

Isolamento e Caracterização de Proteínas de Ligação à Quitina de Sementes de *Vigna unguiculata* (L. Walp) e Avaliação da Toxicidade para o Inseto *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)

**SARAH RODRIGUES FERREIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos Dos Goytacazes, RJ

Fevereiro – 2021

Isolamento e Caracterização de Proteínas de Ligação à Quitina de Sementes de *Vigna unguiculata* (L. Walp) e Avaliação da Toxicidade para o Inseto *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)

**SARAH RODRIGUES FERREIRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos Dos Goytacazes, RJ

Fevereiro – 2021

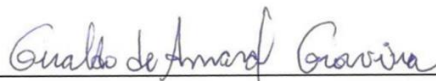
Isolamento e Caracterização de Proteínas de Ligação à Quitina de Sementes de *Vigna unguiculata* (L. Walp) e Avaliação da Toxicidade para o Inseto *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

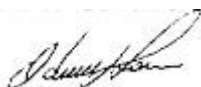
Aprovada em 26 de fevereiro de 2021. Comissão Examinadora:



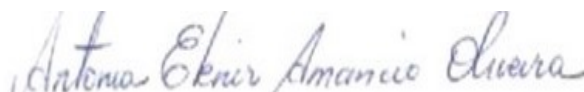
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Ferreira Uchôa  
DBG/CB/UFRN



Prof. Dr. Geraldo de Amaral Gravina  
LEAG/CCTA/CBB/UENF



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valdirene Moreira Gomes  
LFBM/CBB/UENF



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio Oliveira  
LQFPP/CBB/UENF  
(Orientadora)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro – 2021

*`Eben-ha `ezer*

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado<sup>1</sup>.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

À UENF, ao PGBB, ao seu corpo técnico e docente, que possibilitaram a minha formação acadêmica, desde a graduação até aqui, oferecendo ensino público de qualidade e inserção na pesquisa científica.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por gentilmente ter doado as sementes utilizadas neste trabalho.

À minha orientadora Elenir pela orientação e tempo investido que me propôs desde a iniciação científica, tendo acompanhado de perto desde os experimentos iniciais até a elaboração dos trabalhos de conclusão.

Aos doutores André Teixeira da Silva Ferreira e Jonas Perales e à FIOCRUZ pela colaboração que possibilitou as análises de espectrometria de massas.

Aos professores Adriana Ferreira Uchôa, Valdirene Moreira Gomes e Geraldo de Amaral Gravina, por terem aceitado participar da banca examinadora.

Às professoras Olga L. T. Machado, Kátia V. S. Fernandes e novamente à professora Valdirene pelas sugestões e contribuições dadas na defesa de projeto deste trabalho.

Ao professor Jorge Hernandez Fernandez, pelos conhecimentos compartilhados na disciplina de biologia computacional de interações proteicas e pela disponibilidade além da disciplina para elucidar os experimentos de bioinformática.

Aos amigos do laboratório Kayan, Roberta, Geovanna, Bruna, Odara e Aline por terem tornado a rotina de trabalho mais leve compartilhando o dia a dia.

Aos amigos das disciplinas cursadas durante o mestrado, Enrico, Izabeli, Patrícia e Yasmin, por terem compartilhado os momentos e conhecimentos que, com certeza, facilitaram o percurso.

---

<sup>1</sup> O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha família, minha base, estrutura que me faz ter força e coragem até nos momentos em que o único pensamento é desistir. Obrigada pela companhia e simplesmente por existirem.

Ao Matheus Barreto Marques, meu amigo, companheiro e parceiro de vida, que inúmeras vezes aturou meus estresses e teve paciência além do normal para me acalmar e que sempre torce por mim.

Aos demais, que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho e me apoiando durante esta trajetória, obrigada!

À Deus, meu amigo, pai e Salvador. Obrigada por ter me sustentado, pela Sua graça e misericórdia. Sem Ti eu nada seria.

**Dedico ao meu querido avô  
Abimael Garcia Ferreira (*in  
memorian*). Guardarei suas  
memórias e ensinamentos  
eternamente.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	3
1.2 Insetos pragas de grãos armazenados.....	4
1.3 <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	8
1.4 Controle de pragas de grãos armazenados.....	10
1.5 Mecanismo de defesa de sementes .....	12
1.5.1 Defesa de sementes associada às proteínas com afinidade à quitina .....	14
1.6 Cultivares de feijão-caupi menos suscetíveis ao ataque de <i>C. maculatus</i> .....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.2 Objetivo geral .....	23
2.3 Objetivos específicos.....	23
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
3.1 Insetos.....	24
3.2 Sementes de <i>V. unguiculata</i> .....	24
3.3 Isolamento de proteínas com afinidade à quitina.....	24
3.4 Tratamento da quitina.....	25
3.5 Cromatografia de afinidade à quitina .....	25
3.6. Caracterização de proteínas da fração CBP.....	25
3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	25
3.6.2 <i>Western blotting</i> .....	26
3.6.3 Quantificação de vicilinas através de ELISA.....	27
3.6.4 Identificação das proteínas retidas em quitina por espectrometria de massas .....	27
3.7 Isolamento de vicilinas .....	28
3.8 Determinação da atividade de quitinase .....	28
3.9 Hidrólise das vicilinas e isolamento dos peptídeos com afinidade à quitina.....	28
3.9.1 Hidrólise da fração CBV .....	28
3.9.2 Eletroforese em gel de SDS-tricina-PAGE .....	29
3.10 Toxicidade das frações isoladas para <i>C. maculatus</i> .....	29
3.11 Quantificação das macromoléculas e das atividades digestivas das larvas de <i>C. maculatus</i> .....	30



3.11.1	Extração larval.....	30
3.11.2	Quantificação de proteínas.....	32
3.11.3	Quantificação de glicose .....	32
3.11.4	Quantificação de triglicerídeos .....	32
3.11.5	Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase.....	33
3.11.6	Determinação da atividade de lipase .....	34
3.11.7	Quantificação de proteases cisteínicas .....	34
3.12	Experimentos <i>in sílico</i> .....	35
3.12.1	Modelagem molecular .....	35
3.12.2	Busca das enzimas digestivas de <i>C. maculatus</i> .....	35
3.12.3	Sítios de ligação à quitina (ChBD) .....	36
3.12.4	Docking do monômero de vicilina e dos peptídeos de vicilina com o tetraglicídeo de N-acetilglicosamina (NAG) <sub>4</sub> .....	36
3.13	Análise estatística dos dados .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1	Isolamento e identificação de proteínas com afinidade à quitina (CBP) em sementes de <i>V. unguiculata</i> .....	38
4.2	Análise do desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de <i>V. unguiculata</i> cv. Fradinho.....	43
4.3	Toxicidade das frações CBP de sementes de <i>V. unguiculata</i> para <i>C. maculatus</i> .....	47
4.4	Isolamento de vicilinas e peptídeos de vicilina com afinidade à quitina de sementes de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Xiquexique e avaliação da toxicidade para <i>C. maculatus</i> .....	50
4.5	Avaliação da toxicidade de vicilinas com afinidade à quitina de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> BRS Xiquexique para <i>C. maculatus</i> .....	53
4.6	Toxicidade de calcofluor para <i>C. maculatus</i> .....	55
4.7	Dosagem bioquímica em larvas de <i>C. maculatus</i> desenvolvidas em sementes artificiais .....	56
4.8	Modelagem molecular do monômero de vicilina e <i>docking</i> com tetraglicídeo de N-acetilglicosamina .....	58
4.9	Hidrólise, <i>in sílico</i> , da vicilina e localização dos possíveis sítios de ligação à quitina e demais sítios de glicosilação nos peptídeos .....	62
4.10	Docking dos peptídeos de vicilina obtidos da hidrólise <i>in sílico</i> com tetraglicídeo de N-acetilglicosamina.....	65
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
<b>Figura 1</b>	Trato gastrointestinal dos insetos .....	6
<b>Figura 2</b>	Representação de larva, pupa e adultos de <i>C. maculatus</i> .....	9
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do ciclo de vida de <i>C. maculatus</i> .....	10
<b>Figura 4</b>	Representação generalizada da estrutura terciária de globulina 7s.....	16
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da hidrólise da quitina por quitinases.....	20
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da extração larval.....	31
<b>Figura 7</b>	Isolamento e caracterização de proteínas com afinidade à quitina (CBP) de sementes do cultivar de <i>V. unguiculata</i> BRS Xiquexique .....	39
<b>Figura 8</b>	Múltiplo alinhamento das sequências dos peptídeos de CBP de sementes de BRS Xiquexique com vicilina de sementes de <i>V. unguiculata</i> .....	40
<b>Figura 9</b>	Alinhamento das sequências dos peptídeos da banda b4 de CBP de sementes de BRS Xiquexique com quitinase de sementes de <i>C. ensiformis</i> .....	41
<b>Figura 10</b>	Isolamento e caracterização de proteínas com afinidade à quitina (CBP) de sementes de <i>V. unguiculata</i> cv. Fradinho....	42
<b>Figura 11</b>	Desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> em sementes de feijão-caupi cv. Fradinho .....	44
<b>Figura 12</b>	Atividade enzimática em larvas de <i>C. maculatus</i> desenvolvidas em sementes naturais de feijão-caupi cv. Fradinho.....	45
<b>Figura 13</b>	Quantificação de macromoléculas em larvas de <i>C. maculatus</i> desenvolvidas em sementes naturais de feijão-caupi cv. Fradinho.....	46
<b>Figura 14</b>	Avaliação da interferência de CBP de sementes de BRS Xiquexique na penetração e morfologia larval de <i>C. maculatus</i> .....	47
<b>Figura 15</b>	Avaliação da interferência da fração CBP de sementes de BRS Xiquexique no desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> .	48
<b>Figura 16</b>	Avaliação da interferência de CBP de sementes de cv. Fradinho no desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> .....	49
<b>Figura 17</b>	Isolamento de CBV do cv. BRS Xiquexique .....	51

<b>Figura 18</b>	Isolamento e caracterização dos peptídeos de CBV de sementes do cv. BRS Xiquexique .....	52
<b>Figura 19</b>	Interferência de CBV de sementes de BRS Xiquexique no desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> .....	54
<b>Figura 20</b>	Interferência de calcoflúor no desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> .....	55
<b>Figura 21</b>	Interferência das frações CBP (5 %) e CBV (2 %) do cv. BRS Xiquexique e 0,1 % de calcofluor nas proteases cisteínicas de larvas de <i>C. maculatus</i> .....	56
<b>Figura 22</b>	Interferência da fração CBV (2 %) do cv. BRS Xiquexique no perfil metabólico de larvas de <i>C. maculatus</i> .....	57
<b>Figura 23</b>	Alinhamento da sequência de peptídeos de b1 com vicilina de <i>V. angularis</i> .....	59
<b>Figura 24</b>	Potencial sítio de ligação à quitina na estrutura do monômero de vicilina (b1, cv. BRS Xiquexique).....	60
<b>Figura 25</b>	Resíduos aromáticos e hidrofóbicos expostos na estrutura tridimensional do monômero da vicilina.....	63
<b>Figura 26</b>	Estrutura primária de vicilina do cv. BRS Xiquexique .....	66
<b>Figura 27</b>	Docking molecular entre o peptídeo PEP1, obtido <i>in sílico</i> , com (NAG) <sub>4</sub> .....	67
<b>Figura 28</b>	Docking molecular entre o peptídeo PEP2, obtido <i>in sílico</i> , com (NAG) <sub>4</sub> .....	68
<b>Figura 29</b>	Docking molecular entre o peptídeo PEP3, obtido <i>in sílico</i> , com (NAG) <sub>4</sub> .....	69
<b>Figura 30</b>	Docking molecular entre o peptídeo PEP4, obtido <i>in sílico</i> , com (NAG) <sub>4</sub> .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Fonte de diversas globulinas 7S tóxicas para diferentes organismos .....	18
<b>Tabela 2</b>	Interações entre o monômero de vicilina e (NAG) <sub>4</sub> .....	61
<b>Tabela 3</b>	Busca das proteases digestivas em larvas de <i>C. maculatus</i> ..	62
<b>Tabela 4</b>	Peptídeos obtidos através da clivagem <i>in silico</i> pela catepsina L .....	64
<b>Tabela 5</b>	Interações entre os peptídeos de vicilina e (NAG) <sub>4</sub> .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	<u>A</u> nalysis <u>O</u> f <u>V</u> ariance
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>APS</b>	<u>A</u> monium <u>P</u> ersulfate
<b>BLASTp</b>	Protein-Basic Local Alignment Search Tool
<b>B.O.D.</b>	<u>B</u> iochemical <u>O</u> xygen <u>D</u> emand
<b>BCA</b>	<u>Á</u> cido <u>B</u> icínconínico
<b>CBP</b>	<u>C</u> hitin- <u>B</u> inding <u>P</u> roteins
<b>CBV</b>	<u>C</u> hitin- <u>B</u> inding <u>V</u> icilins
<b>ChBD</b>	<u>C</u> hitin- <u>B</u> inding <u>D</u> omain
<b>CONAB</b>	<u>C</u> ompanhia <u>N</u> acional de <u>A</u> bastecimento
<b>cv/cvs</b>	cultivar/cultivares
<b>DAB</b>	<u>D</u> i- <u>a</u> mino- <u>b</u> enzidina
<b>DAO</b>	<u>D</u> ias <u>A</u> pós a <u>O</u> viposição
<b>DOPE</b>	<u>D</u> iscrete <u>O</u> ptimized <u>P</u> rotein <u>E</u> nergy
<b>DTT</b>	1,4 - <u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
<b>DTNB</b>	5,5'- <u>D</u> ithiobis-(2- <u>N</u> itro <u>b</u> enzoic acid)
<b>ELM</b>	<u>E</u> karyotic <u>L</u> inear <u>M</u> otif
<b>EMBRAPA</b>	<u>E</u> mpresa <u>B</u> rasileira de <u>P</u> esquisa <u>A</u> gropecuária
<b>ELISA</b>	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
<b>MP</b>	<u>M</u> atriz <u>P</u> eritrófica
<b>MW</b>	Marcador de massa molecular
<b>NAG<sub>4</sub></b>	Tetrâmero de <u>N</u> - <u>A</u> etil- $\beta$ - <u>D</u> - <u>G</u> licosamina
<b>OPD</b>	<u>O</u> rto <u>P</u> henil <u>D</u> iamina
<b>PDB</b>	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
<b>PLIP</b>	<u>P</u> rotein- <u>L</u> igand <u>I</u> nteraction <u>P</u> rofiler
<b>PBS</b>	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Tampão fosfato salina)
<b>SDS-Page</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
<b>TCA</b>	<u>T</u> ri <u>C</u> hloroacetic <u>A</u> cid (Ácido Tricloroacético)
<b>PDT</b>	<u>P</u> eríodo de <u>D</u> esenvolvimento <u>T</u> otal
<b>TEMED</b>	<u>T</u> etra- <u>M</u> etil- <u>E</u> tileno- <u>D</u> iamina
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil amino etano

