extraction from the seeds

Prior to the protein extraction, cotyledons were grounded to a fine powder and then treated with 80 % of methanol at the proportion of 1:5 (w/v) for 15 min under agitation. The suspension was then centrifuged at 4 °C for 5 min at 10000 x *g*. The supernatant was discarded, followed by a new round of the methanol treatment for maximum pigment removal. The sediment was then submitted to a protein extraction procedure in 0.1 M sodium phosphate buffer with 0.5 M of NaCl at pH 7.6 at the proportion of 1:10 (w/v) for 90 min under agitation at 4 °C. Obtained supernatant was heated at 100 °C for 10 min and the material was submitted to a centrifugation at 12000 x *g* for 15 min at 4 °C. The new supernatant was subjected to a protein precipitation procedure with ammonium sulfate at 0-60 % and 60-90 %, as described by Scopes (1993). Protein contents of all fractions, including the final non-precipitated proteins (final supernatant - S), were estimated by the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith *et al.*, 1985).

2.4. Tricine-SDS-PAGE

Protein samples were dissolved in sample buffer containing SDS and β -mercaptoethanol and visualized by tricine-SDS-PAGE, as described by Schagger and von Jagow (1987). Electrophoresis was performed on a Mini Protean II vertical system from BIORAD. The gel was stained with a 2% Brilliant Blue-G 250 solution in water, 35% methanol and 10% acetic acid and subsequently destained with a solution

of 35% methanol and 10 % acetic acid in distilled water. Protein separation occurred at a constant voltage of 22 V, for about 18 h.

2.5. SDS-PAGE Polyacrylamide gel

The protein samples were resuspended in sample buffer (containing SDS and β -mercaptoethanol), boiled for 3 min, centrifuged and applied to wells, and then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (12%) in the presence of SDS, according to the method described by Laemmli (1970). Electrophoresis was performed in a vertical Mini Protean II system from BIORAD. The protein separation proceeded under a constant current of 80V in the first 60 min. and 150V in the remaining time. The gel was stained in 2% Coomassie G bright blue dye solution in water, methanol and acetic acid (6:3:1, v/v/v), for 6 h and decolorized in a bleach solution made up of distilled water, methanol and acetic acid in the same proportionality ratio used in the preparation of the dye solution.

2.6. Size exclusion chromatography

For further protein fractionation, a Sephadex G-50 size exclusion chromatography resin, in a column of 70 x 2 cm, was employed. The column was assembled under gravity action and after proper packing, the resin was washed with 200 mL of 0.01 M of sodium phosphate buffer at pH 7.6.

The final supernatant of the ammonium sulfate protein precipitation step was applied onto the column (30 mg in 1 mL of 0.01 M sodium phosphate pH 7.6) and fractions of 1 mL were collected at a rate of 1 mL/min. The protein content from the collected fractions was estimated by optical measurement of their absorbances by using a spectrophotometer at the wavelength of 280 nm. Samples from identified

peaks were joined and submitted to dialysis against water for 72 h, lyophilized and stored at -20 °C until further use.

2.7. Toxicity assay against the development of *C. maculatus*

The effects of the chromatographic peaks were examined through an insect feeding assay using artificial seeds (400 mg) (Macedo *et al.*, 1993). The seeds were made of *V. unguiculata* cotyledon flour mixed with two different concentrations of the tested peaks (0.5 % and 1.5 %). Artificial seeds placed in glass tubes received two 2 days-age adults fertilized females for 24 h and were maintained at 28 °C, and 65 % relative humidity in growth chamber. Females were then removed, and after removal of eggs excess, three eggs were kept per seed. After 20 days of infestation, seeds were opened, and larva were counted and weighted. Control experiments were performed under the same conditions using only flour made of *V. unguiculata* (cv. fradinho) cotyledons. Experiments consisted of 3 seeds per assay and were run in triplicate (a total of 9 seeds and 27 eggs per tested dose).

2.8. Sample preparation for mass spectrometry analysis

Protein bands were excised from the gel using sterile stainless-steel scalpels, transferred to 0.5 ml tubes, and cut into smaller pieces. Digestion was performed using trypsin (Promega V511A) according to method described by Shevchenko *et al.* (1996).

The Coomassie-stained samples were destained with 0.025 M ammonium bicarbonate for 15 min and then liquid was discarded. This washing procedure was repeated until the destaining was complete, which was determined through visual inspection. The washing solution was then removed, and the gel was dehydrated by

adding 200 μ l of acetonitrile for 5 min. The solvent was removed, and the samples were completely dried in a vacuum centrifuge. Each sample was rehydrated with 15 μ l of ice-cold trypsin solution (20 ng/ μ l in 40 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0) and left on ice for 45 min. After gel reswelling, 20 μ l of 40 mM ammonium bicarbonate was added to the samples followed by incubation for 16 h at 37° C. Following digestion, the peptides were transferred to new 0.5 ml tubes and the gel was re-extracted with 30 μ l of 1:1 (v/v) 5% formic acid/50% acetonitrile under ultrasonication for 10 min. The re-extracted solution was added to the first extracted solution, concentrated to 10 μ l and stored at -20° C for later use.

C18 Zip-Tip micropipette tips were used to desalt the peptides. The tips were first activated with 50% acetonitrile in water and then equilibrated with 0.1% TFA in water. The samples were aspirated and dispensed for eight cycles. The tips were ten times washed with 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) in water. Tip-retained peptides were eluted by 1.5 μ l of 50 %/0.1 % (v/v) TFA in water.

2.9. Protein characterization by mass spectrometry

Reverse-phase nanochromatography coupled with nanoelectrospray high-resolution mass spectrometry was performed for tryptic digest identification. For each sample, 8 μ l of desalted tryptic peptide digest was initially applied to a 2 cm long (100 μ m internal diameter) trap column packed with 3 μ m of 120 A Reprosil-Pur C18 AQ matrix (Dr. Maisch GmbH - Germany) followed by separation on a 12 cm long (75 μ m internal diameter) separation column that was packed with the same matrix directly on a self-pack 10-15 μ m pico tip empty column (home made using a laser puller P 2000 Sutter Instrument CO.). Chromatography was carried out on an EASY-nLC II Instrument (Thermo Scientific, USA). The samples were loaded onto the trap column

at 2000 nl/min, while chromatographic separation occurred at 200 nl/min. Mobile phase A consisted of 0.1% (v/v) formic acid in water and mobile phase B consisted of 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. The gradient conditions were as follows: 2 to 40% B for 58 min and up to 80% B for 2 min. This concentration was maintained for 2 min more before the column was re-equilibrated. The eluted peptides were directly introduced to an LTQ XL/Orbi/Trap MS (Thermo, USA) for analysis. The voltage source was set at 1.9 kV, the capillary temperature at 200 °C and the tube lens voltage at 100 V. The full ion trap value and the MSn AGC target value was 30,000 and 10,000, respectively. The FTMS full AGC target value was set to 500,000. The MS1 spectra were acquired on the Orbitrap analyser (300 to 1,700 m/z) at a 60,000 resolution (for m/z 445.1200). For each spectrum, the 10 most intense ions were submitted to CID fragmentation (minimum signal required of 10,000; isolation width of 2.5; normalized collision energy of 35.0; activation Q of 0.25 and activation time of 30 s) followed by MS2 acquisition on the linear trap analyser. The dynamic exclusion option was enabled. The parameter settings were as follows: repeat count = 1; repeat duration = 30 s; exclusion list size = 500; exclusion duration = 45 s and exclusion mass width = 10 ppm.

The peptide mass profiles were analyzed using Peaks Studio 8 (Bioinformatics Solutions Inc.). Searches were performed using the Uniprot-viridiplantae database with 7000 entries. The search parameters for monoisotopic peptide masses allowed three missed enzymatic cleavage and accepted the carbamidomethylation of the cysteine residues and the oxidation of methionine as fixed and variable modifications, respectively.

2.10. *In vitro* assay of chitinase activity

For each sample (P1 and P2 from Sephadex G50) 5 mg was dissolved in 150 μ l of 100 mM sodium acetate buffer pH 5.0. A 50 μ l volume of each dissolved sample was incubated with 2 mg of chitin azure substrate (chitin covalently linked with Remazol Brilliant violet 3R dye, Sigma) at 37 °C for 1 h. As a control, 50 μ l of 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 was incubated with 2 mg of the substrate. The reaction was stopped with the addition of 50 μ l of 1 M HCl. Then, the suspension was centrifuged at 2000 x *g* for 1 min and the absorbance of the supernatant was measured at 550 nm. The test was performed on 36-well microplates and in triplicate, according Shen *et al.* (2010). The results represent the average of three independent experiments \pm standard error.

2.10. Chitin affinity chromatography

The chitin matrix (Sigma) was previously washed with 0.1 M HCl and hydrated with 0.1 M sodium acetate buffer pH 6.0. The sample was added to the chitin for 30 min before packing the column. An amount of 3 mg of the sample (P1) was added to 3 mL of hydrated chitin in 0.1 M sodium acetate buffer pH 6.0. For the elution of retained samples, solution of 0.1 M HCl and 0.5 M HCl were employed. The chromatography flow was of 700 μ l/min and the absorbance of the samples were read in spectrophotometer in 280 nm.

3. Results and Discussion

3.1. Fractionation of *C. fairchildiana* cotyledon proteins

Plants developed strategies to face the threat of predators. *C. fairchildiana*, the non-domesticated leguminous species here investigated, is particularly competent in this aspect since no insect is known to attack their seeds. In the present work, *C. fairchildiana* seed proteins from a boiled crude extract (BCE) seen by either tricine-SDS-PAGE (Fig. 1A) or SDS-PAGE (Fig. 1B) were precipitated by ammonium

sulphate. At the fractions F 0-60% (lane 2) and F 60-90% (lane 3), the major high molecular mass bands may represent the subunits of oligomeric nutrient reservoir proteins, such as legumains and vicilins, with relative molecular masses higher than 45 kDa. The final supernatant (S) fraction (lane 4) presented a less complex pattern of protein bands in relation to the other two fractions, with one predominant band of low molecular mass (~12 kDa), which could also be visualized in the previous fractions, even in the BCE (lane 1) (Fig. 1A and 1B).

There is scarce information on *Clitoria* seed protein profiles in the literature. Mukherjee and Nandi (2017) reported a polypeptide profile analysis of five *Clitoria ternatea* varieties and showed that their protein bands run within the range of 14 to 89 kDa, with a general lower rate of polymorphism being displayed among varieties. In our study, proteins were mainly seen in an interval between 14 to 66 kDa, and this contrast in relation to Mukherjee and Nandi data is explained, in certain way, as we are dealing with different species and as our extraction procedures were distinct.