## RESUMO

Sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) fazem parte da dieta de várias populações do mundo. Estas sementes são atacadas por insetos, como o *Callosobruchus maculatus*, principalmente durante a estocagem. Inseticidas são a principal forma de controle dessas infestações, entretanto estes compostos podem causar contaminação alimentar, ambiental e selecionar insetos resistentes. Uma alternativa para minimizar o uso de inseticidas é a utilização de cultivares mais resistentes ao ataque dos insetos. Nove cultivares de feijão-caupi desenvolvidos pela EMBRAPA mostraram propriedades de resistência a infestação por *C. maculatus*, dentre eles o cv. BRS Xiquexique. Entretanto, estas características de resistência permanecem desconhecidas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar proteínas com afinidade à quitina do cv. BRS Xiquexique e testar a toxicidade para *C. maculatus*. Proteínas dos cotilédones foram extraídas e fracionadas em cromatografia de afinidade à quitina. As proteínas presentes na fração retida em quitina (CBP) foram identificadas por espectrometria de massas. Uma fração rica em vicilinas (CBV) foi isolada a partir da fração CBP. A toxicidade das proteínas contra o inseto foi avaliada por sistema de sementes artificiais. Os níveis de glicose, proteínas, triglicerídeos e atividade das enzimas amilases, proteases cisteínicas e lipases foram quantificados nas larvas. Estudos, *in silico*, foram realizados para identificar os sítios de ligação a quitina. Proteínas da fração CBP foram identificadas como vicilinas e quitinases. As frações CBP e CBV foram tóxicas para o inseto, diminuindo a massa e o comprimento das larvas. Os níveis das macromoléculas e a atividade das enzimas estavam alterados nas larvas sobreviventes. A hidrólise das vicilinas da fração CBV gerou peptídeos que mantiveram a afinidade a quitina. O monômero da vicilina e peptídeos resultantes da hidrólise foram modelados, submetidos a ligação com tetrâmero de N-acetilglicosamina e os sítios de ligação à quitina foram identificados. Nossos resultados sugerem que a toxicidade das sementes de cv. BRS Xiquexique para o inseto *C. maculatus*, pode estar relacionada, em parte, a presença de proteínas com afinidade à quitina.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*; *Callosobruchus maculatus*; Cultivares Resistentes; Proteínas de Defesa; Quitinase; Vicilinas.

## ABSTRACT

Seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) are part of the diet of several populations in the world. These seeds are attacked by insects, such as *Callosobruchus maculatus*, mainly during storage. Insecticides are the main way to control these infestations, however these compounds can cause food and environmental contamination and select resistant insects. An alternative to minimize the use of insecticides is the use of cultivars that are more resistant to insect attack. Previous work identified some cowpea cultivars with some degree of resistance to infestation by *C. maculatus*, among them cv. BRS Xiquexique, however the resistance factors are still unknown. Thus, the objective of this work was to isolate and characterize chitin-binding proteins from cv. BRS Xiquexique and test the toxicity for *C. maculatus*. Cotyledon proteins were extracted and fractionated using chitin affinity chromatography. The proteins present in the chitin-binding proteins (CBP) were identified by mass spectrometry. A vicilin-rich fraction (CBV) was isolated from the CBP fraction. The toxicity of proteins to the insect was evaluated by an artificial seed system. The levels of glucose, proteins, triglycerides and activity of amylase, cysteine proteases and lipases enzymes were quantified in the larvae. *In silico* studies have been carried out to identify chitin-binding sites. CBP fraction proteins have been identified as vicillins and chitinases. The CBP and CBV fractions were toxic to the insect, decreasing the mass and length of the larvae. Macromolecule levels and enzyme activities were altered in the surviving larvae. The hydrolysis of the vicilins of the CBV fraction generated peptides that maintained the affinity to chitin. The vicilin monomer and peptides resulting from hydrolysis were modeled, subjected to docking with N-acetylglycosamine tetramer and the chitin-binding sites were identified. Our results suggest that the toxicity of cv. BRS Xiquexique for the insect *C. maculatus*, may be related, in part, to the presence of proteins with chitin affinity.

Keywords: *Vigna unguiculata*; *Callosobruchus maculatus*; Resistant Cultivars; Defense Proteins; Chitinase; Vicilins.

## 1 INTRODUÇÃO

As sementes são unidades de reprodução fundamentais no processo de dispersão e na sobrevivência das espécies de angiospermas e gimnospermas (Beltrati e Paoli, 2012). Por definição uma semente é o óvulo desenvolvido depois da fecundação. Além disso, contém o embrião com ou sem reservas nutritivas, envoltos pelo tegumento (Vidal e Vidal, 2007). Devido à grande capacidade de sobrevivência, as sementes têm um papel importante na história da evolução das plantas superiores pois são consideradas responsáveis pelo sucesso da dominação de espermatófitas ao longo de milhões de anos (Raven *et al.*, 2014). Esta capacidade de sobrevivência deve-se ao tecido de reserva que supre o embrião com energia e metabólitos necessários durante a germinação e até que a plântula se torne autotrófica. O papel do tegumento (ou testa) também é crítico pois protege o embrião do ambiente externo, representando uma barreira física e química (Moïse *et al.*, 2005). Estas estruturas, então, fornecem à planta uma vantagem seletiva sobre os grupos ancestrais que não possuem sementes (Bewley e Black, 2013; Raven *et al.*, 2014).

Sementes podem apresentar um ou mais de um cotilédone, classificando a planta como mono ou eudicotiledônea. A função dos cotilédones é armazenar reservas nutricionais e energia para o embrião durante a germinação (Raven *et al.*, 2014). As sementes ainda podem armazenar suas reservas no endosperma, como é o caso das sementes de gramíneas, popularmente conhecidas como cereais (Copeland e McDonald, 2001).

Devido ao acúmulo de reservas que as sementes possuem – como proteínas, carboidratos e lipídeos – elas servem como base nutricional em grande parte dos países desenvolvidos e subdesenvolvidos do mundo (Asif *et al.*, 2013). Além de serem usadas diretamente como alimentos, as sementes desempenham outras funções, sendo utilizadas na produção de bebidas, especiarias, óleos, na fabricação de medicamentos e para alimentação de animais. Os cereais são as sementes mais utilizadas na alimentação humana. Exemplos de cereais de grande importância para a alimentação são o arroz, trigo, milho, aveia, cevada, sorgo entre outros (Copeland e McDonald, 2001).

Uma família tão importante quanto a dos cereais é a família Fabaceae, que inclui as sementes de leguminosas. As sementes de leguminosas são importantes



para o abastecimento alimentar dos seres humanos devido a seu alto valor nutricional, além disso, geralmente possuem mais proteínas do que as sementes de cereais (Copeland e McDonald, 2001).

As leguminosas fazem parte de uma ordem de plantas em que o fruto é uma vagem. Sementes de leguminosas secas têm mais nutrientes do que verdes, devido a deposição e armazenamento de reservas durante o desenvolvimento. Além de possuírem alto valor nutritivo, as leguminosas são fonte de proteínas principalmente onde a proteína animal não é acessível a todas as pessoas (ONU, 2020). As leguminosas também são ricas em fibras, possuem níveis baixos de colesterol e possuem carboidratos de lenta absorção (Mudryj *et al.*, 2014). Seu uso na dieta auxilia a controlar os níveis de açúcar. Devido a estas características, as leguminosas são recomendadas por profissionais de saúde como complemento no tratamento de doenças como diabetes, obesidade e problemas cardíacos (ONU, 2020). Diferente dos cereais, que possuem como tecido de reserva o endosperma e são ricos em amido, as leguminosas armazenam suas reservas principalmente nos cotilédones e são ricas em proteínas (Graham e Vance, 2003; Gallardo *et al.*, 2008;).

O ano de 2016 foi declarado o Ano Internacional das Leguminosas pela Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU), no intuito de trazer a conscientização acerca da importância nutricional destes alimentos. Além disto, esta ação da ONU, também teve os objetivos de “ajudar a eliminar a fome, a in e a desnutrição” e “tornar a agricultura mais produtiva” (FAO, 2016). O consumo de leguminosas é frequentemente associado ao combate à desnutrição, situação que ameaça a saúde pública mundial (Nascimento, 2016). As leguminosas desempenham um papel importante como uma alternativa produtiva para as regiões com terrenos marginais e de seca, pois permite a recuperação de solos degradados. Devido à sua capacidade de adaptação a todos tipos de solos, as leguminosas são um insumo ideal para os agricultores, já que como fixadoras de nitrogênio, aportam adubos verdes que permitem a recuperação e conservação dos solos (FAO, 2016).

Sementes de leguminosas compreendem alimentos como amendoim, soja, lentilha, feijão, ervilha, grão de bico entre outros. As sementes de feijão, dentre as quais se destacam o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) são importantes leguminosas constituintes da dieta humana, sendo

relacionadas às práticas de subsistência e de grande importância socioeconômica mundial (Graham e Vance, 2003; Silva *et al.*, 2019)

### 1.1 - Sementes de *Vigna unguiculata*

Essa cultura é popularmente conhecida como feijão-caupi ou feijão de corda. As sementes da espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. são consideradas a parte mais importante da planta para o consumo humano e constituem um dos principais itens da dieta alimentar das regiões Norte e Nordeste do Brasil (Ribeiro, 2002; Timko e Singh, 2008). Estas regiões também lideram a produção destes grãos, porém o cultivo vem se expandindo também para o Centro Oeste do país. O consumo deste feijão é feito principalmente pelas populações de baixa renda devido ao seu alto valor nutricional, baixo custo de produção e ciclo curto (Ribeiro, 2002). Desta forma, esta cultura é totalmente apta a inclusões em programas de segurança alimentar, em que se torna acessível alimentos saudáveis a todos indivíduos e em qualquer ocasião (Silva *et al.*, 2019). As sementes de *V. unguiculata* são constituídas principalmente de carboidratos e proteínas, apresenta todos os aminoácidos essenciais e são fonte de minerais, vitaminas e possuem baixo teor de lipídeos. Seu cultivo é de grande importância econômica não só no Brasil, mas também em países da África, sendo a Nigéria, Níger e Brasil os principais produtores de feijão-caupi (Freire Filho *et al.*, 2011).

De acordo com estimativas da Conab, a produção de feijão-caupi no Brasil na safra de 2019/2020 foi de mais de 680 mil toneladas (Conab, 2020). Além disso, a receita bruta dos produtores rurais na safra de 2017/2018 atingiu um somatório de mais de 1 bilhão de reais (Conab, 2018). Por mais que se tenha uma produção expressiva nas 17 Unidades da Federação, as regiões Norte e Nordeste são responsáveis por mais de 75 % da produção nacional. Esta produção está ligada ao hábito de consumo da população nestas regiões. O destaque do feijão-caupi também se configura no mercado externo. Em 2019, o Brasil exportou 43 mil toneladas com destino a 40 países da Europa, Ásia, África, América do Norte e Oriente Médio (Conab, 2020).

O feijão-caupi foi introduzido na América tropical pelos espanhóis no século XVII e teve origem no sudeste da África, onde sua distribuição expandiu-se para o

oeste e para o sul. Estima-se que sua domesticação tenha acontecido na África Ocidental devido ao cultivo de diversidades do feijão-caupi (Tuda *et al.*, 2014).

Apesar desta cultura ser consideravelmente resistente à seca e ter a capacidade de se desenvolver em solos de baixa fertilidade em comparação com outras espécies, a produção de feijão-caupi sofre muitas interferências de fatores abióticos e bióticos. Dentre dos fatores bióticos, doenças causadas por fungos, bactérias e vírus podem reduzir a produtividade destas sementes (Boukar *et al.*, 2019). Além disso, diversas pragas acometem a cultura de feijão-caupi, comprometendo seriamente a produção. A classe dos insetos reúne as principais pragas desta cultura, ocorrendo desde as partes aéreas, como nas subterrâneas e ainda nos grãos estocados de feijão-caupi. Os insetos merecem atenção especial nas estratégias de controle de pragas agrícolas (Bastos, 2016), pois a ocorrência descontrolada dessas pragas pode causar a devastação de culturas de importância social e econômica (Ruppert *et al.*, 2005).