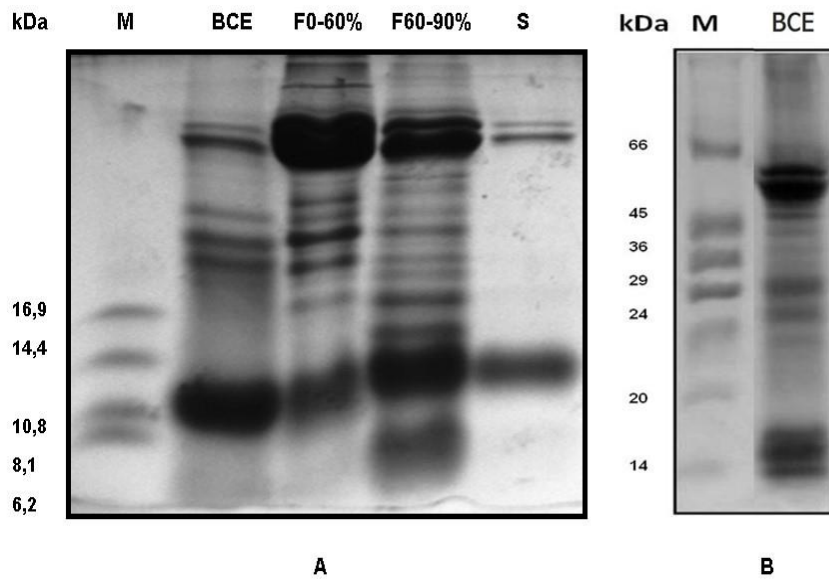


Figure 1: A - Tricine-SDS-PAGE protein visualization of the boiled crude extract (BCE) and of fractions obtained from the BCE protein precipitation with ammonium sulfate. BCE - boiled crude extract; F0-60% - 0-60% fraction; F60-90% - 60-90% fraction; S - supernatant. B - SDS-PAGE protein visualization of the boiled crude extract (BCE). M - molecular mass markers (kDa).

Proteins from the resulting final S were then further separated into two chromatographic peaks (Fig. 2) and revealed as three major protein bands (Fig. 2 - Inset), when separated by tricine-SDS-page, with molecular masses ranging from ~ 12 to 29 kDa. It was possible to note for P1, the presence of two protein bands of ~ 12 and ~ 29 kDa and for P2, apparently the same ~ 12 kDa band and ~ 10 kDa minority band.

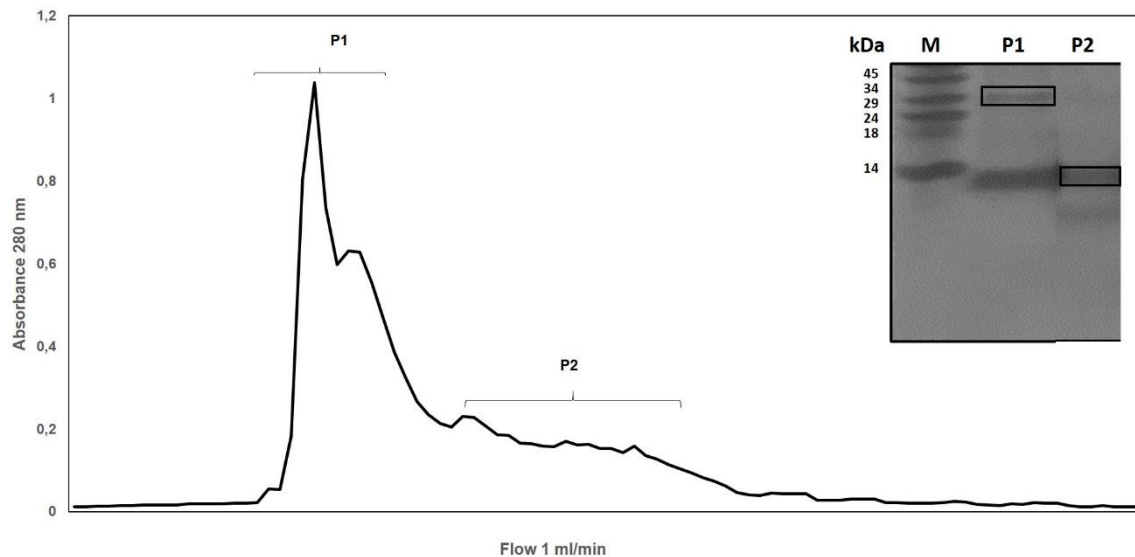


Figure 2: Chromatogram of the S fraction submitted to a Sephadex G-50 chromatography. P1= Protein peak 1; P2= Protein peak 2. Inset: Tricine-SDS-PAGE for visualization of separated fractions along chromatographic separations. M – molecular mass markers (kDa).

3.2. *In vivo* toxicity assay of Sephadex G-50 peaks against *C. maculatus*

The toxicity of the P1 and P2 were analyzed in relation to their interference with the development of *C. maculatus* larvae (Fig. 3 A and B). At the concentration of 0.5% of P1, there was a 78% reduction of the larvae weight and at 1.5 %, the reduction increased to 91.7% (Fig. 3 A), when compared with control larvae. When the larvae were fed with seeds with 0.5% and 1.5 % of P2, their weight suffered reductions of 63% and of 74%, respectively (Fig. 3 B).

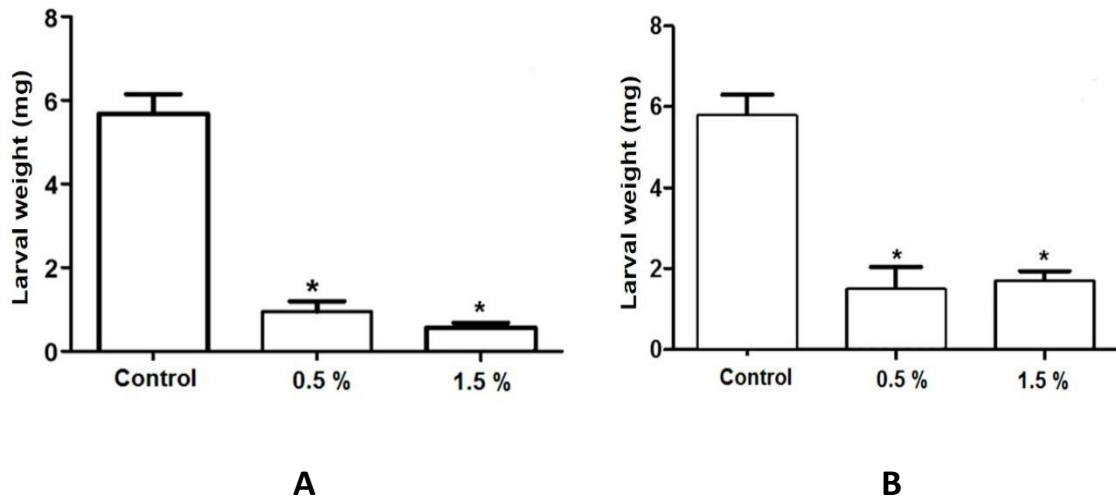


Figure 3: *Callosobruchus maculatus* larval development after feeding on artificial seeds containing 0.5% and 1.5% of Sephadex G-50 chromatographic peaks P1 (A) and P2 (B). The data represent averages (\pm standard error) of three independent experiments. * = $p < 0.05$. Statistical analyses were performed by the Two Way ANOVA/Bonferroni post-test of the software GraphPad Prism.

3.3. Identification of proteins by mass spectrometry

The boxes around bands from P1 and P2 peaks (Fig. 2, inset) indicate the location of the incisions for the protein removal and subsequent analysis by mass spectrometry, whose results are presented on figures 4 A and B.

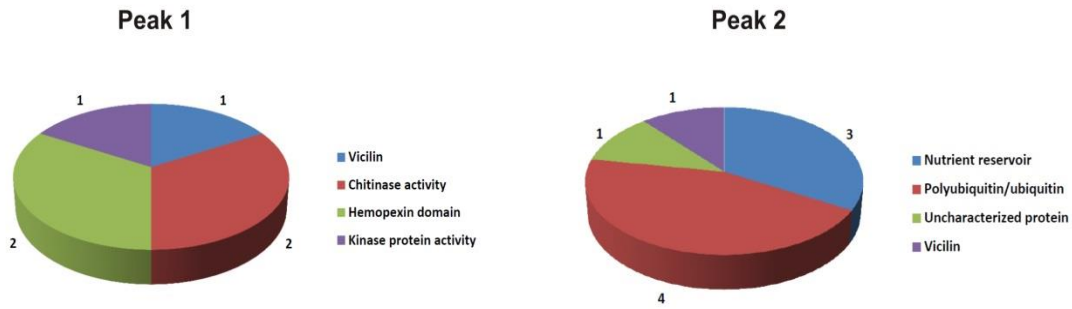
The overall aspect of the protein identification reveals that peptides generated from the 29 kDa P1 band showed similarity to a great number of proteins with hemopexin and chitinase domain and, in a lower degree, with kinase activity and vicilin structure (Fig. 4 A P1). In relation to the ~ 12 kDa P2 originated peptides, the most frequent identity associations were found with ubiquitin/polyubiquitin proteins, followed by nutrient reservoir proteins (Fig. 4 A P2). One uncharacterized protein and one protein identified as a vicilin could also be detected for this second band. When

the vicilin peptide fragments detected both in P1 and P2 were analyzed, it was evident that they were recognized based on the same protein from the databank, a vicilin from *V. unguiculata* (A8YQH5), although the sequences derived from P1 displayed a greater coverage (29%) and a higher $-10\lg P$ score (170.93) than that derived from P2 (10 % of coverage and 139.47 $-10\lg P$ score) (Fig. 4 B). Regarding to the P1 proteins identified as displaying chitinase activity, one of them was recognized based on a yeldin-like protein from *V. unguiculata*, displaying a coverage of 17 % and a $-10\lg P$ score of 128 and the other protein was based on a chitinase from *Canavalia ensiformis*, with a 15 % coverage and a 118.14 of $-10\lg P$ score (Fig. 4 B).

The high reduction at larvae weight of P1 in relation to P2 (Fig. 2) could be causally related to the synergic action of vicilins and chitinases encountered on P1 (Fig.4 A P1). The simultaneous expression of the class 1 tobacco chitinase and β -1-3-glucanase gene class I in tomato plants also presented a synergic effect in the increase of resistance against fungi, whereas tomato plants expressing one of these genes did not show protection against fungal infection (Jongedijk *et al.*, 1995). Vicilins isolated from susceptible and resistant cowpea (*V. unguiculata*) varieties to *C. maculatus* were denatured with urea and fractionated by ion exchange chromatography. The authors showed that the most acidic polypeptides were the most harmful to the insects, being lethal at the level of 2 % (Mota *et al.*, 2002). Yunes *et al.* (1998) isolated vicilins from several legume seeds (*V. unguiculata*, *V. angular*, *Canavalia ensiformis*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*) and tested their action over the development of *C. maculatus*. The authors employed similar purification steps to those used for the *C. fairchildiana* seed vicilin, such ammonium sulfate precipitation (70-90% saturation), dialysis, electrophoresis, western blotting, and chitin affinity chromatography. According to this work, the effective doses for

reducing larval weight in 50% (ED₅₀), which varied from 1.07 to 2.22% suggest that all the vicilins studied, excluding the vicilins from *V. unguiculata* (CE-31) and *V. angularis*, showed a detrimental effect on the development of the larvae. Highly toxic vicilins were also isolated from seed coats of *Albizia lebeck* which showed deleterious effects to the larval development of *C. maculatus* (Souza *et al.*, 2012). At a concentration of 0.1% of the seed coat-isolated vicilin, a 78% decrease in the larval mass was demonstrated. This is in close range with the toxicity found in the present work, where 0.5% of the P1 fraction of *C. fairchildiana* was able to reduce at 78% the *C. maculatus* larval weight. Like *C. fairchildiana*, *A. lebeck* is a native, not domesticated, leguminous plant and also with potential for exploration of defensive proteins in its seeds (Souza *et al.*, 2012).