## 1.2 – Insetos pragas de grãos armazenados

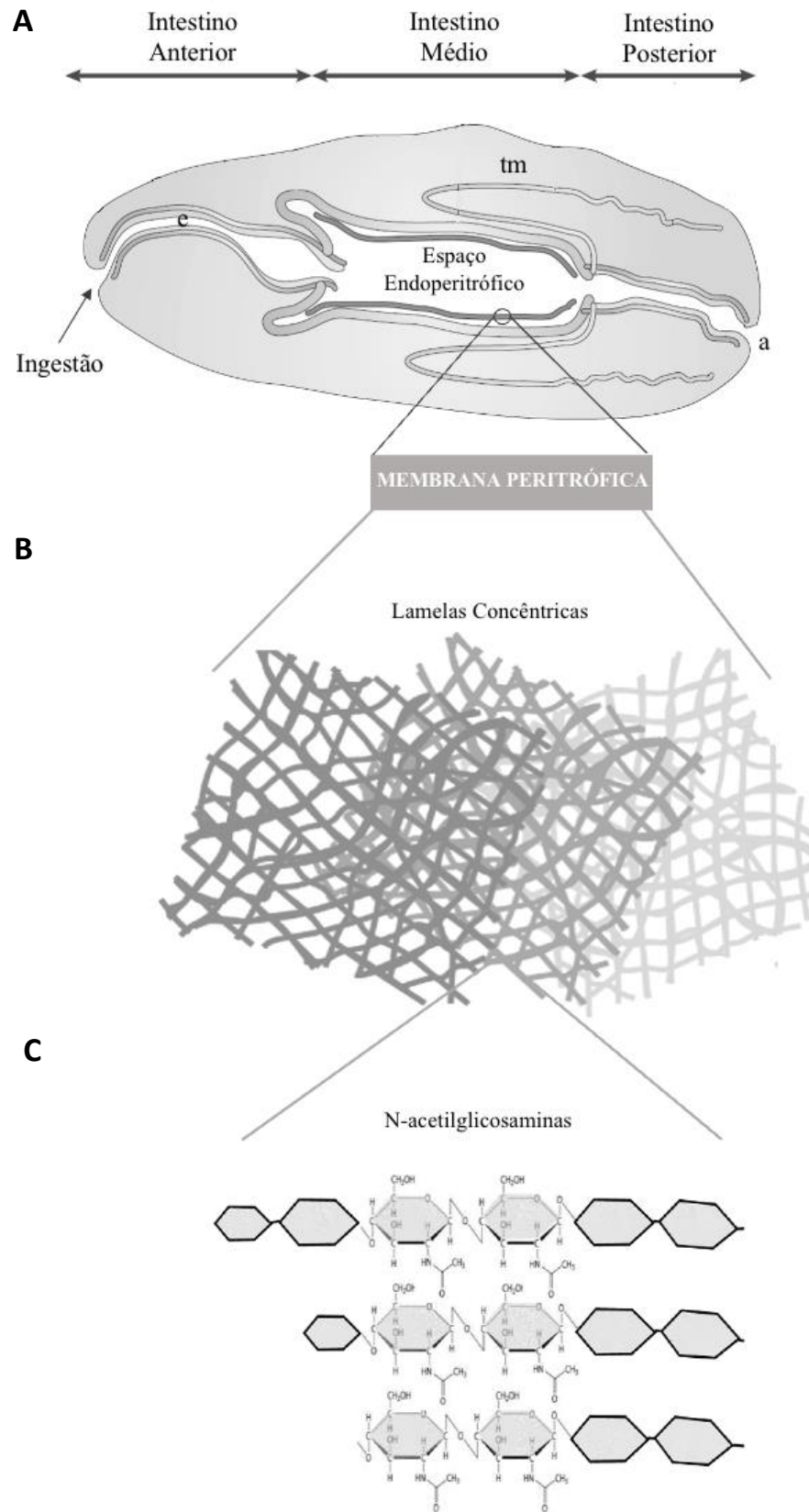
Os insetos estão compreendidos dentro da classe Insecta, que por sua vez está incluída no subfiló Hexapoda e filó Arthropoda. Os insetos vivem em quase todos os habitats terrestres, de água doce e às vezes, até na superfície de oceanos e regiões litorâneas. Desta forma, só não ocupam as águas marinhas subtidais. São o maior grupo de animais e este sucesso deve-se a inúmeros fatores, dentre eles a evolução do voo, que fortaleceu a dispersão, fuga de predadores, busca por alimentos e condições ambientais ideais (Ruppert *et al.*, 2005; Brusca e Brusca, 2007).

A anatomia dos insetos se caracteriza por possuírem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça está presente um par de antenas, um par de olhos compostos e três conjuntos de peças bucais; o tórax possui um par de pernas em cada um dos três segmentos e frequentemente, dois pares de asas. Devido a adaptação dos insetos a diferentes tipos de dieta, suas peças bucais encontram-se altamente modificadas e, por isso, podem ser classificados em mastigadores, sugadores e embebedores (Ruppert *et al.*, 2005; Brusca e Brusca, 2007).

Como organismos heterótrofos, os insetos necessitam adquirir nutrientes essenciais para o desenvolvimento. O órgão central responsável pela digestão de

alimentos e absorção de nutrientes nos insetos é o trato gastrointestinal. O canal alimentar dos insetos se inicia na boca, percorre toda a cavidade corporal e termina no ânus. O intestino dos insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Holtof *et al.*, 2019) (Figura 1). O intestino médio é a principal região onde ocorre a digestão enzimática e a absorção de nutrientes, em sua maioria (Chapman *et al.*, 2013).

O intestino médio da maioria dos insetos possui uma matriz peritrófica constituída de quitina (Ruppert *et al.*, 2005; Brusca e Brusca, 2007). Alguns insetos apresentam um gel peritrófico, também formado de quitina, porém este gel é mais fluido do que a matriz. Por definição, a matriz peritrófica (MP) é uma camada acelular, semipermeável, apresentando múltiplas funções (Terra, 2001). Dentre as funções fundamentais da MP estão a proteção das células epiteliais contra possíveis danos causados por toxinas, danos mecânicos causados por partículas alimentares ou de infecções causadas por microrganismos (Hegedus *et al.*, 2009). A MP também tem função na reciclagem de enzimas digestivas durante o ciclo alimentar. Esta camada separa o lúmen intestinal nos espaços endo e ectoperitróficos, desta forma, a digestão no intestino médio, ocorre de forma compartimentalizada (Zhu *et al.*, 2016). A matriz peritrófica é continuamente produzida em resposta a ingestão e desenvolvimento do inseto. É composta majoritariamente por longas cadeias de monômeros de N-acetilglicosamina (NAG) ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Repetições destas cadeias formam polímeros de quitina, que por sua vez constituem as nanofibrilas quitinosas. Proteoglicanos e proteínas também fazem parte da composição da matriz peritrófica (Figura 1) (Liu *et al.*, 2019)



**Figura 1. Trato gastrointestinal dos insetos. A:** Representação esquemática das principais subdivisões do trato gastrointestinal dos insetos. e – Esôfago, tm – Túbulos de Malpighi, a – Ânus. **B:** Ampliação esquemática da matriz peritrófica. **C:** Polímeros de quitina, destacando os monômeros de N-acetilglicosamina ligados, formando as nanofibrilas quitinosas. Adaptado de Holtof *et al.*, (2019).

A matriz peritrófica é alvo de estudos que abrangem a defesa de plantas contra insetos herbívoros (Sales *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2008; Tetreau e Wang, 2019). Ao interferir no metabolismo de quitina e conseqüentemente na produção da matriz peritrófica, os nutrientes não são absorvidos nem transportados de forma regular prejudicando o desenvolvimento do inseto. Um reagente muito utilizado nestes estudos é o calcofluor, por ser um marcador de quitina (Tetreau e Wang, 2019). Estes estudos frequentemente abordam os insetos pragas de grãos armazenados, devido a seu alto potencial de diminuir a produtividade de culturas que possuem importância econômica e servem de base nutricional em grande parte dos países desenvolvidos e subdesenvolvidos do mundo (Sales *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2008).

Os prejuízos que os insetos herbívoros podem causar às plantas são variáveis, podendo ocorrer ataque em todos os órgãos vegetais (Galo *et al.*, 2002). Insetos herbívoros podem prejudicar a agricultura diretamente, quando o produto a ser comercializado é atacado ou indiretamente, quando os insetos não atacam o produto comercial, mas atacam outras estruturas vegetais que alteram processos fisiológicos da planta e interferem na produção (Galo *et al.*, 2002).

O armazenamento de grãos é uma prática necessária para suprir a alimentação humana mesmo fora das estações de cultivo (SENAR, 2018). Diversas pragas se alimentam das sementes durante o armazenamento pós-colheita, devido à alta concentração de reservas que estas possuem (Mishra *et al.*, 2017). Os insetos que infestam as sementes armazenadas se dividem em pragas primárias e pragas secundárias. As pragas primárias possuem a capacidade de atacar as sementes integras, enquanto, as pragas secundárias atacam grãos previamente danificados, farelos e farinhas, não conseguindo atacar sementes íntegras (Lorini *et al.*, 2015). As pragas primárias internas são aquelas que perfuram a semente, ali se desenvolvem e permitem a instalação de outras pragas secundárias. As pragas primárias externas se alimentam do exterior da semente e depois do interior, não tendo seu desenvolvimento dentro da semente (Lorini *et al.*, 2015).

Independente de serem as pragas primárias ou secundárias, estes insetos apresentam grande ameaça para os grãos armazenados na maioria dos países. A primeira infestação pode acontecer ainda no campo, e essa vinda de pragas do campo para os armazéns caracteriza a infestação cruzada (FAO, 2010). As conseqüências

do ataque de insetos nas sementes incluem redução no peso dos grãos, no poder germinativo da semente, do valor nutritivo e perda no seu valor comercial (Santos e Mantovani, 1997). O conhecimento dos insetos que predam diferentes tipos de sementes é importante, pois os métodos de controle das pragas a ser adotado depende da correta identificação da praga (Lorini *et al.*, 2015).

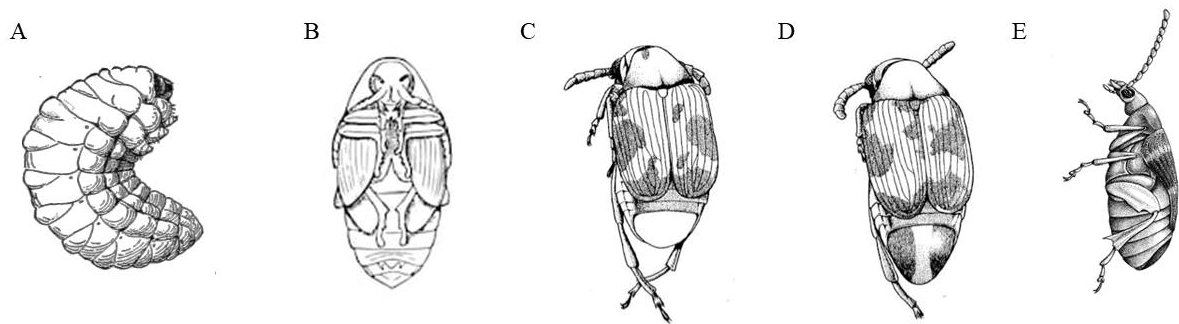
As pragas que se alimentam de sementes estocadas são consideradas uma das principais limitações para a produção de culturas de leguminosas. Dentre as pragas de grãos armazenados, os bruquídeos merecem atenção especial pois estão relacionados às maiores destruições de sementes armazenadas, conseqüentemente causando grandes prejuízos econômicos para muitas culturas de espécies de leguminosas (Mishra *et al.*, 2017).

Os bruquídeos do gênero *Callosobruchus* estão entre os principais insetos de grãos armazenados. Eles infestam tanto vagens maduras, quanto sementes durante o armazenamento, reduzindo consideravelmente o rendimento líquido das colheitas. Os bruquídeos pertencem à subfamília Bruchidae, família Chrysomelidae e ordem Coleoptera que abrange mais de 1700 espécies de 62 gêneros. Os danos causados pelos bruquídeos durante o armazenamento são diversos e variam de cultura para cultura, dependendo da espécie de bruquídeo. Infestações descontroladas da espécie *Callosobruchus maculatus* podem causar até 90 % de perda de rendimento no feijão-da-china, 78 % no guandu e até 100 % no feijão-caupi (Fox, 1993; Mishra *et al.*, 2017). No feijão mungo, tanto *C. maculatus* quanto *C. chinensis* chegam a causar perdas de mais de 70 % na produção (Mishra *et al.*, 2017).

### 1.3 - *Callosobruchus maculatus*

Dentre os bruquídeos, o inseto *Callosobruchus maculatus* se destaca como a principal praga de sementes de *Vigna unguiculata* (Cardoso *et al.*, 2017), porém outras espécies do gênero *Vigna* e outras leguminosas de importância econômica como soja (*Glycine max*) e ervilha (*Lens culinaris*) também podem ser infestadas pelo besouro (Tuda *et al.*, 2014). *C. maculatus* pertence à subfamília Bruchidae, família Chrysomelidae e ordem Coleoptera – maior ordem de insetos (Ruppert, 2005; Cardoso *et al.*, 2017).

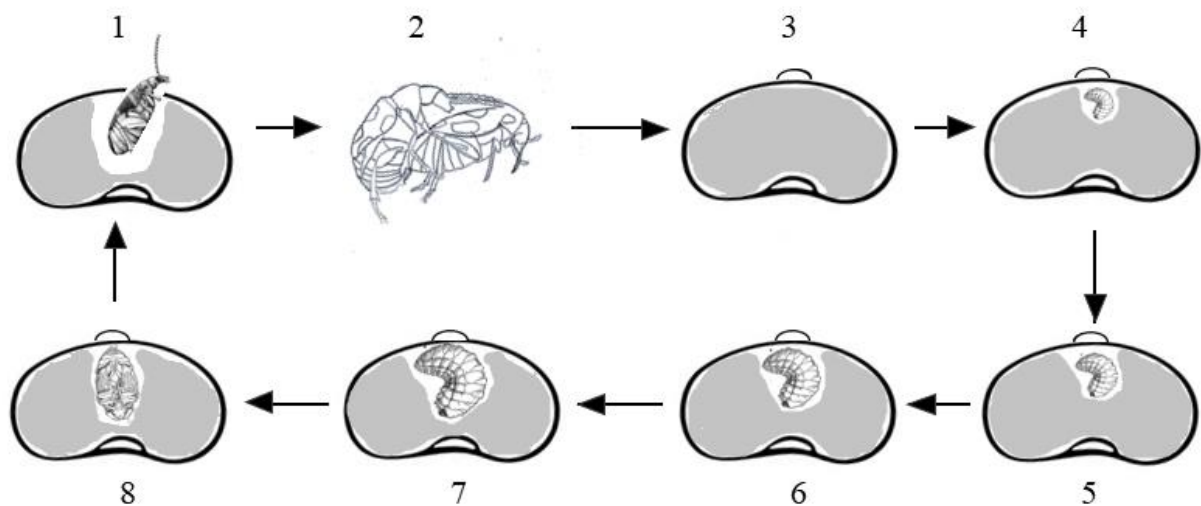
Os estágios de vida de *C. maculatus* incluem ovo, larva, pupa e adulto, portanto, é um inseto holometábolo (Figura 2). Esse inseto tem distribuição cosmopolita, podendo ocorrer em todas as regiões produtoras do feijão. Após o acasalamento, as fêmeas depositam os ovos sobre o tegumento e inicia-se, então, a embriogênese que dura no máximo seis dias. Os ovos medem cerca de 0,75 mm, são claros, brilhantes e após oviposição se encontram fortemente colados no tegumento das sementes (Beck e Blumer, 2011).



**Figura 2. Representação de larva, pupa e adultos de *C. maculatus*.** A: Vista lateral da larva. B: Vista ventral da pupa. C: Vista dorsal do adulto macho. D: Vista dorsal da fêmea. E: Vista lateral do adulto. Adaptado de Brown and Downhower (1988).

À medida que a larva penetra na semente, o ovo torna-se branco e opaco devido a deposição de farinha e resíduos fecais. A larva, dentro da semente se desenvolve, alimentando-se até a fase de pupa. Os adultos emergem das sementes pelas janelas pupais deixando galerias ocas nas sementes. Devido a apresentarem todos estes estágios, são caracterizados por terem metamorfose completa (Figura 3) (Beck e Blumer, 2011).





**Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de *C. maculatus*.** 1 - Inseto adulto emergindo da semente. 2 – Acasalamento. 3 – Ovo depositado sobre a semente. 4 – Larva L1 após penetrar a semente. 5 – Larva L2. 6 – Larva L3. 7 – Larva L4. 8 – Pupa. Baseado em Beck e Blumer (2011).

Os insetos adultos são bem adaptados às condições de armazenamento, não necessitando de comida nem água para se reproduzirem (Beck e Blumer, 2011). Contudo, há relatos de adultos que se alimentam de levedura e água com açúcar em condições de laboratório, aumentando a sobrevivência e a produção de ovos pelas fêmeas adultas (Fox, 1993). Os adultos medem aproximadamente 3 mm e vivem de 10 a 14 dias (28 °C), tempo suficiente para que as fêmeas sejam fecundadas e consigam colocar 80 ovos ou mais causando grandes danos às sementes (Beck e Blumer, 2011; Cardoso *et al.*, 2017).

#### 1.4 - Controle de pragas de grãos armazenados

Como forma de controle destas pragas, algumas medidas preventivas são recomendadas (FAO, 2010). Estas medidas incluem a gestão de pragas durante o pré-armazenamento, para diminuir o risco de transportar pragas primárias do campo para o armazenamento e evitar a infestação cruzada. A limpeza e a secagem dos grãos antes do armazenamento também ajudam na prevenção de infestações (SENAR, 2018).

Com relação as condições de estocagem dos grãos, é sabido que baixas temperaturas causam redução no desenvolvimento, alimentação, fecundidade e na

sobrevivência de insetos pragas. A baixa umidade relativa do ambiente, também produz um ambiente desfavorável aos insetos, diminuindo a longevidade e a sobrevivência. Estes e outros métodos como atmosfera controlada (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) podem ser empregados juntos ou isoladamente (Lorini *et al.*, 2015; SENAR, 2018).

Embora estas medidas sejam recomendadas como controle preventivo, a infestação cruzada é bastante comum e, desta forma, os grãos já chegam nos armazéns infestados. Portanto, a principal forma de controle dessas pragas e o mais eficaz é o método químico, feito por expurgo e pulverização de inseticidas devido à sua eficácia. Esse método de controle é o principal utilizado em sementes de feijão-caupi armazenadas (Lorini *et al.*, 2015; Ribeiro, 2002), onde se destaca o inseticida fumigante fosfeto de alumínio, em que o princípio ativo é a fosfina. Este pesticida mata os insetos em todos os estágios do ciclo de vida. O uso da fosfina é considerado eficiente tanto como tratamento preventivo como curativo. O fosfeto de alumínio, disponível comercialmente em forma de pastilha fumegante, ao entrar em contato com a umidade do ar, libera o gás fosfina, que é altamente tóxico. Entretanto seu uso apresenta risco de intoxicação às pessoas que manuseiam o produto (Lorini *et al.*, 2015), contaminação do meio ambiente, além do alto custo (Kenei *et al.*, 2011). Além disso, é importante citar a ausência de treinamento dos operadores, aplicação de dosagens e período de exposição não recomendados. Estes fatores contribuem para a inviabilização do pesticida, aumentando as falhas do controle de insetos praga (Freitas, 2009).

Outro grave problema do uso constante de inseticidas é a seleção de insetos resistentes. Há registros na literatura demonstrando a resistência de pragas como *Tribolium castenum* (besouro da farinha), *Sitophilus oryzae* (gorgulho do arroz), *Rhyzopertha dominica* (besouro de cereais e farinhas), *Oryzaephilus surinamensis* (praga de grãos de milho) e *C. maculatus* (caruncho do feijão) à fosfina (Ahmed *et al.*, 2002; Benhalima *et al.*, 2004; Lorini *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2007). A resistência de insetos é um problema crescente, pois pode acarretar a inviabilização de vários inseticidas disponíveis no mercado, gerando, posteriormente, altos prejuízos. Considerando estes fatos, o controle de insetos pragas de grãos requer meios ecológicos e menos danosos ao uso de inseticidas (Lorini *et al.*, 2015).

Formas de controle alternativos incluem o desenvolvimento e uso de variedades resistentes, que podem causar atraso na infestação e nos danos aos grãos

(SENAR, 2018). Além disso, a exploração de compostos que fazem parte do mecanismo de defesa natural das sementes resistentes ou menos suscetíveis é extremamente importante, pois auxilia no desenvolvimento de novos cultivares mais resistentes à infestação de pragas (Timko e Singh, 2008).

### 1.5 - Mecanismo de defesa de sementes

Plantas, no geral, vêm desenvolvendo diferentes abordagens evolutivas de defesa para superar os ataques, inclusive de herbívoros (War *et al.*, 2018). Estes mecanismos de defesa incluem barreiras químicas tais como proteínas e metabólitos secundários, que apresentam toxicidade para herbívoros e patógenos. Além disto, a presença de uma toxina pode potencializar a toxicidade de outra, fenômeno conhecido como sinergismo (Wittstock e Gershenzon, 2002). Além dos constituintes químicos, a presença de tricomas ou espinhos, a parede celular espessa, cutícula cerosa e casca espessa e dura constituem barreiras físicas eficientes contra o ataque de herbívoros (War *et al.*, 2012).

Os mecanismos de defesa de plantas ainda podem ser divididos em defesas induzidas e defesas constitutivas e ambas podem contribuir para a proteção de uma planta contra inúmeros predadores (Wittstock e Gershenzon, 2002). As defesas induzidas são moduladas por estímulos externos e baseiam-se na síntese de compostos de defesa somente após o dano inicial por um ataque. Um exemplo de defesa induzida é a liberação de compostos orgânicos voláteis que atraem os inimigos naturais dos herbívoros (War *et al.*, 2012). No entanto, o ataque inicial pode ser muito rápido ou muito severo para que tais defesas induzidas sejam implantadas com eficácia (Wittstock e Gershenzon, 2002; Bixenmann *et al.*, 2016).

As defesas constitutivas são aquelas que já estão presentes no desenvolvimento da planta e são depositadas durante sua formação (Haruta *et al.*, 2001). As sementes quiescentes, por possuírem um metabolismo bastante reduzido, não são capazes de modular respostas de defesa, portanto possuem apenas defesas constitutivas (Oliveira *et al.*, 2009; Bewley e Black, 2013). O tegumento das sementes é uma barreira física e química, com suas características de dureza, espessura e presença de metabólitos secundários e/ou proteínas de defesa (Moïse *et al.*, 2005). O tecido de reserva e eixo embrionário da semente também podem apresentar estes

compostos químicos (Oliveira *et al.*, 2009; Bewley e Black, 2013). É comum que várias espécies de sementes apresentem um conjunto de várias defesas para fornecer proteção contra pragas e patógenos (Welbaum, 2006).

Dentre as proteínas, os inibidores de  $\alpha$ -amilase são alvos importantes no estudo de defesa contra insetos e patógenos em sementes de leguminosas. Essas proteínas atuam na defesa de sementes por inibirem a  $\alpha$ -amilase do sistema digestivo de insetos herbívoros (Tyiagi *et al.*, 2014). Inibidores de  $\alpha$ -amilase de sementes de *P. vulgaris* mostraram atividade inibitória para as  $\alpha$ -amilases de insetos praga como *C. maculatus*, *C. chinensis*, *Diabrotica virgifera virgifera* e *Tenebrio molitor* (Gupta *et al.*, 2014; Tyiagi *et al.*, 2014).

Os inibidores de proteases (IP) são outra classe de proteínas que merecem destaque. Devido à capacidade dos inibidores de proteases (IP) de inibirem a atividade de enzimas proteolíticas, os IP podem atuar nos mecanismos de defesa contra pragas e patógenos (Cândido *et al.*, 2011). Inibidores de tripsina de sementes de *Albizia lebbek* mostrou atividade contra proteases intestinais de *Helicoverpa armígera*, praga que ataca as culturas de algodão, milho, soja, feijão, tomate e sorgo (Ávila *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2012). Inibidores de protease de sementes de *Clitoria fairchildiana* mostraram propriedade inseticida para a traça da farinha (*Anagasta kuehniella*), além disso, esses IP bloquearam a atividade de enzimas digestivas da lagarta da maçã (*Heliothis virescens*) e da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Dantzger *et al.*, 2015). A atividade inseticida dos inibidores de tripsina se estende para insetos hematófagos, como *Aedes aegypti* (Dias *et al.*, 2017). Diversos outros IP têm sido descritos na literatura com atividade inseticida (Oliveira *et al.*, 2007; Tyiagi *et al.*, 2014).

As RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) são uma família de toxinas (Vasconcelos *et al.*, 2018) que fazem parte das proteínas de defesa de sementes. As RIPs atuam inibindo a síntese de proteínas – na fase de tradução – em pragas e patógenos de plantas e já foram descritas em inúmeras espécies de sementes (Dowd *et al.*, 1998; Suharti e Djam'an, 2019).

Proteínas com a característica de ligação à quitina têm sido descritas participando no mecanismo de defesa de sementes. Estas proteínas incluem algumas lectinas, algumas vicilinas, peptídeos vicilina-like, quitinases e heveínas. Através do estudo destas proteínas contra insetos e/ou fungos observou-se que a atividade

inseticida e/ou fungicida que elas apresentam está relacionada com a propriedade de afinidade à quitina (Dahiya *et al.*, 2006; El-Araby *et al.*, 2020; 2017; Marcus *et al.*, 1999; Mota *et al.*, 2003; Slavokhotova *et al.*, 2017)

#### 1.5.1 - Defesa de sementes associada às proteínas com afinidade à quitina

Como já descrito previamente, a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo descrita em fungos, insetos e nematóides, entretanto ainda não foram encontradas em células de planta. Portanto, proteínas que se ligam à quitina são frequentemente estudadas acerca da defesa de plantas contra predadores herbívoros (Egorov e Odintsova, 2012).

Proteínas que se ligam à quitina, na maioria dos casos, possuem um sítio de ligação à quitina (ChBD), uma região estruturalmente conservada composta de 30 a 43 resíduos de aminoácidos, rico em cisteínas, contendo 2 a 3 resíduos de triptofano e glicinas (Slavokhotova *et al.*, 2017). Dentre as proteínas que se ligam à quitina, as lectinas são estudadas por apresentarem atividade inseticida (Lagarda-Diaz *et al.*, 2017) e antimicrobiana (El-Araby *et al.*, 2020). Lectinas são clássicas proteínas ou glicoproteínas que possuem sítios de ligação a mono ou oligossacarídeos e possuem pelo menos um domínio não catalítico (Macedo *et al.*, 2003; El-Araby *et al.*, 2020). Lectinas de ligação à quitina isoladas de sementes de *Moringa oleífera* apresentaram atividade tóxica para a traça da farinha (*Anagasta kuehniella*) prejudicando o ganho de massa larval e afetando a atividade das principais enzimas digestivas desta praga (Oliveira *et al.*, 2017). Lectinas purificadas de sementes de feijão comum (*Phaseolous vulgaris*) foram tóxicas para o desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* (Gatehouse *et al.*, 1984). Além disso, lectinas de ligação à quitina de outras estruturas vegetais como o rizoma de *Setcreasea purpurea* têm mostrado atividades antifúngicas e antivirais (Yao *et al.*, 2010).

Outra classe de proteínas que possui representantes que se ligam à quitina é a das vicilinas. As vicilinas são proteínas de armazenamento que podem representar de 70 a 80 % das proteínas totais nas sementes de leguminosas (Cândido *et al.*, 2011). Vicilinas também são conhecidas como globulinas 7S. Esta denominação deve-se ao seu coeficiente de sedimentação quando são submetidas a ultracentrifugação, cuja unidade é expressa em svedbergs - S (Bewley e Black, 2013)

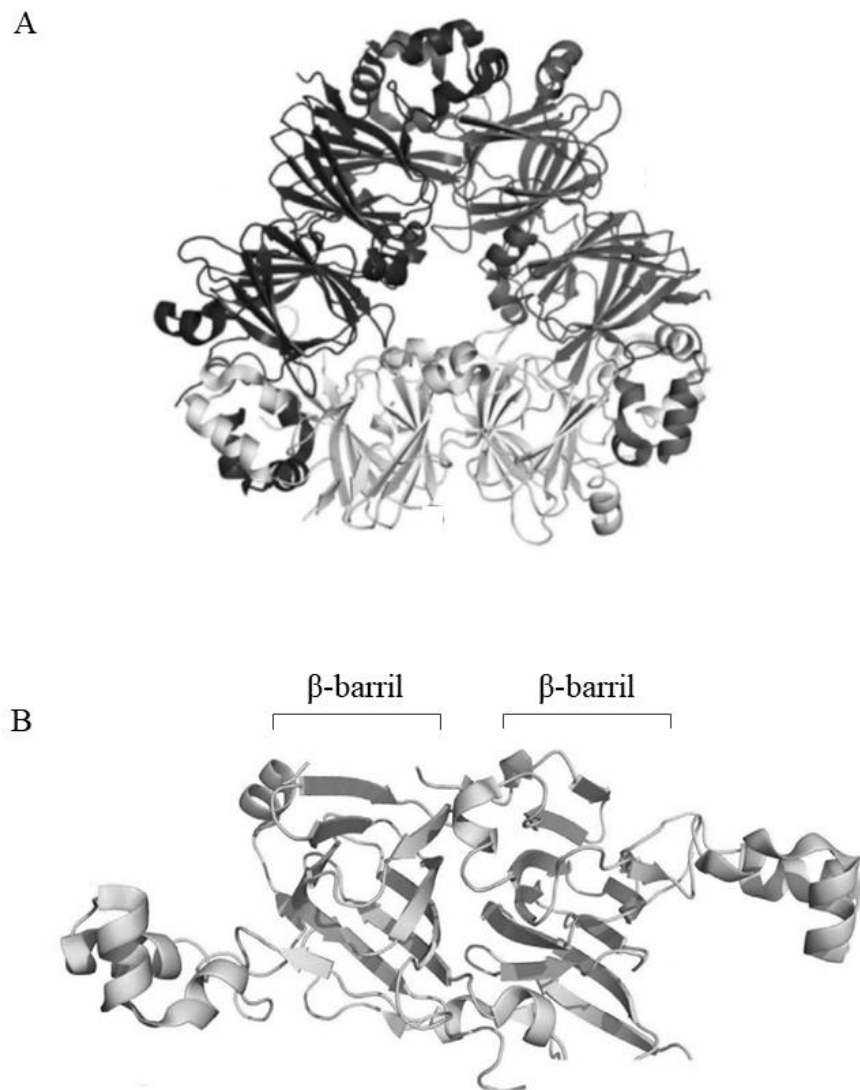
A maioria das globulinas 7S são proteínas glicolisadas com poucos ou nenhum aminoácido do tipo cisteína. Desta forma, não possuem ligações dissulfeto estabilizando suas estruturas terciárias e quaternárias. As vicilinas se organizam de forma trimérica que variam de 150 a 170 kDa (Figura 4). Suas subunidades ou monômeros são ligadas de forma não covalente e possuem de 40 a 70 kDa contendo dois domínios em forma de beta-barril (Figura 4B). Estes domínios pertencem a superfamília das cupinas que caracteriza as vicilinas como bicupinas (Dunwell *et al.*, 2004; Kesari *et al.*, 2017). A proteólise pós-traducional das vicilinas resulta em fragmentos com massas moleculares entre 12,5 e 33 kDa (Gatehouse *et al.*, 1983; Pedrosa *et al.*, 1997). Vicilinas de diferentes leguminosas por vezes recebem nomes específicos como faseolina e canavalina – vicilinas de *Phaseolus vulgaris* e *Canavalia ensiformis*, respectivamente (Shutov *et al.*, 1998).