Protein identification



A

Peak	Code (uniprot)	Gene	Protein	Description	Mass (kDa)	-10lgP	Peptides	Identity (%)	Coverage (%)	Peptide sequences
P1	A8YQH5	Vicilin	Vicilin (<i>Vigna unguiculata</i>)	Vicilin	49,685	170.93	11	100	29	VLFGEEEKQQDEESQOEGVIVQLK DSVILEQGHQAQ GQNNPFYFSDR LHEITPEKNPQLR AILTLVNPDR QIQNLENYR AIVLVVVK NILEASFSDPK QIQNLENYR NQYGHRL FIAFGINAENNQR
P1	Q8H0C9	VuCYLP	Yieldin-like protein (<i>Vigna unguiculata</i>)	Chitinase activity	29,075	128.00	3	100	17	SFAAFGTGDSNTR ALGVDLNNPDLVAR YCDVFGVSYGPNLNCR
P1	O81934	N/A	Chitinase (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Chitinase activity	29,052	118.14	3	100	15	SFGGFGTTGDTNTR ALGVDLNNPDLVAR WTPSAADVAANR
P1	A0A0L9TTN3	LR48_Vig an02g005 500	Non-characterized protein (<i>Phaseolus angularis</i>)	Hemopexin domain, metallic ion bond	25,497	82.55	5	100	14	GKEVLFK TDDKILNLR LHYPGK LHYPGKTDDK QLVGNIR
P1	A0A0S3SUW1	Vigan.08G 363400	Non-characterized protein (<i>Phaseolus angularis</i>)	Hemopexin domain, metallic ion bond	32,828	82.55	5	100	11	GKEVLFK TDDKILNLR LHYPGK LHYPGKTDDK QLVGNIR
P1	D8UI81	VOLCADR AFT_9961 3	Non-characterized protein (<i>Volvox carterii</i>)	Binding to ATP, Kinase protein activity	121,233	62.59	3	100	1	GGGGGGGLGSGGSLR GGGGGGGLGSGGSLR GGGGGGGLGSGGSLR
P2	Q8S9E5	N/A	Long chain of Napin antagonist /calcium dependent kinase protein substrate (<i>Brassica napus</i>)	Nutrient reservoir	10,187	132.32	4	100	44	IPQVSIQPFQK IYQTATHLR QQGQQGQQGQQQQVISR QVSIQPFQK QVSIQPFQK
P2	A0A0D3A6U8	10629770 0	Non-characterized protein (<i>Brassica oleracea</i>)	Nutrient reservoir	20,719	132.32	4	100	22	IPQVSIQPFQK IYQTATHLR QQGQQGQQGQQQQVISR QVSIQPFQK QVSIQPFQK
P2	A0A0S3S36	Vigan.09G 084200	Uncharacterized protein (<i>Vigna angulata</i>)	Nutrient reservoir	52,274	93.59	4	100	11	KIPAGTFFLVNPDNENLRI KQIQNLENYRV KDLDFVSSVDMKE RGENNPFYFSSDRR
P2	M4IU40	UBQ10	Polyubiquitin 10 (<i>Cornus kousa</i>)	Polyubiquitin 10 (fragment)	19,381	77.05	2	100	10	RTLADYNIQKE RTLSDYNIQKE
P2	A0A072UZ56	11434120	Polyubiquitin 3 (<i>Medicago truncatula</i>)	Polyubiquitin 3	42,715	77.05	2	100	5	RTLADYNIQKE RTLSDYNIQKE
P2	R0I9U3	CARUB_v 10012156 mg	Uncharacterized protein (<i>Capsella rubella</i>)	Uncharacterized protein	51,525	77.05	2	100	4	RTLADYNIQKE RTLSDYNIQKE
P2	G7JSV9	11434120	Polyubiquitin 3 (<i>Medicago truncatula</i>)	Polyubiquitin 3	59,714	77.05	2	100	3	RTLADYNIQKE RTLSDYNIQKE
P2	Q2HTU3	MtDRAFT_AC14964 2g23v2	Ubiquitin (<i>Medicago truncatula</i>)	Ubiquitin	60,314	77.05	2	100	3	RTLADYNIQKE RTLSDYNIQKE
P2	A8YQH5	Vicilin	Vicilin (<i>Vigna unguiculata</i>)	Vicilin	49,685	139.47	4	100	10	KIQNLENYRV RAILTLVNPDRD KNILEASFSDPK RQNNPFYFSDRW

B

Figure 4: (A) Proteins identified by mass spectrometry from peptides generated from digestion of bands from peaks P1 (29 kDa) and P2 (12 kDa) grouped according to the protein description provided by the Uniprot databank. (B) List of proteins with best score rates of each protein category provided by the Uniprot databank. Vicilin and chitinase sequences are highlighted in shadowed boxes.

3.4. Confirmation of the chitinase identity for the 29 kDa protein

Chitinase activity of the 29 kDa band extracted from the tricine-SDS-PAGE gel against the chitin azure substrate reached the average OD value of 0.233 nm, while that from the 12 kDa band from P2 was of 0.067 nm, 35 times lower than P1 activity (Fig. 5).

Chitinases were isolated from various parts of plants and purification studies have showed a wide range of molecular masses (25-40 kDa) (Malik & Preeti, 2019). The chitinase identified in this work has the same molecular mass than chitinases isolated from *Hevea brasiliensis*, *Panax ginseng*, *Crocus sativus* and *Vitis vinifera* (Martin, 1991; Ano *et al.*, 2003; Kopparapu *et al.*, 2011). Seed chitinases have been isolated from some plant species, such as : *V. unguiculata* (Gomes *et al.*, 1996); *Adenantha pavonina* (Santos *et al.*, 2004); *Phaseolus vulgaris* (Wang *et al.*, 2012) and *Glycine max* (Chang *et al.*, 2014).

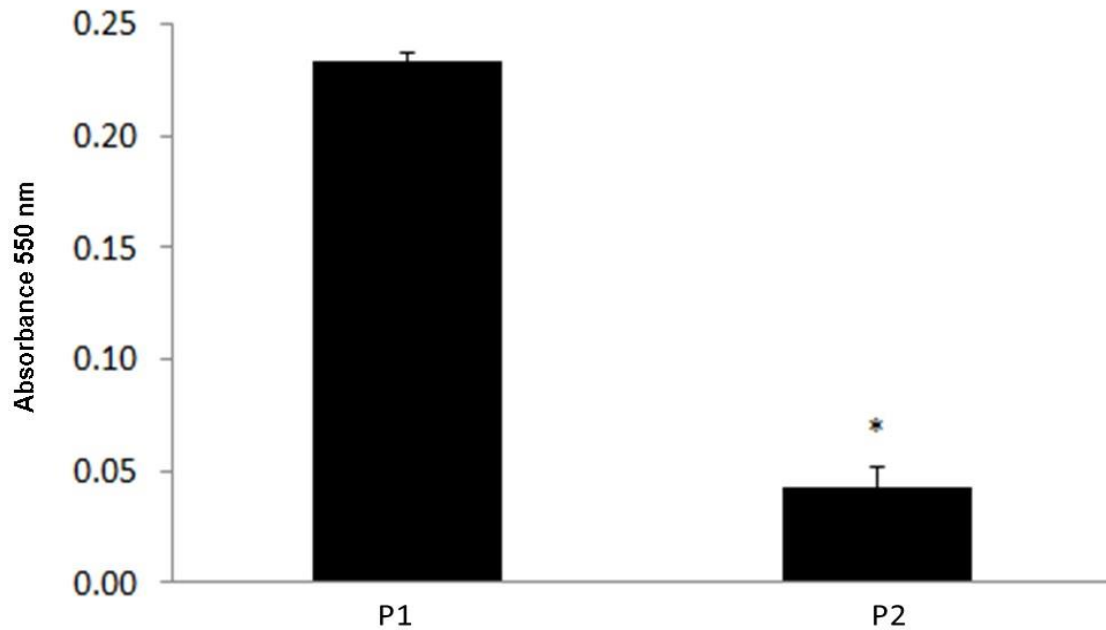


Figure 5: *In vitro* chitinase activity assay of Sephadex G-50 P1 and P2 fractions. The data represent averages (\pm standard error) of three independent experiments. P1= Protein peak 1; P2= Protein peak 2.

Additionally, P1 fraction was also submitted to a chitin affinity chromatography, in order to evaluate its ability to bind to this polysaccharide as well as to better understand the greater effect of P1 in relation to P2 in the *in vivo* assays towards *C. maculatus* (Fig. 2). The chitin affinity chromatography profile showed two retained peaks (Fig. 6). Unfortunately, no protein was visible in any of the retained peaks when tricine-SDS-PAGE gels were run with the samples, even if revealed by silver nitrate protocols.

A standard plant chitinase purification protocol involves precipitation with ammonium sulfate, dialysis and several chromatographic methods followed by electrophoresis, performed by several studies (Malik & Preeti, 2019). A 20.1 kDa chitinase was isolated from black soybean seeds (*Glycine max Tainan*) through precipitation with ammonium sulfate and sequential column chromatographic steps

(Chang *et al.*, 2014). Despite not having visualized a isolated protein band at the end of our purification procedure, these strategies were, indeed, the approaches successfully adopted in the present work.

Toxic activities of chitinases isolated from plants against *C. maculatus* were also reported. A chitinase isolated from *V. unguiculata* seeds negatively affected the insect development in an artificial seed system (Gomes *et al.*, 1996). Plants express chitinases as defense proteins when under attack of organisms that possess chitin, such as fungi pathogens or insects. Insecticide activity was also demonstrated by Kitajima *et al.* (2010), for two uncommon glycosylated chitinases isolated from mulberry (*Morus sp.*) latex and identified as LA-a (50 kDa) and LB-b (46 kDa). The sequences of these proteins showed chitin binding domains. The two-day aged *Drosophila melanogaster* larvae were fed with a diet supplemented with 0.1 % of chitinase LA-a and exhibited an 80 % mortality. A group whose diet was supplemented with the same concentration but of LB-b, was totally disrupted, with a 100 % mortality. These data showed how much the chitinase can display an insecticide potential in low concentrations (Kitajima *et al.*, 2010).

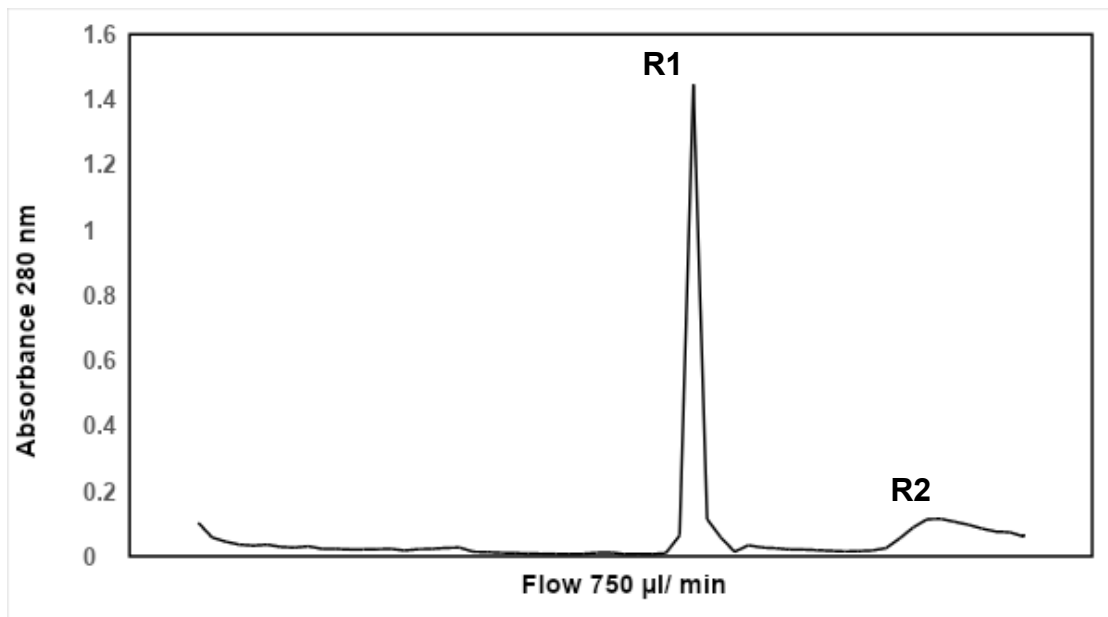


Figure 6: Chitin affinity chromatographic profile of Sephadex G-50 Peak 1 (P1). The fraction R1 (retained 1) was eluted with 0.1 M HCl and the fraction R2 (retained 2) was eluted with 0.5 M HCl.

4. Conclusions

In the present work, the insecticidal action of two cotyledonary protein from native *Clitoria fairchildiana* seeds, a 29 kDa chitinase and a ~ 12 kDa vicilin-like protein, was demonstrated against the target insect *C. maculatus*. A synergic effect of these proteins is predicted in natural seeds or in artificial mix composed of both isolated proteins. This context reinforces the idea that the seeds of native and non-domesticated species of plants can hold up a protein content with toxic potential that can represent a promising alternative in programs of plague or pest control.

5. Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

(CNPq). The first author was supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) MSc research grant.

6. References

- Abd El-latif, A.O. (2015). Protease purification and characterization of a serine protease inhibitor from egyptian varieties of soybean seeds and its efficacy against *Spodoptera litoralis*. *Journal of Plant Protection Research* 55(1):16-25.
- Aguiar, J.M., Franco, O.L., Rigden, D.J., Bloch Jr., C., Monteiro, A.C.S., Flores, V.M.Q., Jacinto, T., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A., Grossi-de-Sá, M.F., Fernandes, K.V.S. (2006). Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 63: 662– 670.
- Alexandre, D., Linhares, R. T., Queiroz, B., Fontoura, L., Uchôa, A. F., Samuels, R. I., Macedo, M. L. R., Bezerra, C. S., Oliveira, E. M., Demartini, D. R., Carlini, C. R., & Silva, C. P. (2011). Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology* 57(6), 801–808. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.010>.
- Ano, A., Takayanagi, T., Uchibori, T., Okuda, T., & Yokotsuka, K.(2003). Characterisation of class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(6), 645-647.
- Barros, F. C., Sagata, É., César, L., Ferreira, D. C., & Juliatti, F. C. (2010). Induction of resistance in plants against phytopathogens. *Bioscience Journal* 26(2), 231–239.
- Becker-Ritt, A. B., & Carlini, C. R. (2012). Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Biopolymers* 98(4), 367–384. <https://doi.org/10.1002/bip.22097>.

- Boulter, D. (1984). Cloning of pea storage protein genes. *Biological Sciences* 304: 323-332.
- Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* 110: 90–109.
- Chang, Y. M., Chen, L. C., Wang, H. Y., Chiang, C. L., Chang, C. T., & Chung, Y. C. (2014). Characterization of an acidic chitinase from seeds of black soybean (*Glycine max* (L) Merr Tainan no. 3). *Plos One* 9(12), 1–15.
- Dang, L., & Van Damme, E. J. M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 117(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>.
- Derbyshire, E., Wright, D. J., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15(1), 3–24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89046-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89046-9).
- Farias, L. R., Costa, F. T., Souza, L. A., Pelegrini, P. B., Grossi-de-Sá, M. F., Neto, S. M., Bloch, C., Laumann, R. A., Noronha, E. F., & Franco, O. L. (2007). Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87(3), 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.08.004>.
- Fotso, M., Azanza, J. L., Pasquet, R., & Raymond, J. (1994). Molecular heterogeneity of Cowpea (*Vigna unguiculata* Fabaceae) seed storage proteins. *Plant Systematics and Evolution* 191(1–2), 39–56. <https://doi.org/10.1007/BF00985341>.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>.
- Gomes, V. M., Oliveira, A.E.A., & Xavier-Filho. (1996). A chitinase and α -1,1-3-

- glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* (Walp)) inhibit growth of fungus and insect pests of the seed. *Journal of the Science of Food Agriculture* 72,86-90.
- Gondim-Junior, M.G.C., Barros, R., Silva, F.R., Vasconcelos, G.J.N. (2005). Occurrence and biological aspects of the *Clitoria* tree psyllid in Brazil. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.) 62: 281-285.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., van Roekel, J. S. C., Bres-Vloemans, S. A., Dekker, I., van den Elzen, P. J. M., Cornelissen, B. J. C., & Melchers, L. S. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica: International Journal of Plant Breeding* 85(1), 173–180. <https://doi.org/10.1007/BF00023946>.
- Kitajima, S., Kamei, K., Taketani, S., Yamaguchi, M., Kawai, F., Komatsu, A., & Inukai, Y. (2010). Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. *BMC Biochemistry* 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-6>.
- Kopparapu, N. K., Liu, Z., Fei, F., Yan, Q., & Jiang, Z. (2011). Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. *Process Biochemistry* 46(6), 1370–1374. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.015>.
- Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Wilde, G., & Manickam, A. (1999). Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Science* 144(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00049-7).
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 - 685.

- Lorenzi, H.(2002). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 1, 4ª edição. Instituto Plantarum.
- Macedo, M. L. R., L. B. S. Andrade, R. A. Moraes & J. Xavier-Filho. 1993. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry Physiology* 105C: 89-94.
- Malik, A., & Preety. (2019). Purification and properties of plant chitinases: A review. *Journal of Food Biochemistry* 43(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12762>.
- Martin, M.N. (1991). The latex of *hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozimas. *Plant Physiology* 95(2):469-476.
- Mota, A.C., Sales Fernandes, K. V., Pereira Sales, M., Quintana Flores, V. M., & Xavier-Filho, J. (2002). Cowpea vicilins: Fractionation of urea denatured subunits and effects on *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) development. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45(1), 1–5. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132002000100001>.
- Mukherjee, A., Nandi, Asis. (2017), SDS-PAGE analysis of seed protein of five floral morphotypes of *Clitoria ternatea* L. *Original Research Paper* (6)2277-8179.
- Osborn, T.C., Blake, T., Gepts, P., Bliss, F.A. (1988). Bean arcelin 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 847–855.
- Rufino, F.P.S., Pedroso, V.M.A., Araujo, J.N., França, A.F.J., Rabêlo, L.M.A., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E.A., Franco, O.L., Oliveira, A.S. (2013). Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against seeds against insect-pests digestive proteinases. *Plant Physiology Biochemistry* 63: 70 - 76.

- 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. *Phytochemistry* 67(18), 2078–2084. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.032>.
- Sales, M. P., Macedo, M.L.R., Filho, J.X. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and Bruchid (insect) midgut proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103 B: 945-950.
- Sales, M. P., Gerhardt, I. R., Grossi-de-Sa, M. F., & Xavier-Filho, J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against Bruchids? *Plant Physiology* 124(2), 515–522. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.515>.
- 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(1), 27–34. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100003>.
- Santos, I. S., Da Cunha, M., Machado, O. L. T., & Gomes, V. M. (2004). A chitinase from *Adenantha pavonina* L. seeds: Purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Science* 167(6), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.021>.
- Schägger, H., Von-Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368 - 379.
- Scopes, R.K. (1993). Protein purification: Principles and practice. *Biochemistry & Biophysics* 1-21.
- Shen, C.R., Chen, Y.S., Yang, C.T., Chen, J.K., Liu, C.L. (2010). Colloid chitin azure

- is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible, assay. *Journal of Biomolecular screening* 15, (2), 213-217.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass Spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68,5,850-858.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Osion, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76 - 85.
- 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*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45(2), 118–124. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500008>.
- Valdés-Rodríguez, S., Galván-Ramírez, J. P., Guerrero-Rangel, A., & Cedro-Tanda, A. (2015). Multifunctional amaranth cystatin inhibits endogenous and digestive insect cysteine endopeptidases: A potential tool to prevent proteolysis and for the control of insect pests. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 62(5), 634–641. <https://doi.org/10.1002/bab.1313>.
- Wang, S., Ye, X., Chen, J., & Rao, P. (2012). A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *Food Research International* 45(1), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.010>.
- Yunes, A. N. A., de 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)). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76(1), 111–116.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199801\)76:1<111::aidjsfa9323.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199801)76:1<111::aidjsfa9323.0.co;2-4)

Zanuncio, J.C., Parreira, D.S., Mielke, O.H.H., Ramalho, F.D.S., Serrão, J.E.,
Zanuncio, T. V. (2013). *Hiperchiria incisa* (Lepidoptera: Saturniidae) on plants of
Clitoria fairchildiana. *Journal Lepidopterists Society* 2: 131 - 133.

CAPÍTULO 2 – Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard

(Esse capítulo está escrito de forma convencional, nos moldes das normas de teses regularmente apresentadas neste PGBB e retoma a numeração dos tópicos anteriores ao Capítulo 2, bem como segue a paginação. As etapas relativas à purificação, caracterização e identificação das proteínas isoladas foram como descritas anteriormente no capítulo 1).