Estudos têm revelado a multifuncionalidade das vicilinas, pois além de serem a principal fonte de energia e aminoácidos durante o processo de germinação das sementes, elas atuam na defesa constitutiva de muitas espécies vegetais, com atividade contra fungos e insetos (Cândido *et al.*, 2011). Estas defesas no geral são de grande importância para as sementes, que podem compartilhar o mesmo ambiente com diversos patógenos e pragas (Freitas *et al.*, 2007). Estas proteínas já demonstraram atividade tóxica contra uma série de fungos (Tabela 1), dentre eles *Fusarium solan*, *F. oxysporum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Chung *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 1997, 1998). Foi sugerido que as vicilinas tenham se ligado a estruturas de células de levedura contendo quitina interferindo no crescimento celular (Gomes *et al.*, 1998).

Além disso, uma série de peptídeos vicilina-like de sementes tem demonstrado atividades antimicrobianas. O peptídeo MiAMP2c, isolado de grãos de nozes, inibiu vários fungos fitopatogênicos *in vitro*. Clones de cDNA deste peptídeo codificaram uma proteína precursora homóloga às vicilinas 7S (Marcus *et al.*, 1999). Peptídeos de sementes de melão (*Cucumis melo* L.), de pimenta (*Capsicum baccatum*) e de *Malva parviflora* com atividade antifúngica também apresentaram homologia com sequência de vicilinas (Wang e Bunkers, 2000; Wang *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2007; Bard *et al.*, 2014). Peptídeos oriúdos da hidrólise enzimática de *V. unguiculata* (cvs. EPACE-10 e IT81D-1045) inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Saccharomyces cerevisiae* (Uchôa *et*

*al.*, 2009). Estes dados sugerem a participação destes peptídeos na defesa constitutiva de sementes contra patógenos.

Na década de 80, um trabalho desenvolvido por Singh identificou três variedades de feijão-caupi como resistentes à infestação por *C. maculatus*. Os níveis de toxicidade das linhagens TVu 2027, TVu 11952 e TVu 11953 se mostraram semelhantes (Singh *et al.*, 1985). Posteriormente, o cultivar também resistente, IT81D1045, foi produzido a partir da linhagem TVu 2027 e a resistência das sementes desse cultivar foi relacionada, em parte, às vicilinas (Sales *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993).



**Figura 4. Representação generalizada da estrutura terciária de globulina 7s. A:** Forma trimérica. **B:** Forma monomérica. Adaptado de Kesari *et al.*, (2019).

Estudando os mecanismos de toxicidade das vicilinas, observou-se que estas proteínas tiveram menores taxas de digestão no trato intestinal de larvas de *C. maculatus*, quando comparadas com vicilinas isoladas de sementes de cultivares suscetíveis ao inseto (Sales *et al.*, 1992). Foi também mostrado que as vicilinas eram capazes de se ligar às estruturas quitinosas presente no intestino desse inseto, sugerindo um mecanismo de ação relacionado ao bloqueio das funções da matriz peritrófica dos insetos (Sales *et al.*, 2001). Estas proteínas também se ligaram no intestino de outros insetos como a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e a larva da farinha (*Tenebrio molitor*) (Mota *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2008). Adicionalmente, vicilinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum), *P. lunatus* e de diversas leguminosas do gênero *Vigna* apresentaram capacidade de se ligar a uma matriz de quitina *in vitro* (Yunes *et al.*, 1998).

Além da afinidade à quitina apresentada pelos monômeros de vicilinas do cultivar IT81D-1045, peptídeos gerados a partir da hidrólise dessas vicilinas mantiveram a capacidade de ligação a quitina e a toxicidade para larvas de *C. maculatus*, reduzindo a massa larval em 86 % mostrando que, mesmo após a hidrólise parcial, a capacidade de ligação à quitina é preservada (Uchôa *et al.*, 2009).

Embora diversos trabalhos mostrem que muitas vicilinas apresentam capacidade de ligação à quitina, essas proteínas não apresentam o sítio clássico de ligação a quitina (ChBD). Desta forma, estudos mais detalhados têm sido realizados com o objetivo de investigar como se dá as interações entre vicilinas e oligômeros de quitina, bem como identificar seu sítio de ligação. Estudos *in silico* indicam que a ligação entre o monômero de vicilina e oligômeros de N-acetilglicosamina é estabelecida por pontes salinas, ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica. Foi proposto que esta interação ocorre em uma região de alfa-hélice da vicilina em sua conformação monomérica. No entanto, na conformação trimérica, essa alfa-hélice encontra-se menos exposta (Miranda *et al.*, 2020). Rocha *et al.* (2018) sugeriram que a ligação entre o homotrímero de vicilina e oligômeros de N-acetilglicosamina consiste em ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Diferente da proposta com o monômero de vicilina, o *docking* do homotrímero de vicilina e NAG revelou quatro regiões de interação variando de 5 a 9 resíduos de aminoácidos. Um desses



segmentos se localizava no domínio N-terminal e as outras 3 regiões se localizavam no domínio C-terminal da proteína. (Rocha *et al.*, 2018).

**Tabela 1. Fonte de diversas globulinas 7S tóxicas e seus diferentes organismos alvos (fungos e insetos).**

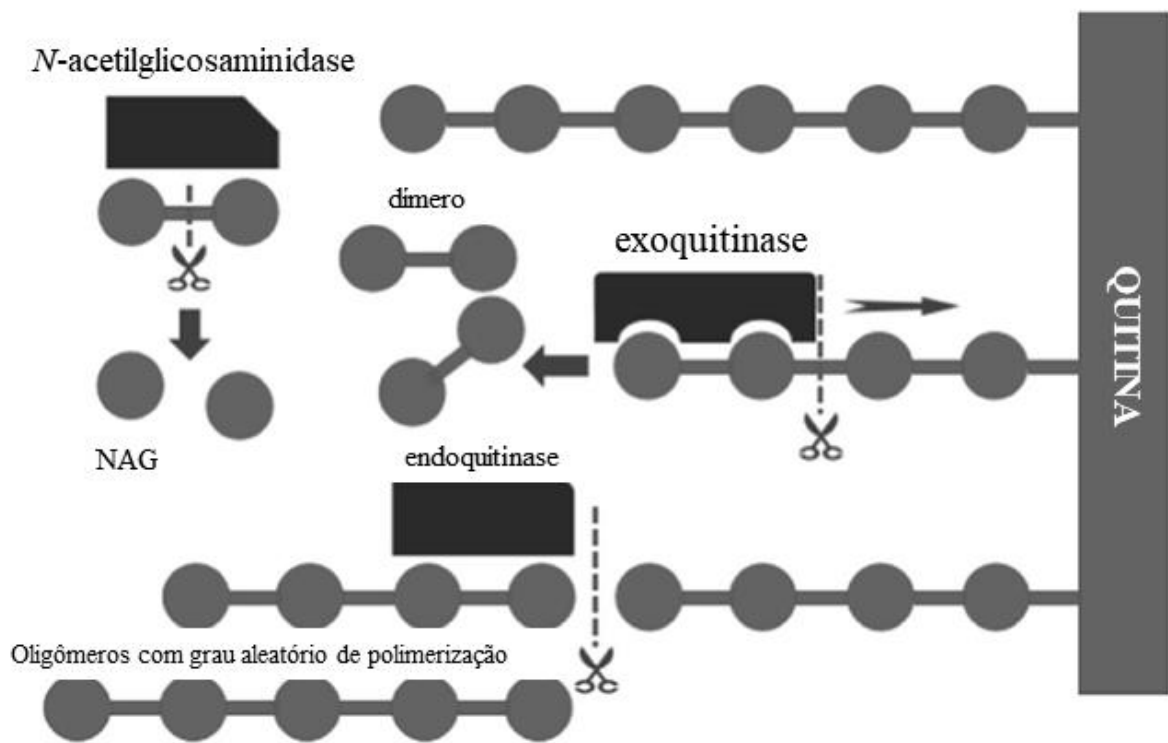
Fonte (semente)	Organismos de descrição da toxicidade	Referência
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>	Chung <i>et al.</i> , 1997
	<u><i>Alternaria brassicicola</i></u>	
	<u><i>Chalara elegans</i></u>	
	<u><i>Fusarium oxysporum</i></u>	
<i>P. vulgaris</i> (feijão-comum)	<u><i>Candida albicans</i>; <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	Gomes <i>et al.</i> , 1998
<i>C. ensiformis</i> (feijão-de-porco)		
<i>V. unguiculata</i> cv. Pitiuba (feijão-caupi)		
<i>V. radiata</i> (feijão-mungu)		
<i>V. unguiculata</i> , cv. IT81D-1045 (feijão-caupi)		
<i>V. unguiculata</i> cv. CE-31, IT81D1045 ou EPACE-10 (feijão-caupi)	<u><i>Ustilago maydis</i></u>	Gomes <i>et al.</i> , 1997
	<u><i>Phytophthora capsici</i></u>	
	<u><i>Fusarium solani</i></u>	
	<u><i>Fusarium oxysporum</i></u>	
	<u><i>Colletotrichum musae</i></u>	
	<i>Tenebrio molitor</i>	Paes <i>et al.</i> , 2008
	<i>Callosobruchus maculatus</i>	Sales <i>et al.</i> , 2001; Uchôa <i>et al.</i> , 2009; Macedo <i>et al.</i> , 1992, 1993; Yunes <i>et al.</i> , 1998, Sales <i>et al.</i> , 2005
	<i>Diatraea saccharalis</i>	Mota <i>et al.</i> , 2003
<i>Albizia lebeck</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i>	Souza <i>et al.</i> , 2012
<i>P. vulgaris</i> (feijão-comum)		Kunz <i>et al.</i> , 2019
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>		Moura <i>et al.</i> , 2007
	<u><i>Fusarium solani</i></u>	
<i>Erythrina velutina</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	<i>Callosobruchus maculatus</i>	
	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Macedo <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ceratitis capitata</i>	
	<i>Plodia interpunctella</i>	Amorim <i>et al.</i> , 2008

Outras proteínas, como quitinases e heveínas, têm mostrado a capacidade de se ligarem à quitina. As heveínas são proteínas lectinas-*like* de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Pertencem ao grupo das proteínas que se ligam à quitina ou a outros compostos que contêm NAG ou ácido *N*-acetilneuramínico. Peptídeos heveína-*like* estão presentes em diversas espécies de sementes e possuem atividade antimicrobiana (Slavokhotova *et al.*, 2017). Estes peptídeos são ricos em cisteína e variam de 29-45 aminoácidos. Peptídeos heveína-*like* de *Moringa oleífera* foram descritos por inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (Kini *et al.*, 2017).

O grupo mais clássico de proteínas que se ligam à quitina compreende o das quitinases (Welbaum, 2006). As quitinases são enzimas hidrolíticas com massas moleculares que variam de 20 a 90 kDa e degradam a quitina através da catálise da hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4 (Kumar *et al.*, 2018). De acordo com o local de clivagem, as quitinases podem ser classificadas em endoquitinases e exoquitinases (Zhou *et al.*, 2019). As endoquitinases clivam a quitina em regiões internas e aleatórias da quitina, liberando múltiplos de NAG. As exoquitinases são divididas em quitobiosidases e *N*-acetil  $\beta$ -1-4-glucosaminidases. As quitobiosidases catalisam a extremidade não redutora da quitina liberando diacetilquitobiose. As *N*-acetil  $\beta$ -1-4-glucosaminidases, por sua vez, degradam os produtos das quitobiosidases e das endoquitinases (Figura 5), liberando monômeros de NAG (Malik, 2019).

A presença de quitinases já foi relatada em uma gama de organismos como em bactérias, fungos, insetos, plantas superiores e animais. As quitinases são importantes em diferentes funções dependendo do organismo. Estas enzimas participam desde a degradação parcial da cutícula antiga em insetos e crustáceos até a digestão no trato gastrointestinal de vertebrados (Dahiya *et al.*, 2006).

Em plantas, as quitinases têm sido relacionadas a defesa como, por exemplo, contra fungos patogênicos (Dahiya *et al.*, 2006). Outros trabalhos têm relatado quitinases de plantas degradando estruturas quitinosas de patógenos e pragas, como a matriz peritrófica e a cutícula de insetos e a parede celular de fungos (Jalil *et al.*, 2015). Quitinase isolada de feijão-caupi apresentou atividade antifúngica para *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum musae* (Gomes *et al.*, 1996). Em 2016, Kabir *et al.*, isolaram uma quitinase de sementes de *Trichosanthes dioica* que teve atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. (Kabir *et al.*, 2016).



**Figura 5. Desenho esquemático da hidrólise da quitina por quitinases.** Fonte: Zhou *et al.* (2019).

Acerca do seu papel inseticida, foi visto que quitinases do látex da amoreira apresentaram toxicidade contra a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Kitajima *et al.*, 2010). A expressão de quitinases de *Manduca sexta* (praga da cultura de tabaco) em folhas de tabaco transgênico inibiu o crescimento de *Heliothis virescens* (lagarta-da-maçã) reduzindo o dano foliar causado pela predação. Além disso, a presença destas quitinases transgênicas potencializou a ação da toxina de *Bacillus thuringiensis*, interferindo o desenvolvimento de *H. virescens* e de *M. sexta* (Ding *et al.*, 1998). Quitinases de outros organismos, como bactérias, têm apresentado atividade inseticida contra *Helopeltis theivora*, o mosquito praga das culturas de chá (Suganthi *et al.*, 2017). O trabalho de Mendonsa *et al.* (1996) indicou atividade larvicida de quitinases do fungo *Myrothecium verrucaria* na degradação da cutícula do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti* (Mendonsa *et al.*, 1996).