3. MATERIAIS

3.1. Materiais biológicos

Sementes maduras de *Clitoria fairchildiana* foram coletadas no município de Bom Jesus do Itabapoana - RJ e no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, entre os meses de abril e maio. Elas foram então secas a 28 °C e armazenadas para trabalhos futuros. O número do comprovante HUENF 9492 foi atribuído à exsicata de material vegetal depositada no herbário da Universidade. As sementes coletadas foram descascadas e os tegumentos de sementes foram descartados. Os cotilédones foram utilizados para a obtenção das amostras para todos os testes subsequentes.

As leveduras *Candida albicans* (cepa CE022), *Candida buinensis* e os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* foram cultivados em meio Sabouraud (peptona 10 g/l, D(+) glicose 20 g/l, ágar-ágar 17 g/l) (Merck S/A), e conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos (LFBM), do Centro de Bociências e Biotecnologia (CBB), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4. MÉTODOS

CAPÍTULO 2: Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard

4.1. Obtenção de células de leveduras

Inóculos das células das leveduras *Candida albicans* e *C. buinensis* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram incubadas em estufa por um período de 2 dias a 30 °C. Após este período, as células foram utilizadas no ensaio no qual, com o auxílio de uma alça de semeadura, colônias foram retiradas e adicionadas a 10 ml de meio de cultura (caldo Sabouraud), para que se fizesse a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer (Optik Labor), através do uso de um microscópio óptico (Axio Imager.A2).

4.2. Obtenção de esporos de fungos filamentosos

Os fungos *Fusarium solani* e *F. oxysporum* foram transferidos do estoque e colocados para crescer em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud, por aproximadamente 15 dias a 30°C. Após esse período, 10 ml de caldo Sabouraud foram vertidos sobre as placas contendo os fungos e os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gaze, para evitar a passagem de restos miceliais que pudessem estar em solução juntamente com os esporos. Esses esporos foram então quantificados em câmara de Neubauer (Optik Labor), na presença de um microscópio óptico (Axio Imager.A2).

4.3. Análise de inibição do crescimento de leveduras e dos fungos filamentosos

Após quantificação, as células das leveduras *C. albicans* e *C. buinensis* e dos fungos filamentosos *F. solani* e *F. oxysporum* (1×10^4 células.ml⁻¹) foram incubadas em 200 µl de caldo Sabouraud contendo 200 µg.ml⁻¹ dos picos P1e P2, obtidos a partir da cromatografia em Sephadex G-50. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), incubadas a 30 °C por um período de 24h, para as leveduras e 48h, para os fungos filamentosos. Para a observação da inibição do crescimento das células fúngicas, foi determinada a

densidade óptica calculada a partir de leituras em um leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom), a 620 nm realizadas nos tempos de 24 ou 48h. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

4.4. Zimografia do extrato micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*

Os fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* foram cultivados em caldo Sabouraud por 48h e 72h. O micélio foi recuperado por centrifugação a 12000 x g por 30 min e macerado sob nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. As proteínas solúveis foram extraídas por agitação durante 30 min a 4°C com tampão fosfato 50 mM, contendo 10 mM de EDTA e 2,5 mM de DTT (pH 6,0) (1:3 m/v). O homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi recuperado. As amostras de proteínas do extrato micelial foram incubadas com diferentes concentrações das frações P1 e P2 da cromatografia de exclusão molecular por 15 min a 37°C. Em seguida a atividade proteolítica foi analisada em 0,1% de gelatina SDS-PAGE. SDS-PAGE com gelatina 0,1% das amostras foi incubado com tampão citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, triton x-100 0,1% e DTT 1,5 mM pH 5.6 por 15 min a 37°C. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e corado com Coomassie brilhante azul R 2% em água, metanol e ácido acético (na proporção de 6:3:1, v/v/v) e posteriormente descorado com uma solução composta de água destilada metanol e ácido acético.

5. RESULTADOS

CAPÍTULO 2: Ação antifúngica de frações proteicas de sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard

O crescimento das células das leveduras *C. albicans* e *C. buinenses* na ausência e presença de 200 µg.mL⁻¹ dos picos P1 e P2 da cromatografia de Sephadex G-50 foi analisado. O pico P1 inibiu em 32,5 % o crescimento celular de *C. albicans* e P2 inibiu 21,5 % o crescimento desta levedura (Figura 4). No

entanto, os picos P1 e P2 não inibiram o crescimento da levedura *C. buinenses* (Figura 5).

Os picos P1 e P2 também foram testados contra fungos filamentosos *F. solani* e *F. oxysporum*. Entretanto ambos os picos não foram capazes de inibir significativamente o crescimento do fungo *F. solani* na concentração ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 6). Para *F. oxysporum*, o P1 foi capaz de inibir 10,4 % e P2 15,9 % do crescimento celular utilizando a concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 7).

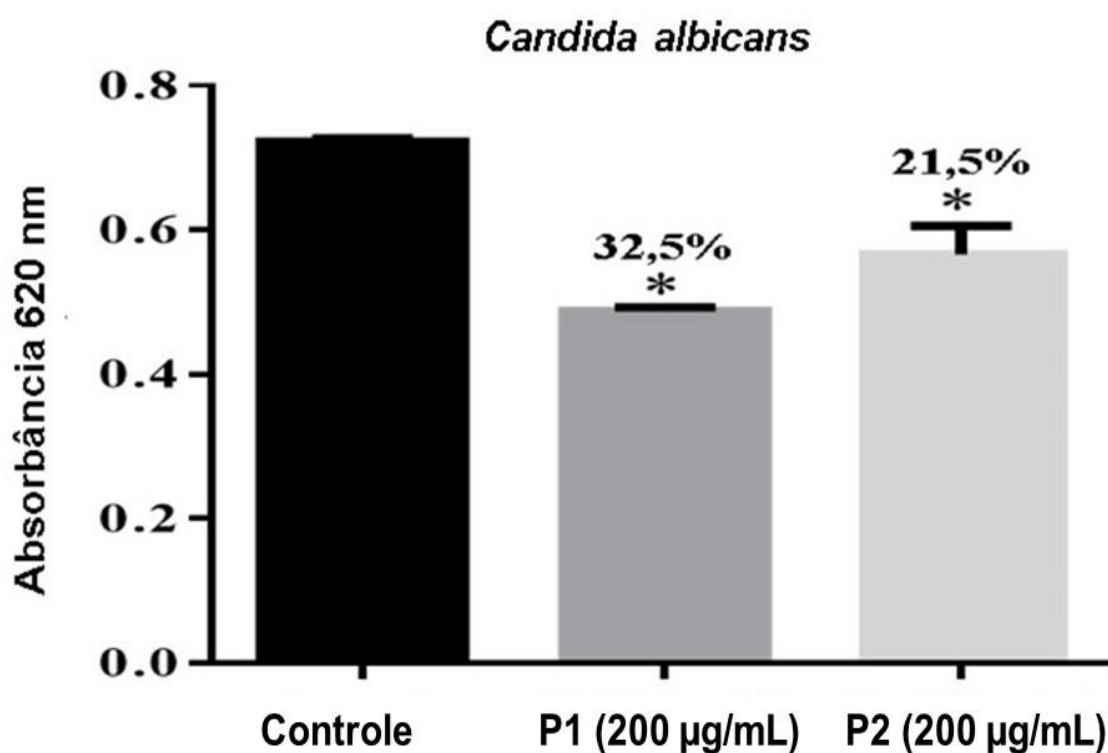


Figura 4: Ensaio de crescimento de *C. albicans* na presença dos picos P1 e P2 oriundos da cromatografia de exclusão molecular do extrato aquecido de *Clitoria fairchildiana*. O crescimento foi avaliado após 24 h. O experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0.05$.

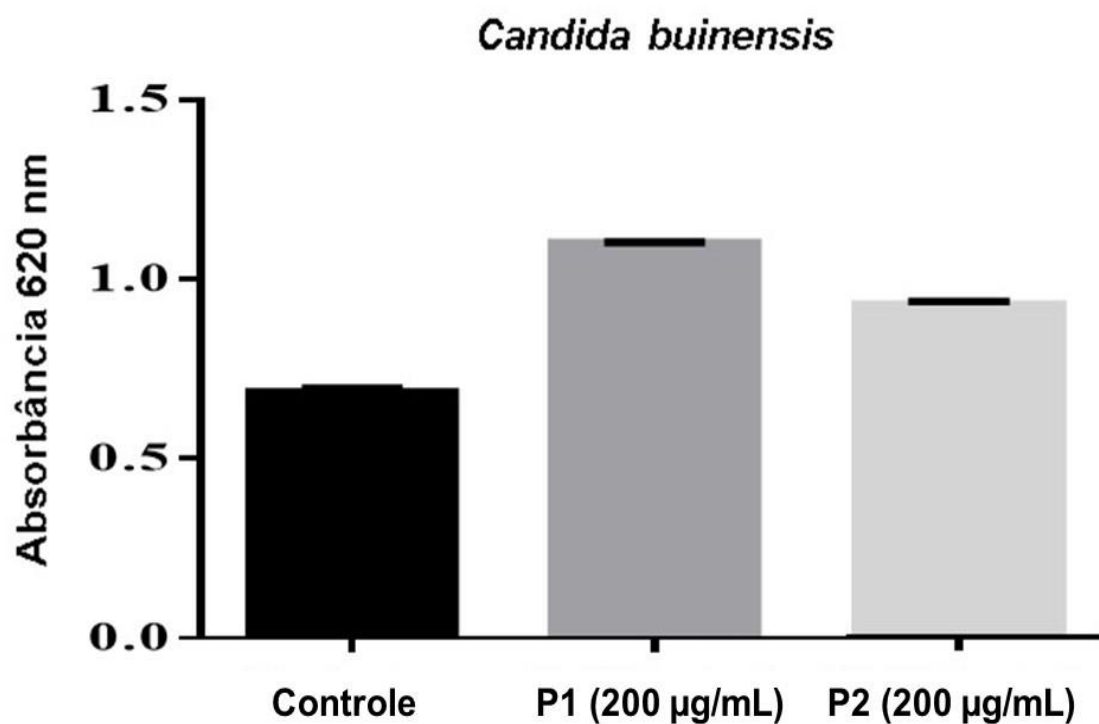


Figura 5: Ensaio de crescimento de *C. buinensis* na presença dos picos P1 e P2 oriundos da cromatografia de exclusão molecular do extrato aquecido de *Clitoria fairchildiana*. O crescimento foi avaliado após 24 h. O experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0.05$.