Quitinases encontradas em tegumentos de soja (*Glycine max*), causaram até 87 % de redução na massa larval de *C. maculatus* e 90 % de mortalidade destes insetos (Silva *et al.*, 2018). Gomes *et al.* (1996) isolaram uma quitinase de feijão-caupi e observaram que esta enzima afetou negativamente o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* em sementes artificiais (Gomes *et al.*, 1996). Considerando seu papel

na defesa de plantas, as quitinases apresentam grande potencial como agente de biocontrole (Singh e Arya, 2019) e tem recebido atenção dos pesquisadores com o intuito de gerar benefícios para a agricultura, evitando o ataque dessas pragas e patógenos (Jalil *et al.*, 2015).

#### 1.6 - Cultivares de feijão-caupi menos suscetíveis ao ataque de *C. maculatus*

Como vem sendo mencionado, a investigação de compostos de defesa naturais auxilia no desenvolvimento de cultivares mais resistentes à infestação de pragas. Novos cultivares mais resistentes apresentam uma boa alternativa para diminuir o uso de inseticidas, oferecendo aos agricultores um meio econômico ao controle das pragas e a possibilidade de implementação de um sistema agrícola sustentável. Logo, a tentativa de muitos programas de melhoramento de plantas cultivadas tem sido combinar as características de resistência às doenças e pragas à outras características de interesse agrônomo, como produtividade (Timko e Singh, 2008).

A África, Ásia e América Central e do Sul receberam, nos últimos anos, mais de 40 variedades melhoradas de feijão-caupi. Mesmo que uma variedade não apresente resistência a múltiplas pragas, a resistência a pragas individuais pode reduzir o número de pulverizações necessárias para obter ótimos rendimentos (Timko e Singh, 2008). Novas linhagens melhoradas de feijão-caupi tiveram bons rendimentos de grãos sem qualquer tratamento de inseticidas, dentre estas, as linhagens IT90K-277-2, IT93K-452-1, IT94K-437-1, IT97K-569-9, IT95K-222-3, IT97K-837 e IT97K-499-38 foram as que tiveram mais sucesso. Com a aplicação do spray de inseticida de uma a duas vezes nestas linhagens, elas foram capazes de produzir a mesma quantidade de grãos que as variedades suscetíveis, onde a aplicação de inseticidas ocorreu de quatro a seis vezes (Fatokun *et al.*, 2002). Ao longo dos anos, muitas pesquisas se dedicaram a identificação de cultivares resistentes de *V. unguiculata*. O trabalho de Kpoviessi *et al.* (2019) reuniu os achados de cultivares de feijão-caupi que apresentam certa resistência a *C. maculatus* publicados de 1985 até 2018, mostrando a existência de mais de 60 cultivares com essa característica (Kpoviessi *et al.*, 2019).

Nove cultivares originados pelo Programa de Melhoramento de Feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte, Brasil foram caracterizados quanto a suscetibilidade ou resistência à infestação por *C. maculatus*. Os resultados obtidos mostraram a presença de características de resistência em vários cultivares. Os cultivares BRS Guariba e BRS Tucumaque foram os que apresentaram menor quantidade de ovos após 24 h de infestação, quando comparados com o cultivar suscetível Fradinho. A sobrevivência larval e o peso das larvas sobreviventes foram reduzidos em todos os cultivares estudados, principalmente nos cultivares BRS Pajeú, BRS Guariba e BRS Xiquexique (Cruz *et al.*, 2016).

Dentre estes cultivares, o cultivar BRS Xiquexique diminuiu 70 % a sobrevivência larval. O peso das larvas sobreviventes no cultivar BRS Xiquexique diminuiu em aproximadamente 50 % e a massa da semente consumida pelo inseto foi drasticamente menor em comparação à massa de Fradinho consumida. Além disto, as atividades das principais enzimas digestivas das larvas desenvolvidas nos cultivares BRS Pajeú, BRS Guariba e BRS Xiquexique diminuíram consideravelmente (Cruz *et al.*, 2016). Embora os dados apresentados para o cultivar BRS Xiquexique sejam promissores, os mecanismos de toxicidade para o inseto permanecem desconhecidos. Estudos mais aprofundados sobre compostos tóxicos deste cultivar para *C. maculatus* são de extrema importância para a caracterização mais refinada da resistência dessas sementes à infestação pelo inseto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

Isolar e caracterizar proteínas com afinidade à quitina de sementes de *Vigna unguiculata* cv. BRS Xiquexique tóxicas para o inseto *Callosobruchus maculatus*.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Isolar proteínas com afinidade à quitina (CBP) de cotilédones dos cvs. Fradinho e BRS Xiquexique;
- Avaliar a toxicidade das frações CBP para as larvas de *C. maculatus*
- Purificar e avaliar a toxicidade de vicilinas com ligação à quitina (CBV) para as larvas de *C. maculatus*;
- Obter os peptídeos de vicilina que se ligam à quitina;
- Avaliar a toxicidade do composto calcofluor para *C. maculatus*;
- Identificar, *in silico*, regiões de interação com NAG<sub>4</sub> nos peptídeos de vicilina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Insetos

Os insetos *C. maculatus* foram obtidos a partir da colônia mantida pelo Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos do Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes - RJ. Os insetos se desenvolveram em sementes de *V. unguiculata* (cv. Fradinho), dentro de frascos de vidro com furos na tampa para entrada de ar, no escuro em estufa B.O.D com temperatura (28 °C) e umidade (60 %) controlados. Larvas de 13 a 22 DAO foram coletadas, fotografadas, pesadas e tiveram seus comprimentos medidos através do software ImageJ. Além disso, as larvas foram dissecadas e processadas para dosagem de macromoléculas e enzimas (item 3.11).

#### 3.2 - Sementes de *V. unguiculata*

As sementes de *V. unguiculata* (cv. Fradinho) foram obtidas comercialmente em mercados locais da cidade de Campos dos Goytacazes e mantidas a -70 °C até serem utilizadas.

As sementes de *V. unguiculata* (cv. BRS Xiquexique) foram desenvolvidas pelo Projeto “Desenvolvimento de cultivares para o agronegócio do feijão-caupi no Brasil” e foram cedidas à UENF pela Embrapa Meio-Norte, Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte – CPAMN.

#### 3.3 - Isolamento de proteínas com afinidade à quitina

Extratos proteicos dos cotilédones de *V. unguiculata*, de ambos os cultivares Fradinho e BRS Xiquexique, foram obtidos a partir de farinha de cotilédone extraídas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 6,0, em uma proporção de 1:10, de acordo com Ferreira (2018). Esta mistura foi mantida sob agitação durante 1 h, a 4 °C e posteriormente centrifugada por 10 min, 4 °C a 10.000 x g. O sobrenadante proteico foi submetido ao fracionamento por cromatografia de afinidade à quitina. Esta etapa foi realizada até a obtenção de material suficiente para as próximas etapas.

### 3.4 - Tratamento da quitina

O tratamento da quitina foi realizado de acordo com Miranda *et al.* (2020). Quitina (Sigma-Aldrich) foi misturada com ácido clorídrico 100 mM (50 g/L) e incubada durante 24 h à 4 °C com agitações manuais periódicas. Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 10 min à 7.000 x *g* a 4 °C. Ao precipitado foram adicionados 500 mL de hidróxido de sódio 100 mM e esta mistura foi aquecida à 100 °C durante 16 h. O sobrenadante foi descartado e o aquecimento com hidróxido de sódio 100 mM se repetiu por mais 2 vezes. O precipitado foi centrifugado durante 10 min à 7.000 x *g* e 4 °C e posteriormente acidificado com ácido clorídrico 200 mM, dialisado contra água por 48 h e utilizado como matriz para a cromatografia de afinidade.

### 3.5 - Cromatografia de afinidade à quitina

A solução proteica obtida no item 3.3 foi fracionada em cromatografia de afinidade à quitina de acordo com Ferreira (2018). O extrato proteico (18 mL) foi incubado com a matriz de quitina (30 mL) e estes foram mantidos sob agitação lenta por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura das proteínas com a matriz foi montada em coluna de vidro cromatográfica sob um fluxo de 1,33 mL/min. As proteínas não retidas em quitina foram lavadas com solução de acetato de sódio 100 mM, pH 6,0 e as proteínas retidas em quitina (CBP) foram eluídas com HCl 100 mM. A fração CBP foi dialisada contra a água durante 48 h e recuperada por liofilização.

### 3.6 - Caracterização de proteínas da fração CBP

#### 3.6.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A visualização do perfil proteico da fração CBP dos cultivares Fradinho e BRS Xiquexique foi realizada através de gel de poliacrilamida SDS PAGE 15 % segundo Laemmli (1970). O gel foi formado de acrilamida mix 30 %, tampão Tris HCl (1,5 M, pH 8,8), SDS 10 %, APS 10 % e TEMED. Esta solução foi aplicada em um molde de 0,1 cm x 10,1 cm x 7,3 cm para polimerização (BioRad).



A fração CBP (1 mg) foi diluída em 200 µL de tampão de amostra (4 x) e uma alíquota de 20 µL foi aplicada no gel. Um padrão de massas moleculares conhecidas (Thermo) também foi aplicado no gel. Tampão de corrida, constituído de tris, glicina e SDS (pH 8,3) foi utilizado durante a migração das proteínas ao longo do gel. A migração se deu em corrente de 100 V. Ao término da migração, o gel foi lavado com água destilada e corado por 4 h, em solução corante (comassie blue R 250 0,1 %, álcool metílico 40 % e ácido acético 10 %). Após este período, o gel foi descorado com álcool metílico 40 % e ácido acético 10 %, sob agitação contínua por cerca de 12 h. Posteriormente, o gel foi fotografado.

### 3.6.2 - *Western blotting*

Um gel de eletroforese não corado, contendo as proteínas do cv. BRS Xiquexique, separadas após migração foi usado para a transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose e realização de *Western blotting*, segundo Towbin *et al.* (1979). Ao término da transferência, a membrana foi lavada com água destilada e foi adicionada uma solução corante Ponceau para confirmar a transferência das bandas. Posteriormente, a membrana foi lavada com água destilada e incubada com tampão bloqueador (leite em pó desnatado 2 % em PBS- cloreto de sódio 500 mM; fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6). A membrana embebida no bloqueador foi incubada à 4 °C, *overnight*.

A membrana foi retirada do tampão bloqueador, lavada com água destilada e usada para a reação imunológica para detecção de quitinases e vicilinas. Para a detecção de vicilina nas amostras foi adicionado à membrana o anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata*, produzido em coelho, diluído em tampão bloqueador na proporção de 1:1000. E para a detecção de quitinase nas amostras foi adicionado o anticorpo anti-quitinase de *Adenantha pavonina*, produzido em coelho, diluído em tampão bloqueador na proporção de 1:1000. A membrana foi incubada na solução de anticorpo por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com água destilada e posteriormente embebida na solução do anticorpo secundário, anti IgG de coelho, complexado a peroxidase, diluído em tampão bloqueador na proporção de 1:1000, por 1 h, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com água destilada. Para visualização das proteínas reagentes foi aplicada uma solução reveladora (4,9 mL de água destilada, 100 µL de tris HCl, 2 M, pH 7,5, 300 µL de imidazol 0,1 M, 10 mg de

DAB e 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A revelação foi interrompida pela lavagem da membrana com água destilada.

### 3.6.3 – Quantificação de vicilinas através de ELISA

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Engvall e Perlmann (1971). Para a sensibilização, as amostras, o controle de vicilina e o branco foram adicionados em uma placa de ELISA MaxiSorp de 96 poços (NUNC). Os extratos proteicos dos cotilédones do cv. BRS Xiquexique e a fração CBP foram adicionadas em triplicatas. O tampão carbonato bicarbonato pH 9,2 foi utilizado para diluir as amostras em uma razão de 2  $\mu\text{g}$  de proteína para 10  $\mu\text{L}$  de tampão.

A placa, com as amostras, foi incubada *overnight* a 4° C. Posteriormente, os poços foram lavados 2 vezes com tampão PBS-tween 20 (fosfato de sódio 0,1 M + NaCl 0,5 M, pH 7,6 + tween 0,05 %). Foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de tampão bloqueador-tween 20 (PBS + 1 % de gelatina incolor + tween 0,05 %) em cada poço, por 2 h à temperatura ambiente.

Os poços foram lavados com PBS-tween 20. O anticorpo anti-vicilina diluído no tampão bloqueador-tween 20 (1:1000) foi aplicado em cada poço. A placa foi incubada por 2 h, à temperatura ambiente e os poços foram lavados 10 vezes com PBS-tween 20. Feito isso, o anticorpo anti-IgG de coelho, complexado a peroxidase, foi diluído no tampão bloqueador (1:1000) e aplicado em cada poço. A placa foi incubada por 1 h em temperatura ambiente e os poços foram lavados com PBS + tween 10 vezes.

Para a revelação foi utilizado um volume de 50  $\mu\text{L}$ /poço da solução reveladora (10 mg de OPD em 25 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M, pH 5,0 e 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A placa foi incubada por 10 min na ausência de luz e a imunorreação foi interrompida com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 N. As absorbâncias das amostras foram lidas em leitor de microplacas à 492 nm.

### 3.6.4 - Identificação das proteínas por espectrometria de massas

As bandas proteicas da fração CBP do cv. BRS Xiquexique, separada em SDS-PAGE (15 %), coradas com comassie blue 0,05 % e descorada com ácido acético 10

% foram recortadas e submetidas a identificação por espectrometria de massas. Quatro bandas com massas moleculares entre 20 e 40 kDa foram recortadas do gel com auxílio de bisturi e digeridas com tripsina de acordo com Shevchenko *et al.* (1996). Os peptídeos gerados foram dessalinizados em matriz C18. Nanocromatografia de fase reversa acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução nanoeletrospray foi realizada para identificação dos peptídeos. A cromatografia foi realizada em instrumento EASY nLC II (Thermo Scientific). Os peptídeos eluídos foram introduzidos em espectrômetro de massas LTQ XL/Orbi/Trap (Thermo) para análises. O perfil de massas dos peptídeos foi analisado usando o software Peaks Studio X e o alinhamento dos peptídeos foi feito utilizando o BLASTp.

### 3.7 - Isolamento de vicilinas

O isolamento das vicilinas foi realizado considerando a insolubilidade dessas proteínas em água. A fração CBP dialisada e liofilizada foi diluída em água (1mg/mL) e centrifugada durante 20 min, 4 °C, a 10.000 x *g*. Este processo foi repetido por 2 vezes e o precipitado final foi liofilizado. O precipitado, parte não solúvel em água, constituiu a fração rica em vicilinas, denominada CBV (Chitin Binding Vicilins).