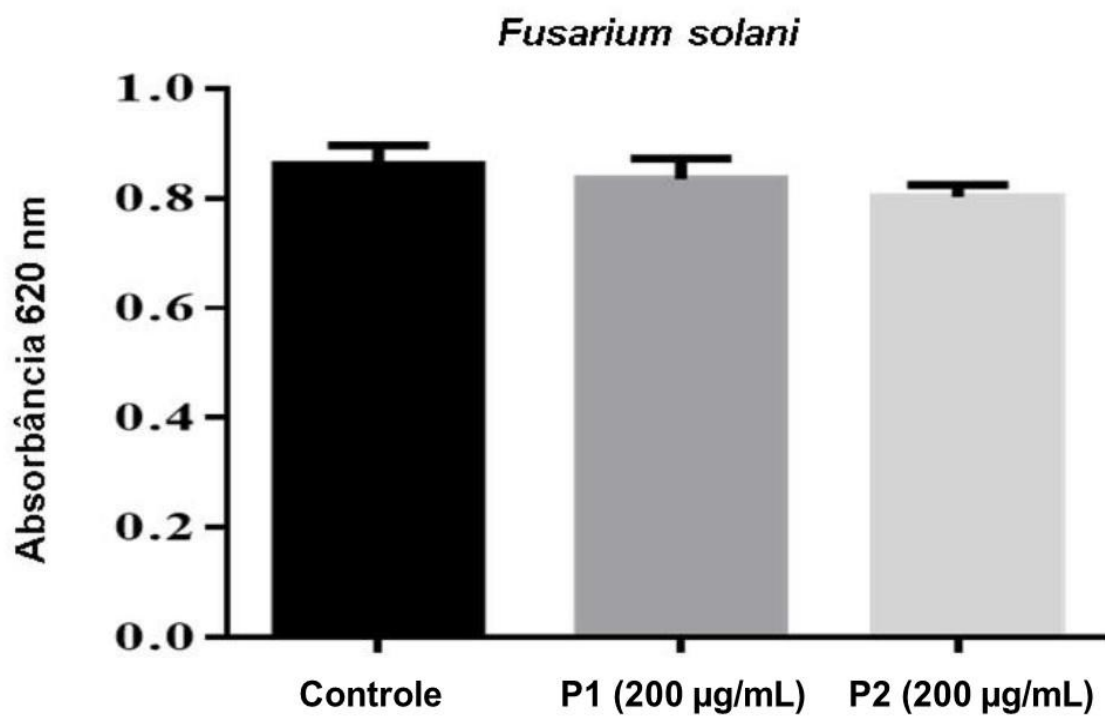


Figura 6: Ensaio de crescimento de *F. solani* na presença dos picos P1 e P2 oriundos da cromatografia de exclusão molecular do extrato aquecido de *Clitoria fairchildiana*. O crescimento foi avaliado após 48 h. O experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0.05$.

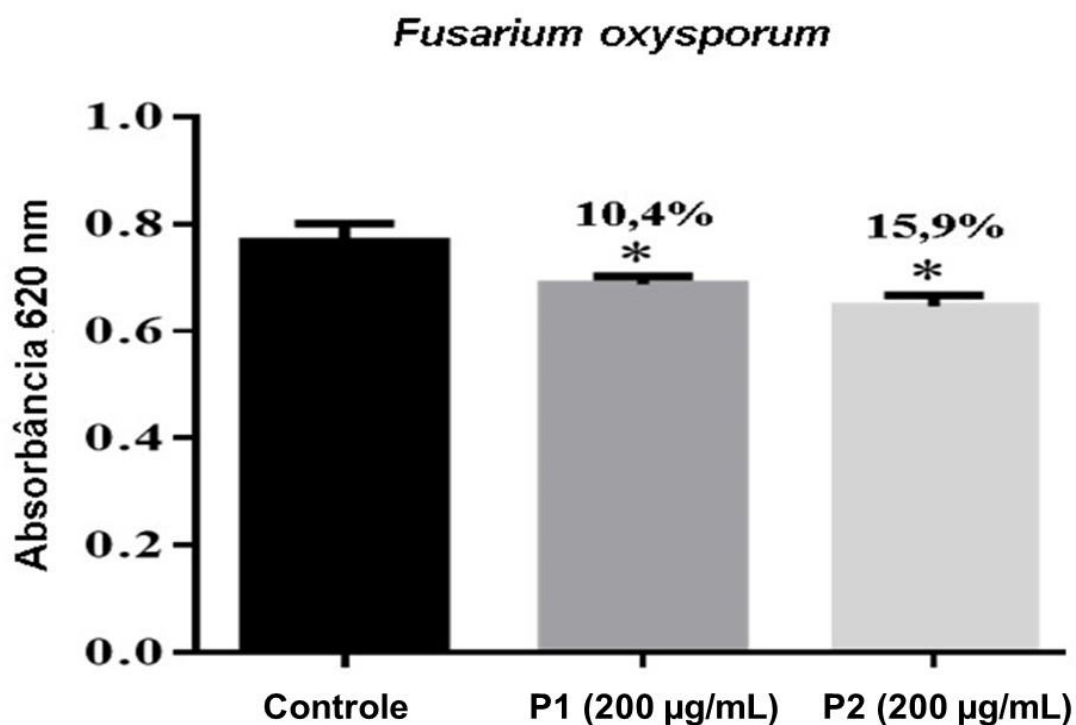


Figura 7: Ensaio de crescimento de *F. oxysporum* na presença dos picos P1 e P2 oriundos da cromatografia de exclusão molecular do extrato aquecido de *Clitoria fairchildiana*. O crescimento foi avaliado após 48 h. O experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0.05$.

Com o intuito de investigar a presença de eventuais proteínas nas frações cromatográficas que tenham ações diretas sobre processos proteolíticos das células fúngicas, avaliamos a susceptibilidade de proteases do extrato micelial dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, antes e após incubações com tais frações cromatográficas. Os picos P1 e P2 foram visivelmente capazes de reduzir a atividade de proteases do extrato micelial do fungo *F. solani* cultivado em meio líquido por 72 h (Figura 8), mas menos eficazes na interferência na atividade de proteases do fungo *F. oxysporum* (Figura 8).

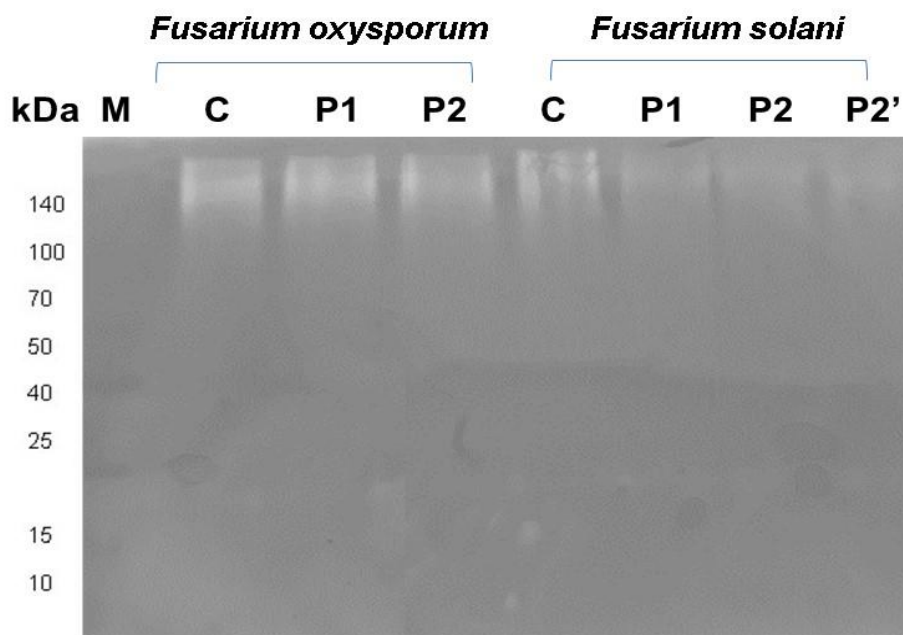


Figura 8: Imagem em zimografia em SDS-PAGE a 12% contendo 0,1% gelatina. Controle de *F. oxysporum* 48h (C); *F. oxysporum* 48h + P1 (P1); *F. oxysporum* 48h + P2 (P2); Controle de *F. solani* 72h (C); *F. solani* 72h + P1 (P1); *F. solani* 72h + P2 (P2); *F. solani* 72h + P2' (P2). As enzimas e amostras foram incubadas a 37°C na proporção (massa/volume) de 1:2 e 1:3 (P2') (enzimas dos fungos: amostras dos picos Sephadex G-50).

6. DISCUSSÃO

Uma variedade de proteínas antifúngicas, envolvidas na defesa de planta e que se encontram na família das proteínas relacionadas a patogênese – PRs, foram isoladas de plantas leguminosas (Wang, 2009). Resultados obtidos neste trabalho mostraram que as frações P1 e P2 possuem atividade antifúngica contra dois fungos dos quatro que foram testados, e por análise de sequência de aminoácidos de proteínas presentes nestas frações, identificamos uma vicilina e uma quitinase na fração P1 e uma viclina na fração P2. Gomes *et al.* (1998) sugerem que os efeitos inibitórios de vicilinas das sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) sobre o crescimento dos fungos pode ser realizado pela capacidade destas se ligarem às superfícies celulares dos microrganismos, em paredes celulares e/ou membranas plasmáticas. Esse mesmo grupo de pesquisa mostrou, por microscopia eletrônica de varredura, que as vicilinas prejudicam o crescimento e inibem a germinação do fungo *F. oxysporum*, e

causavam o desenvolvimento anormal de esporos contra as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Em 2007, Ribeiro *et al.* reportaram igualmente ação antifúngica de proteínas com homologia a vicilinas de sementes de melão (*Cucumis melo* L). Comparando com o trabalho de Ribeiro *et al.* (2007), onde uma concentração de 250 µg/ml da vicilina inibiu 35% o crescimento do fungo *F. oxysporum*, neste trabalho com *Clitoria fairchildiana*, a fração de vicilinas (P2) foi capaz de inibir em menor proporção (15,9 %), o crescimento de *F. oxysporum* (figura 7). Quando testada a fração P1 (figuras 6 e 7) no ensaio de inibição do crescimento em meio líquido também de *F. oxysporum*, a inibição foi de apenas 10,4 %, na mesma concentração. Sugere-se que o efeito da ação em conjunto dessas proteínas, na concentração testada, não foi muito eficaz na inibição de *F. oxysporum*. O efeito sinérgico de quitinases de planta com outras proteínas atuando na defesa de plantas foi proposto no trabalho de Jangedijk *et al.* (1995). A expressão simultânea dos genes de quitinase e β-1-3-glucanase de classe I de tabaco em tomates transgênicos provocou um aumento na resistência contra fungos, enquanto plantas de tomate expressando um ou só o outro gene não apresentaram proteção contra a infecção fúngica (Jangedijk *et al.*, 1995).

Trabalhos mais recentes mostraram a purificação de peptídeos antimicrobianos com homologia a vicilinas de sementes de pimenta (*Capsicum baccatum*) (Bard *et al.*, 2014). Nas concentrações de 100 e 200 µg/ml de vicilinas, não foi detectada atividade antifúngica contra as células de *S. cerevisiae*. Na concentração de 200 µg/ml, demonstrou inibição em 40% para *C. tropicalis*, 70% o crescimento de *K. marxianus* e 80% o crescimento de *C. albicans* (Bard *et al.*, 2014). A fração P1, inibiu em 32% o crescimento de *C. albicans* (figura 4). Sugere-se que os peptídeos de similares a vicilina de sementes de *C. baccatum* demonstram diferentes níveis de atividade antifúngica dependendo das espécies os fungos das quais foram testadas, para a fração P1 sugere-se também essas especificidades.

As quitinases, como já bem estabelecido, são proteínas relacionadas à patogênese. Trabalhos diversos relatam sobre as funções destas proteínas isoladas de diversas plantas e seu potencial antifúngico (Malik & Preety, 2019).

Diversas culturas agrícolas são acometidas por infecções fungicas, provocando grandes perdas no seu rendimento (Toufiq *et al.*, 2018). Uma quitinase isolada de *Phaseolus vulgaris* inibiu o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola*, entre outros fungos fitopatogênicos testados (Chu, 2005). No trabalho de Wang (2009), uma quitinase isolada de *Phaseolus vulgaris* teve ação inibitória contra as espécies de fungos *Botrytis cinerea*, *Rhysalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* e *Pythium ophanidermatum*, utilizando de 140 µg a 210 µg da enzima.

Trabalhos recentes têm demonstrado o potencial antifúngico de quitinases. Tariq *et al.* (2018) avaliaram linhagens transgênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) modificadas com o gene de quitinase II da cevada (*Hordeum vulgare*) para adquirir defesa contra o agente causador da podridão vermelha, *Colletotrichum falcatum*. Quatro linhagens transgênicas de cana-de-açúcar superexpressando a quitinase classe II foram eficazes na inibição do crescimento micelial de *C. falcatum* em 49%, 40%, 56% e 52%. Duas das linhagens transgênicas também exibiram alta resistência contra *C. falcatum* inoculado em um bioensaio *in vitro*, visto que se mantiveram com aspectos saudáveis quando comparadas com as plantas controle de cana-de-açúcar, mostrando assim o papel de defesa das quitinases (Tariq *et al.*, 2018).

Em outro trabalho, um gene de quitinase I foi isolado do DNA genômico da cultivar de cevada (*Hordeum vulgare*) Haider-93 (Toufiq *et al.*, 2018). A quitinase recombinante demonstrou inibir significativamente o crescimento micelial de importantes fungos fitopatogênicos, tais como *Alternaria solani*, *Fusarium spp*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* nas concentrações de 80 µg e 200 µg. Um expressivo atraso de crescimento micelial foi visualizado no crescimento de *A. solani*, *Fusarium spp* e *V. dahliae* com 200 µg de quitinase recombinante purificada, enquanto que na região ao redor dos poços onde foi aplicado 80 µg da proteína apresentou uma menor inibição (Toufiq *et al.*, 2018). Para *R. solani*, uma menor inibição foi observada na concentração de 80 µg em comparação aos outros fungos testados, e com 200 µg uma zona de inibição pode ser observada (Toufiq *et al.*, 2018).

A fração P1 do presente trabalho, onde a presença de uma quitinase de 29 kDa é acreditada, ao contrário da eficácia observada pelos trabalhos acima descritos, quando testada contra o crescimento de *F. oxysporum* e *F. solani* em concentrações de 200 µg/ml, não inibiu o crescimento de *F. solani* e inibiu apenas em 10,4% o crescimento de *F. oxysporum*. Em virtude de sua presença estar associada a outras proteínas presentes na fração, como proteína semelhante à vicilina de ~ 12 kDa, sugere-se que a concentração testada efetivamente é muito inferior à necessária para a consecução dos efeitos tóxicos.

A co-evolução de plantas e patógenos resulta em diversificação e adaptação que molda o estilo de vida de patógenos, gerando ainda mais resistências dos patógenos. Os fungos filamentosos secretam diversos tipos de enzimas hidrolíticas, principalmente proteases, revisado em vários trabalhos (Nirmal *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Posterior à penetração no hospedeiro, os patógenos fúngicos secretam uma imensidade de efetores para desenvolver a doença, entre eles proteases que degradam as proteínas antimicrobianas das plantas e inibidores de proteases com atividade antimicrobiana (Nirmal *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). No entanto, as plantas secretam proteases e inibidores de proteases para se defenderem contra patógenos ou para mediar o reconhecimento de proteases e inibidores de proteases de patógenos, o que proporciona à indução de respostas de defesa (Jashni *et al.*, 2015).

As frações P1 e P2 foram notadamente capazes de reduzir a atividade proteolítica do extrato micelial do fungo *F. solani* (figura 8, raias 3, 4 e 5), mas os picos foram menos eficazes na atividade de proteases do fungo *F. oxysporum* (figura 8, raias 2 e 3). O fungo *F. oxysporum* apresentou ser mais refratário às frações. Várias proteases dos fungos são ativas em uma ampla faixa de pH (pH 4 a 11), o que pode contribuir para a resistência dos fungos (Nirmal *et al.*, 2011).

No trabalho de van den Burg *et al.* (2006), os autores relatam como pode ocorrer uma resistência de um patógeno em relação a uma quitinase de planta. Nesse trabalho foi relatado que a resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* é devido as proteínas Cf do tomate (*Solanum lycopersicum*), que fazem parte da classe de proteínas do tipo receptor e reconhecem indiretamente proteínas de avirulência (Avrs) extracelulares do fungo. Nessa pesquisa, relata-se sobre a

Avr4, que é uma lectina com domínio de ligação à quitina que contém um domínio de ligação a quitina de invertebrado (CBM14). Identificaram que a interação do Avr4 com a quitina é específica, já que não interage com outros polissacarídeos da parede celular (van den Burg *et al.*, 2006). O Avr4 se liga a oligômeros de quitina com um tamanho mínimo de três resíduos de N-acetilglucosamina. Ensaio *in vitro* mostraram que o Avr4 protege a quitina contra a hidrólise pelas quitinases das plantas. O Avr4 se liga à quitina nas paredes celulares dos fungos *Trichoderma viride* e *Fusarium solani* protegendo contra concentrações que comumente seriam deletérias de quitinases de plantas (van den Burg *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi visto que a fração P1, contendo as bandas de 29 e ~ 12 kDa potencialmente relacionadas a quitinases e vicilinas, respectivamente, foi tóxica ao inseto *C. maculatus*, demonstrando que pode ocorrer a atuação em conjunto dessas proteínas, potencializando assim o efeito inseticida sobre o desenvolvimento larval desses insetos. A ação antifúngica da mesma fração foi restrita a fungos do gênero *Fusarium* e de baixa eficácia na concentração testada. Os resultados do presente trabalho reforçam a ideia de que sementes de espécies nativas e não domesticadas possuem um conteúdo de proteínas com potencial de toxicidade a pestes e patógenos vegetais. Sugere-se que o potencial antifúngico dessas proteínas dependerá da concentração da proteína de defesa e do fungo alvo a ser testado.

7. CONCLUSÃO

- A fração P1 inibiu em 32,5 % o crescimento de *Candida albicans* e a fração P2, 21,5%. P1 inibiu 10,7 % e o P2 15,9% do crescimento de *F. oxysporum*;
- Observou-se redução da atividade de proteases em pH 5.6 do extrato micelial do fungo *F. solani* por zimografia ;
- As proteínas das frações P1 e P2 apresentaram atividade tóxica contra o inseto *C. maculatus* causando a diminuição do peso larval deste inseto. P1 reduziu em 91,7% e P2 74% na concentração de 1,5%;
- A fração P1 e P2 mostraram fragmentos peptídicos similares a vicilina de *V. unguiculata*;
- A fração P1 possui uma proteína com similaridade a quitinase.

8- REFERÊNCIAS

- Abd El-Atif, A.O. (2015). Protease purification and characterization of a serine protease inhibitor from Egyptian varieties of Soybean seeds and its efficacy against *Spodoptera littoralis*. *Journal of Plant Protection Research*. 55(1):16-25.
- Aguiar, J.M., Franco, O.L., Rigden, D.J., Bloch Jr., C., Monteiro, A.C.S., Flores, V.M.Q., Jacinto, T., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A., Grossi-de-Sá, M.F., Fernandes, K.V.S. (2006). Molecular Modeling and Inhibitory Activity of Cowpea Cystatin against Bean Bruchid Pests. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 63: 662- 670.
- Alexandre, D., Linhares, R.T., Queiroz, B., Fontoura, L., Uchôa, A.F., Samuels, R.I., Macedo, M.L.R., Bezerra, C. S., Oliveira, E. M., Demartini, D.R., Carlini, C.R., & Silva, C.P. (2011). Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*. 57(6):801–808. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.010>.
- Amirhusin, B., Shade, R.E., Koiwa, H., Hasegawa, P.M., Bressam, R.A., Murdock, L.L., Zhu-Salzman, K. (2007). Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*. 53:734-740.
- Banerjee, S., Giri, A.P., Gupta, V.S., Dutta, S.K.(2016). Structure function relationship of a bio-pesticidal trypsin/chymotrypsin inhibitor from winged bean. *Biological Macromolecules*. (16) 31687-7.

- Bard, G.C.C.V., Nascimento, V.V., Oliveira, A.E., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Dias, G.B., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.O., Gomes, V.M.(2014). Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. *Biopolymers: Peptide Science*. (102) 335-343.
- Becker-Ritt, A.B., & Carlini, C.R. (2012). Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Biopolymers*.98(4),367–384.<https://doi.org/10.1002/bip.22097>.
- Bischofberger, M., Iacovache, I., Gisou van der Goot, F. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Mirko. Cell Host & Microbe Review*. 12: 266-275.
- Boulter, D. (1984). Cloning of pea storage protein genes. *Biological Sciences*. 304: 323-332.
- Cândido, E.S., Pinto, M.F.S., Pelegrini, P.B., Lima, T.B., Silva, O.N., Pogue, R., Grossi-de-Sá, M.F., Franco, O.L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanism. *The FASEB Journal*. 0892-6638/11/0025-3290.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*. 19, 667–675.
- Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon*. 110: 90–109.
- Chang, Y. M., Chen, L. C., Wang, H. Y., Chiang, C. L., Chang, C. T., & Chung, Y. C. (2014). Characterization of an acidic chitinase from seeds of black soybean (*Glycine max* (L) Merr Tainan no. 3). *Plos One*. 9(12), 1–15.