### 3.8 - Determinação da atividade de quitinase

A presença de quitinase nas frações CBP e CBV de cv. BRS Xiquexique foi analisada segundo Silva *et al.* (2018). A atividade de quitinase foi detectada utilizando chitin azure (Sigma-Aldrich) como substrato. As frações foram diluídas em acetato de sódio 100 mM, pH 5.0 (3 µg/µL). Um volume de 100 µL destas soluções foi incubado com 4 mg de chitin azure, à 37 °C, durante 1 h. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de HCl 1 M e as suspensões foram centrifugadas a 2.000 x *g* durante 5 min. A absorbância dos sobrenadantes foi lida à 540 nm. Quitinase pura (1,95 mU/mg) de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão para determinar a atividade presente nas frações.

### 3.9 – Hidrólise das vicilinas e isolamento dos peptídeos com afinidade à quitina

#### 3.9.1- Hidrólise da fração CBV

A fração CBV (30 mg) foi hidrolisada com papaína (10 mg), quimiotripsina (5 mg) e tripsina (5 mg) em 50 mL de tampão citrato-fosfato (acetato de sódio 100 mM, citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 200 mM e DTT 1,5 mM, pH 5,6). A solução foi incubada à 37 °C sob agitação durante 4 h. Após a incubação, a solução foi fracionada em cromatografia de afinidade conforme o item 3.5. A fração retida em quitina (vicilina e peptídeos de vicilina), após eluição com HCl 0,1M, foi diluída com 50 mL de água destilada e dialisada contra 500 mL de água destilada, *overnight*, em membrana (sacos de diálise) com poros que excluíam moléculas com massas moleculares inferiores à 10 kDa. Os peptídeos inferiores a 10 kDa, então, foram recuperados por liofilização da água de diálise.

#### 3.9.2 - Eletroforese em gel de SDS-tricina-PAGE

O perfil dos peptídeos gerados a partir da hidrólise da fração CBV, retidos em quitina, foi visualizado em gel de tricina de acordo com Schägger *et al.* (1987). Os peptídeos foram diluídos 1:10 em tampão de amostra (Tris 500 mM, pH 7,0; glicerol; Comassie blue) e aplicados no gel. O perfil foi comparado com proteínas de massas moleculares conhecidas (Thermo). As proteínas migraram ao longo do gel com corrente de 32 V. Ao término da migração, o gel foi lavado com água destilada e corado por 4 h, em solução corante (Comassie Blue R 250 0,1 %; álcool metílico 40 % e ácido acético 10 %). Após este período, o gel foi descorado com solução descorante (álcool metílico 40 % e ácido acético 10 %), sob agitação contínua por cerca de 12 h. Posteriormente, o gel foi digitalizado e analisado para estimativa das massas moleculares das bandas peptídicas observadas.

#### 3.10 - Toxicidade das frações para *C. maculatus*

As frações CBP obtidas de *V. unguiculata*, (cv. Fradinho e cv. BRS Xiquexique) e a fração CBV (obtida do cv. BRS Xiquexique) foram incorporadas em sistema de

sementes artificiais, segundo Macedo *et al.* (1993), nas concentrações de 5 % para as frações CBP e 2 % para a fração CBV.

Calcofluor, (ligante de quitina Sigma-Aldrich) na concentração de 0,1 %, também foi incorporado em sementes artificiais da seguinte forma: calcofluor (1,2 mg) e farinha de cotilédone do cv. Fradinho (1,198 g), foram diluídos em 5 mL de água destilada, homogeneizados e recuperados por liofilização. Posteriormente, esta farinha foi dividida em porções de 400 mg e cada porção foi prensada utilizando uma prensa de botão em um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm), gerando três sementes artificiais.

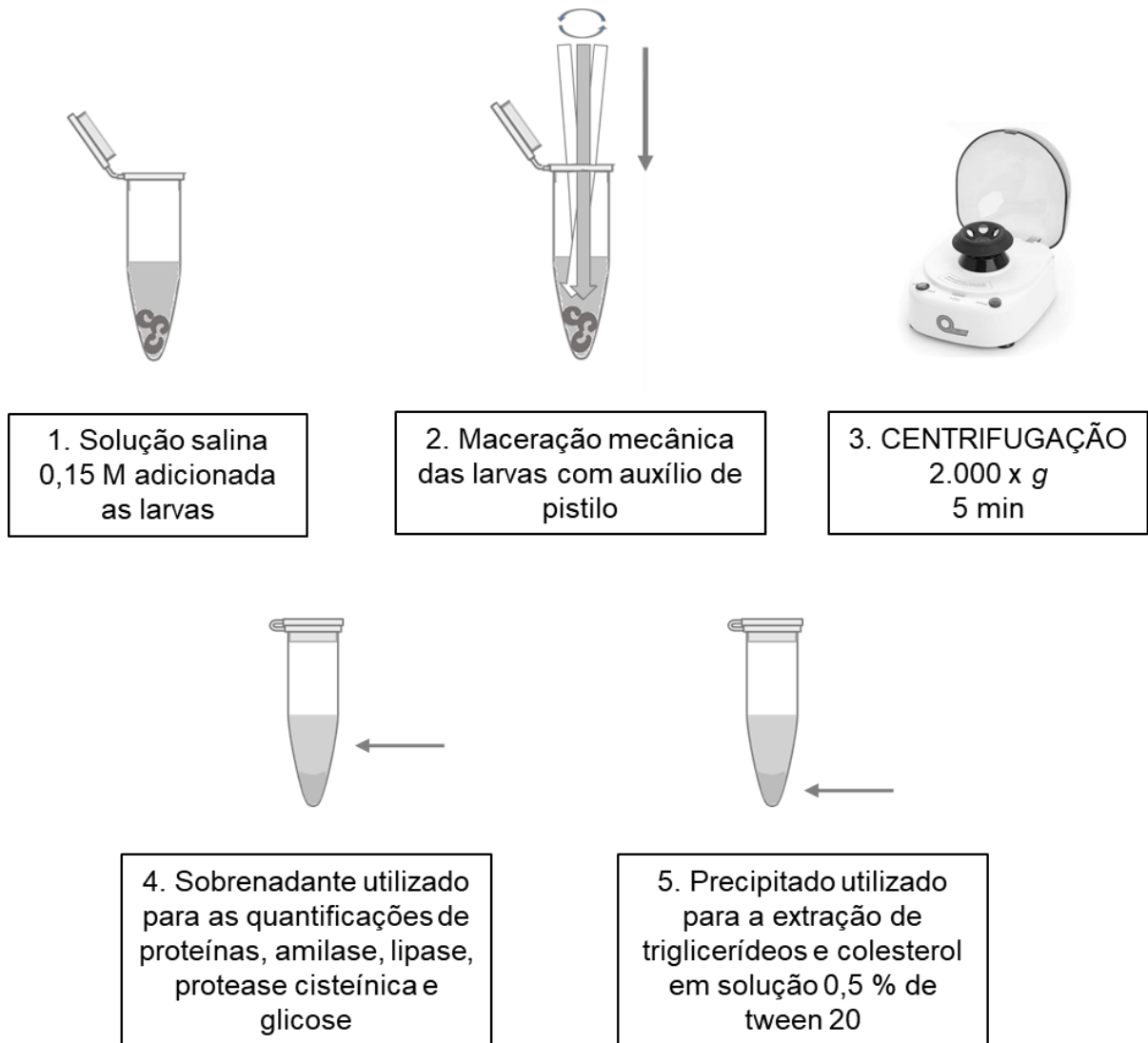
As sementes controles foram constituídas de 400 mg de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* (cv. Fradinho). As sementes artificiais foram infestadas com fêmeas de 2 dias de idade durante 24 h e após este período o excesso de ovos foi removido, deixando-se apenas 3 ovos por semente. As sementes foram incubadas em estufa B.O.D com temperatura (28 °C) e umidade controlados (60 %). A eclosão larval foi observada no 6º DAO (dia após a oviposição) e no 20º DAO as sementes foram desfeitas para a retirada das larvas. A massa das larvas foi determinada e comparada com as larvas desenvolvidas nas sementes controle. Além disto, estas larvas foram fotografadas para análise de sua morfologia e determinação dos seus comprimentos, medidos através do *software* ImageJ.

### 3.11 - Quantificação das macromoléculas e das atividades de enzimas nas larvas de *C. maculatus*

#### 3.11.1 - Extração larval

Larvas desenvolvidas em sementes naturais de cv. Fradinho (13 a 21 DAO) e em sementes artificiais (5 % de CBP e 2 % de CBV do cv. BRS Xiquexique) foram submetidas às quantificações bioquímicas.

Para a extração, as larvas foram maceradas em uma solução de cloreto de sódio 0,15 M (1 mg/15 µL) como ilustra a figura X. O extrato foi agitado durante 30 min à 4 °C, centrifugado 2.000 x g e o sobrenadante usado para as dosagens de glicose, proteínas, lipases e α-amilases.



**Figura 6. Representação esquemática da extração larval.** Imagem autoral (2021).

O precipitado foi extraído com solução 0,5 % de tween 20 (10 mg/15  $\mu$ L), sob agitação por 30 min à 4 °C. O sobrenadante obtido após centrifugação foi usado para dosagens de triacilgliceróis.

Para os ensaios de atividades de proteases cisteínicas, as larvas foram maceradas em tampão citrato fosfato pH 5,0 (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, triton x-100 0,1 % e DTT 1,5 mM). O extrato larval foi mantido sob agitação durante 1 h, à 4 °C e posteriormente centrifugado a 2.000 x g durante 10 min.

Todos estes ensaios foram realizados em placa de 96 poços e em triplicata experimental.

### 3.11.2 - Quantificação de proteínas

Para quantificar as proteínas das larvas foi utilizado o método de BCA de acordo com Smith *et al.* (1985). O extrato larval (10 µL) foi pipetado nos poços. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de sulfato de cobre e BCA (2 mL de BCA para 0,04 mL de sulfato de cobre). A placa foi incubada a 37 °C durante 30 min e as absorbâncias foram lidas à 540 nm. Uma curva de ovalbumina (Sigma Aldrich), com concentrações entre 0,2 e 1 µg/µL foi utilizada como padrão para calcular a concentração de proteína das amostras.

### 3.11.3 – Quantificação de glicose

Para este ensaio foi utilizado o kit Glicose Monoreagente seguindo o manual do fabricante (BioClin). Este kit é formado por dois reagentes:

- Reagente nº 1 (reagente enzimático) contendo tampão, fenol, 4-aminoantipirina, glicose oxidase, peroxidase, estabilizante, surfactante e conservante.
- Reagente nº 2 (padrão) constituído de glicose (100 mg/dL) e conservante.

Ao extrato larval (2 µL) foram adicionados 200 µL do reagente enzimático. À glicose (2 µL) também foi adicionado 200 µL do reagente enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à 37 °C durante 10 min. As absorbâncias foram lidas em 492 nm. A quantidade de glicose das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit:

$$Glicose (mg/dL) = \frac{Abs(Amostra) \times 100}{Abs(Padrão)}$$

### 3.11.4 – Quantificação de triglicerídeos

Este ensaio foi realizado utilizando o kit Triglicérides Monoreagente da Bioclin, seguindo manual do fabricante (BioClin). Este kit é composto por 2 reagentes:

- Reagente nº 1 (reagente enzimático), que contém 4-clorofenol, lipase lipoproteica, glicerol kinase, peroxidase, glicerol-3-fosfato oxidase, 4-aminoantipirina, ATP, ativador, estabilizante, surfactante e conservante.
- Reagente nº 2 (padrão) – que contém triglicérides (100 mg/dL) e diluente.

Ao extrato larval (2 µL) foram adicionados 200 µL do reagente enzimático. Ao triglicérido (2 µL) também foi adicionado 200 µL do reagente enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à 37 °C durante 10 min. As absorbâncias foram lidas em 500 nm. A quantidade de triglicérides das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Abs(Amostra)} \times 100}{\text{Abs(Padrão)}}$$

### 3.11.5 – Determinação da atividade de α-amilase

Este ensaio foi realizado utilizando o kit Amilase Monoreagente da Bioclin, seguindo as instruções de uso do fabricante. Este kit é formado por 2 reagentes:

- Reagente nº 1 (substrato) que contém: amido, tampão fosfato (pH 7,0), estabilizante e conservante.
- Reagente nº 2 (reagente de cor; solução estoque de iodo). O reagente nº 2 foi utilizado para preparar o reagente de trabalho constituído de 5 mL do reagente nº 2 + 45 mL de água destilada.

O volume de 100 µL do substrato para cada ponto amostral foi incubado durante 2 min à 37 °C. Posteriormente, esse substrato foi adicionado ao extrato larval (2 µL) e ao controle negativo (solução 0,5 % tween 20) (2 µL). Estas soluções foram incubadas durante 7,5 min à 37 °C. O volume de 100 µL do reagente de trabalho foi adicionado nas amostras juntamente com 800 µL de água. As absorbâncias foram lidas em 630 nm. A atividade de α-amilase das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit:

$$\alpha - \text{amilase (U/dL)} = \frac{\text{Abs(Amostra)} - \text{Abs(Controle Negativo)}}{\text{Abs(Controle Negativo)} \times 800}$$



### 3.11.6 – Determinação da atividade de lipase

Este ensaio foi realizado utilizando o kit Lipase Monoreagente da Bioclin, seguindo as instruções de uso do fabricante. Este kit é composto por 5 reagentes:

- Reagente nº 1 (tampão) – Tris 100 mM, pH 8,5
- Reagente nº 2 (inibidor enzimático – 8 mM) – fenilmetilsulfonil fluoreto e solubilizante
- Reagente nº 3 (reagente de cor – 3 mmol/L) – DTNB, acetato de sódio e estabilizador
- Reagente nº 4 (substrato – 20 mmol/L) – tiobutirato ditiopropanol e surfactante
- Reagente nº 5 - acetona

Ao extrato larval (5 µL) foram adicionados 100 µL de tampão, 5 µL de inibidor enzimático e 10 µL de reagente de cor. Para cada amostra havia um controle, que não havia inibidor enzimático. As amostras foram incubadas durante 2 min à 37 °C. O volume de 10 µL de substrato foi adicionado às amostras e 10 µL de tampão salina (solução de cloreto de sódio 0,15 M) foram adicionados aos controles. Estas amostras foram incubadas durante 30 min à 37 °C. A reação foi interrompida com 200 µL de acetona. As amostras foram homogeneizadas, mantidas sob repouso por 5 min e centrifugadas à 2.000 x g durante 5 min. As absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas em 405 nm. A atividade de lipase das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit:

$$Lipase (U/L) = \frac{Abs(Amostra) - Abs(Controle Negativo)}{7} \times 1000$$

### 3.11.7 – Quantificação de proteases cisteínicas

O ensaio foi feito segundo Michaud *et al.* (1994) usando azocaseína como substrato. A azocaseína foi preparada como solução a 1 % em tampão citrato-fosfato (100 mM de citrato de sódio pH 5,6; 100 mM de fosfato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 1,5 mM de DTT). O volume de 40 µL do extrato larval (anteriormente diluído em uma proporção de 1:2) foi adicionado à solução de azocaseína (80 µL). As amostras foram incubadas à 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida com TCA 10 % (300

μL). As amostras foram centrifugadas à 2.000 x g durante 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 300 μL de hidróxido de sódio 1 M. As absorbâncias foram lidas em 440 nm. Uma curva de papaína (Fluka), com concentrações entre 0,0125 e 0,275 μg/μL foi utilizada como padrão para calcular a concentração de protease cisteínica das amostras, através da seguinte fórmula:

$$\text{Protease cisteínica } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Abs}_{\text{amostra}} \cdot \bar{x}(F),$$

$$\text{onde, } F_n = \frac{C_n}{\text{Abs}_n};$$

*n* = ponto da curva e *C* = concentração

### 3.12 – Experimentos *in silico*

#### 3.12.1 - Modelagem molecular

As sequências dos peptídeos da banda b1 da fração CBP, obtidas por espectrometria de massas, foram alinhadas no BLASTp com proteínas armazenadas no PDB. A proteína de maior identidade, 2EA7.A, foi utilizada como template para modelagem molecular da sequência utilizando o *software* AutoModel v. 0.10. O modelo gerado foi validado através do programa PROCHECK.