- Chu, K.T, Ng, T.B. (2005). Purification and characterization of a chitinase-like antifungal protein from black turtle bean with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages. *Biology Chemistry*. 386, 19-24.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal*. 3(1),31-40.
- Costa, L.G., Silva, A.G., Gomes, D.R. (2014). Morfologia de frutos, sementes e plântulas, e anatomia das sementes de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*). *Revista de Ciências Agrárias – Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 57, n.4.
- Dang, L., & Van damme, E. J.M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*. 117 (1), 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>.
- Derbyshire, E., Wright, D. J., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*. 15(1), 3–24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89046-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89046-9).
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, L.R. (2002). Plant-IPs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*. 30: 347-348.
- Fotso, M., Azanza, J.L., Pasquet, R., & Raymond, J. (1994). Molecular heterogeneity of Cowpea (*Vigna unguiculata Fabaceae*) seed storage proteins. *Plant Systematics and Evolution*. 191(1–2), 39–56. <https://doi.org/10.1007/BF00985341>.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sa, M.F. (2002). Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *European Journal Biochemistry*. 269, 397-412.
- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011). A glycobiochemistry review:

- carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* 113, 236-247.
- Gomes, V.M., Mosqueda, M., Blanco-Labra, A., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Cordeiro, R.A., Xavier-Filho, J. (1997). Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) seeds inhibit fungal Growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, 4110-4115.
- Gomes, V.M, Okorokov, L.A., Rose, T.L., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1998). Legume vicilins 7S storage globulins inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 207-216.
- Gomes, V.M, Cunha, M.D., Miguens, F.C., Fernandes, K.V.S, Rose, T.L., Xavier-Filho, J. (1998). Ultrastructure and immunolabelling of fungi cells treated with *Vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins) *Plant Science.* 138, 81-89.
- Gondim-Junior, M.G.C., Barros, R., Silva, F.R., Vasconcelos, G.J.N. (2005). Occurrence and biological aspects of the clitoria tree psyllid in Brazil. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.). 62: 281-285.
- Goyal, R.K., Mattoo, A.K. (2014). Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science.* 228,135–149.
- Hamza, R., Pérez-Hedo, M., Urbaneja, A., Rambla, J.L., Granell, Gaddour, K., Beltrán, J.P., Cañas, L.A. (2018). Expression of two barley proteinase inhibitors in tomato promotes endogenous defensive response and enhances resistance to *Tuta absoluta*. *Plant Biology.* 18:24.

- Holásková, E., Galuszka, P., Fribort, I., Tufan ÖZ, M. (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology advances*. 33,1005-1023.
- Jain, A., Kumar, A., Salunki, D.M. (2016). Crystal structure of the vicilin from *Solanum melongena* reveals existence of different anionic ligands in structurally similar pockets. *Scientific Reports*. 6:236000.
- Jashni, K.M., Mehrabi, R., Collemare, J., Mesarich, C.H., Wit, P.J.G.de. (2015). The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*. fpls.00584.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., van Roekel, J. S.C., Bres-Vloemans, S.A., Dekker, I., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C., Mogen, L.S. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*. 85: 173 -180.
- Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y., Koga, D. (2003). Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 67(1),221-224.
- Kern, M.F., Maraschin, S.D.F., Vom Endet, D., Schrank, A., Vainstein, M.H., Pasquali, G. (2010). Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 1933-1946.
- Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Liang, G.H., Wilde, G., & Manickam, A. (1999). Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection

- and wounding. *Plant Science*. 144(1),9–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00049-7).
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680 - 685.
- Landim, P.G.C., Correia, T.O., Silva, F.D.A., Nepomuceno, D.R., Costa, H.P.S, Pereira, H.M., Lobo, M.D.P, Moreno, F.B.M.B., Brandão-Neto, J., Mendeiros, S.C., Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A., Souza, B.L., Barroso-Neto, I.L., Freire, V.N., Carvalho, C.P.S., Monteiro-Moreira, A.C.O., Grangeiro, T.B. (2017). Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. *Biochimie*.135, 89 -103.
- Lorenzi, H. (2002). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 1, 4ª edição. *Instituto Plantarum*.
- 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*). *Comparative Biochemistry Physiology*. 105C: 89-94.
- Machado, M.C. (2000). Biologia comparada de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Galactia striata* (Leguminosae) e alimentação alternada. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Malik, A., & Preeti. (2019). Purification and properties of plant chitinases: A review. *Journal of Food Biochemistry*. 43(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12762>.

- Marcus, J.P., Green, J.L., Goulter, K.C., and Manners, J.M. (1999). A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia intergrifolia* Kernels. *Plant Journal*. 19, 699-70.
- Martin, M.N. (1991). The Latex of *Hevea brasiliensis* contains High levels of Both chitinases and chitinases/lysozimas. *Plant Physiology*. 95(2):469-476.
- Michiro, M., Hisayuki, M., Kazuaki, H. (2000). Chemically prepared hevein domains: effect of C-terminal truncation and the mutagenesis of aromatic residuos on the affinity for chitin. *Protein Engeneering*. 13 (6): 385-389.
- Nirmal, N.P., Shankar, S. Laseman, R.S. (2011). Fungal Proteases: An Overview. *International Journal of Biotechnolog and Biosciences*.1(1): 1-40.
- Oliveira, A.E.A., Gomes, V.M., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Carlini, C.R., Xavier-Filho, J. (1999). The Toxicity of Jack Bean (*Canavalia ensiformis* (L) DC.) Canatoxin to Plant pathogenic fung. *Revista Brasileira de Biologia*. 59(1):59-62.
- Oliveira, C.T., Machado, S.W., Bezerra, C.D.S., Cardoso, M.H., Franco, O.L., Silva, C.P., Alve, D.G., Rios, C., Machado., M.L.R. (2020). Effects of a reserve protein on *Spodoptera frugiperda* development; A biochemical and molecular approach to the entomotoxic mechanism. *Molecules*. 25, 2195.
- Osborne, T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*, 2nd ed. London. 154p.
- Osborn, T.C., Alexander, D.C., Sun, S., Cardona, C., Bliss, F.A. (1988). Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*. 240: 207–210.
- Pareek, S.S., Ravib, I., Sharma, V. (2015) Induction of β -1,3-glucanase and chitinase in *Vigna aconitifolia* inoculated with *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Interactions*. 11:15.

- Peuman, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J.M. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal*.15: 1493–1506.
- Rao, D.H., Gowda, L.R. (2008). Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (*Tamarindus indica*) seed serves the major storage protein. *Journal of agricultural and food Chemistry*. 56, 2175-2182.
- Ribeiro, S. F.F., Agizzio, A.P., Machado, O.L.T., Neves-Ferreira, A.G.C., Oliveira, M.A., Fernandes, K.V.S., Carvalho, A.O., Jonas Perales., Gomes, V.M. (2007). A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae*. 111, 399-405
- Rufino, F.P.S., Pedroso, V.M.A., Araujo, J.N., França, A.F.J., Rabêlo, L.M.A., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E.A., Franco, O.L., Oliveira, A.S. (2013). Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests digestive proteinases. *Plant Physiology Biochemistry*. 63: 70 - 76.
- 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. *Phytochemistry*. 67(18), 2078–2084. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.032>.
- Sales, M.P., Macedo, M.L.R., Filho, J.X. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and Bruchid (insect) midgut proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 103 B: 945-950.
- 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34(1), 27-34. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100003>.

Santos, I.S., Da Cunha, M., Machado, O.L.T., & Gomes, V.M. (2004). A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: Purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Science*. 167(6), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.021>.

Schägger. H., Von-Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166, 368 - 379.

Scopes, R.K. (1993). Protein Purification: Principles and Practice. *Biochemistry & Biophysics*. 1-21.

Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A, Melchers, L. S., Van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C. (1993). Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and,8-1,3-Clucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiology*. 101: 857-863.

Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 2883-2894.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 14440-14445.

- Shu, Chia-Rui., Chen., Liu- Sheng., Yang, Ching-Jen., Chen, Jun-Kuan., Liu, Chao-Lin. (2010). Colloid Chitin azure Is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. *Journal of Biomolecular Screening*.15(2):213-7
- Silva, L.K.F. da. (1995). Aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: HesperIIDae) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Singh, A., Phougat, M., Kumar, M., Chhillar, A.K. (2013). Antifungal Proteins: Potent candidate for Inhibition of Pathogenic Fung. *Current Bioactive Compounds*. 9, 101-112.
- Souza, M.S., Uchôa, A.E., Silva, J.R., Samuels, R.I., Oliveira, A.E.A., Oliveira, E.M., Linhares, R.T., Alexandre, D., Silva, C.P. (2010). The fate vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150: 76–85.
- Tam, J.D., Wang, K.H., Tan, W.L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*. 8, 711-757.
- Tariq, M., Khan, A., Tabassum, B., Toufiq, N., Bhatti, M.U., Riaz, S., Nasir, I, A, Husnain, T. (2018). Antifungal activity of chitinase II *Colletotrichum falcatum*

- Went. Causing red rot disease in transgenic sugarcane. *Turkish Journal of Biology*. 42: 45-53.
- Toufiq, N., Tabassum, B., Bhatti, M.U., Khan, A., Muhammod, T., Shahid, N., Nasir, I.A., Husnain, T. (2018). Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Brazilian Journal of Microbiology*. 414-421.
- Trevisan, H., Nadai, J.D., Lunz, A.M., Carvalho, A.G. (2004). Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lepidoptera: Hesperidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. *Ciência Rural*. 34: 1 - 4.
- Turk, V., Bode, W. (Rural 1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters*. 285: 213-219.
- Valdés-Rodríguez, S., Galván-Ramírez, J.P., Guerrero-Rangel, A., & Cedro-Tanda, A. (2015). Multifunctional amaranth cystatin inhibits endogenous and digestive insect cysteine endopeptidases: A potential tool to prevent proteolysis and for the control of insect pests. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 62 (5), 634–641. <https://doi.org/10.1002/bab.1313>.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rouge, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Science*. 17:575–692.
- Van den, H. A., Harrison, S.J., Joosten, M. A.J., Vervoort, J., de Wit, P.J. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-microbe Interactions*. 19, 1420-1430.

- Waljuno, K., Scholmo, R.A., Beintema, J., Mariono, A., Hahn, A.N. (1975). Amino acid sequence of hevein. *International Rubber Conference Kuala Lumpur*, 2:518-531.
- Wang, S, Shao, B., Fu, H., Rao, P. (2009). Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Applied Microbiology Biotechnology*. 5:313-321.
- Wang, S., Ye, X., Chen, J., & Rao, P. (2012). A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *Food Research International*. 45(1), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.010>.
- Yunes, A. N. A., de 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)). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76(1), 111–116. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199801\)76:1<111::aidjsfa9323.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199801)76:1<111::aidjsfa9323.0.co;2-4).
- Zanuncio, J.C., Parreira, D.S., Mielke, O.H.H., Ramalho, F.D.S., Serrão, J.E., Zanuncio, T. V. (2013). *Hiperchiria incisa* (Lepidoptera: Saturniidae) on plants of *Clitoria fairchildiana*. *Journal Lepidopterists Society*. 2: 131 - 133.
- Zhu-Salzaman K., Zeng, R. (2015). Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of Entomology*. 60:13.1-13.20.