#### 3.12.2 - Busca das proteases de *C. maculatus*

A fim de identificar as principais classes de proteases no inseto, foram feitas buscas em dados de transcriptoma e proteoma de larvas de *C. maculatus* disponíveis na literatura. Os trabalhos publicados por Sayadi *et al.* (2016), Moon *et al.* (2004), Nogueira *et al.* (2012) e Pedra *et al.* (2003) foram usados como bandos de dados de buscas para escolha das principais proteases. Essas proteases foram, então, utilizadas para a simulação da hidrólise, *in silico*, da vicilina modelada. A partir da enzima escolhida foram escolhidos os locais de clivagem para obtenção dos peptídeos de vicilina.

### 3.12.3 – Identificação dos sítios de ligação à quitina (ChBD)

Buscas na literatura foram feitas no intuito de comparar regiões da sequência de vicilinas prováveis de se ligarem a oligômeros de NAG. Os sítios de ligação à quitina previamente identificados nos trabalhos de Miranda *et al.* (2020) e Rocha *et al.* (2018) foram buscados manualmente na sequência dos peptídeos obtidos neste trabalho. Regiões de glicosilação nos peptídeos também foram identificadas utilizando a plataforma ELM (<http://elm.eu.org/>). Os peptídeos que continham sítios de ligação à quitina e sítios de glicosilação foram modelados a partir da estrutura tridimensional da vicilina modelada (item 3.12.1) utilizando o programa PyMol.

### 3.12.4 - Docking do monômero de vicilina e dos peptídeos de vicilina com o tetrâmero de N-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>

Todos os modelos gerados (vicilina e peptídeos), foram submetidos ao programa DockThor v. 2, desenvolvido por dos Santos *et al.*, (2020). A estratégia de docking cego foi realizada utilizando um espaço de busca definido por um cubo de 40 Å x 40 Å x 40 Å, cobrindo toda a superfície da proteína. O ligante utilizado foi o tetrâmero de N-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>, criado a partir do PyMol com o plug-in Azahar para desenhar oligossacarídeos. Todas as rotações do ligante estavam livres para girar enquanto os átomos da proteína foram mantidos rígidos. O algoritmo padrão de busca do site foi utilizado com 1.000.000 de avaliações e 24 execuções por experimento. O melhor modelo de encaixe foi avaliado através da energia de ligação e submetidos ao programa PLIP Web Tool, desenvolvido por Salentin *et al.*, (2015) e ao programa LigPlot+ v. 2.2.4, desenvolvido por Laskowski e Swindells (2011). Através destes programas foram identificadas as interações não covalentes entre a vicilina e (NAG)<sub>4</sub> e entre os peptídeos da vicilina e (NAG)<sub>4</sub>. O programa LigPlot+ v. 2.2.4 indica apenas as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio e fornece dados de distância apenas das ligações de hidrogênio.

### 3.13 - Análise estatística dos dados

Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas independentes. As médias, o desvio padrão e o tratamento estatístico foram feitos utilizando o software

GraphPad Prism 5.0. As análises de variância (ANOVA) e análises do teste Tukey (Teste T) foram realizadas segundo Bridge e Sawilowsky (1999). Resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

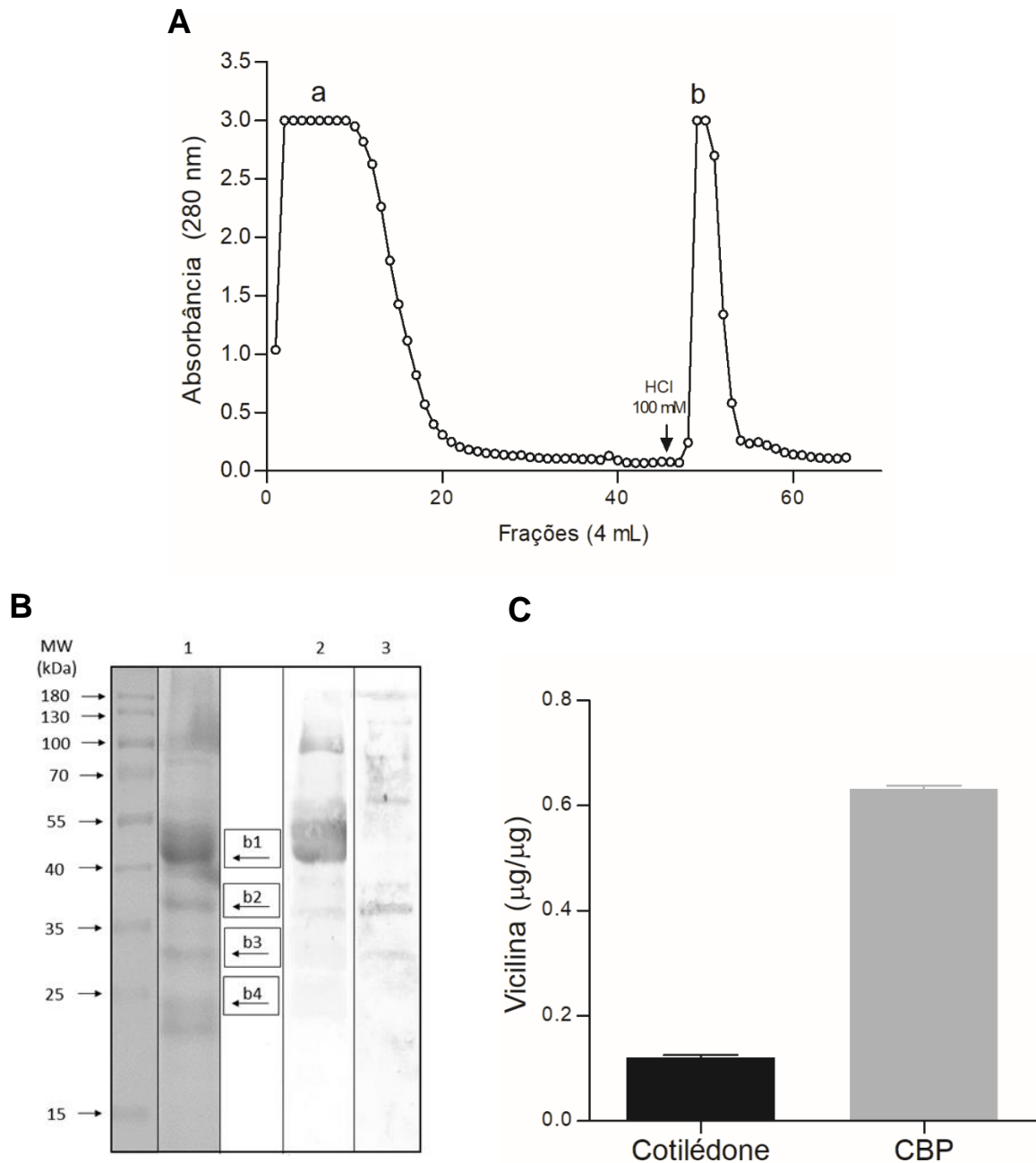
### 4.1 – Isolamento e identificação de proteínas com afinidade à quitina (CBP) em sementes de *Vigna unguiculata*

O ensaio cromatográfico a partir dos extratos proteicos do cv. BRS Xiquexique mostrou que parte das proteínas apresentaram afinidade à quitina. A Figura 6-A apresenta o perfil cromatográfico obtido. O pico b observado a partir da eluição com HCl 100 mM indica a presença de proteínas que se ligam à quitina, denominadas fração CBP, contudo, a alta absorvância obtida nas leituras pode indicar interferência de pigmentos presentes nas amostras.

O perfil proteico da fração CBP foi visualizado através de gel de poliacrilamida (15 %) e mostrou uma variação de bandas com massas moleculares de 100 kDa até abaixo de 25 kDa. Quatro bandas entre 55 e 15 kDa, denominadas b1, b2, b3 e b4 (Figura 6-B) foram recortadas do gel e analisadas por espectrometria de massas. A presença de vicilinas na fração CBP foi detectada através de *Western blotting* (Figura 6-B2) e ELISA (Figura 6-C). Bandas majoritárias compreendidas entre 55 e 40 kDa e com 100 kDa reagiram com o anticorpo anti-vicilina. Bandas menos intensas foram reativas com o anticorpo anti-quitinase (Figura 6-B3).

Os peptídeos gerados a partir das bandas b1, b2, b3 e b4 foram analisados por espectrometria de massas e sua similaridade com vicilinas de *V. unguiculata* (Acesso UniProt: A8YQH5\_VIGUN) foi verificada por BLASTp. O alinhamento destes peptídeos se encontra na Figura 7. Alguns peptídeos originados a partir da banda b4 também apresentaram similaridade com uma quitinase de *C. ensiformis* (Acesso UniProt: O81934\_CANEN) (Figura 8), sugerindo a presença de entidades moleculares distintas (vicilinas e quitinases) na banda b4.

Proteínas com afinidade à quitina também foram obtidas do cultivar Fradinho, suscetível à infestação pelo inseto (Figura 9-A). O perfil proteico da fração retida em quitina foi visualizado através de gel SDS-PAGE (12 %) e foram observadas bandas majoritárias entre 35 e 70 kDa (Figura 9-B), similares às observadas no cv. BRS Xiquexique (Figura 6-B).



**Figura 7. Isolamento e caracterização de proteínas com afinidade à quitina (CBP) de sementes do cultivar de *V. unguiculata* BRS Xiquexique. A:** Cromatografia de afinidade à quitina. Proteínas não retidas (a) foram coletadas com acetato de sódio 100 mM e as proteínas retidas em quitina (b) foram eluídas com HCl 100 mM. **B:** SDS-Page e *Western blotting* da fração CBP. MW – Marcador de massa molecular. 1 – Fração CBP. Caixas b1, b2, b3 e b4 representam as bandas que foram submetidas às análises de espectrometria de massas. 2 – Detecção de vicilinas 3 – Detecção de quitinases. **C:** Quantificação de vicilinas em cotilédones do cv. BRS Xiquexique e na fração CBP obtida. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados apresentados são as médias obtidas.

A8YQH5	VPLLLGLVLF	LASLSVSFGI	VH	<b>RGHQESQE</b>	<b>ESEPRGQNNP</b>	<b>FYFDSDRWFH</b>	<b>TLFRNQYGHL</b>	<b>RVLQRFDRS</b>	<b>KQIQNLENYR</b>	80	
b1				<b>RGHQESQE</b>	<b>ESEPRGQNNP</b>	<b>FYFDSDRWFH</b>	<b>TLFRNQYGHL</b>	<b>R</b>	<b>S KQIQNLENYR</b>		
b2				<b>RGHQESQE</b>	<b>ESEPRGQNNP</b>	<b>FYFDSDRWFH</b>	<b>TLFRNQYGHL</b>	<b>R</b>	<b>S KQIQNLENYR</b>		
b3					<b>GQNNP</b>	<b>FYFDSDRWFH</b>	<b>TLFRNQYGHL</b>	<b>R</b>	<b>QIQNLENYR</b>		
b4				<b>RGHQESQE</b>	<b>ESEPRGQNNP</b>	<b>FYFDSDRWFH</b>	<b>TLFRNQYGHL</b>	<b>R</b>	<b>S KQIQNLENYR</b>		
A8YQH5	VVEFQ	<b>SKPNT</b>	<b>LLLPHHADAD</b>	<b>FLLVVLNGRA</b>	<b>ILTLVNPDGR</b>	<b>DSYILEQGHA</b>	<b>QKTPAGTTF</b>	<b>LVNHDDNENL</b>	<b>RIVKLAVPVN</b>	160	
b1		<b>SKPNT</b>	<b>LLLPHHADAD</b>	<b>FLLVVLNGRA</b>	<b>ILTLVNPDGR</b>	<b>DSYILEQGHA</b>	<b>QK</b>		<b>IVKLAVPVN</b>		
b2		<b>SKPNT</b>	<b>LLLPHHADAD</b>	<b>FLLVVLNGRA</b>	<b>ILTLVNPDGR</b>	<b>DSYILEQGHA</b>	<b>QK</b>		<b>IVKLAVPVN</b>		
b3		<b>SKPNT</b>	<b>LLLPH</b>	<b>A</b>	<b>ILTLVNPDGR</b>	<b>DSYILEQGHA</b>	<b>QK</b>		<b>IVKLAVPVN</b>		
b4		<b>SKPNT</b>	<b>LLLPHHADAD</b>	<b>FLLVVLNGRA</b>	<b>ILTLVNPDGR</b>	<b>DSYILEQGHA</b>	<b>QK</b>		<b>IVKLAVPVN</b>		
A8YQH5	<b>NPHRFQDFFL</b>	<b>SSTEAAQSYL</b>	<b>QGFSKNILEA</b>	<b>SFDSDFKEIN</b>	<b>RVLFGEERQK</b>	<b>QQDEESQQEG</b>	<b>VIVQLKREIQI</b>	<b>RELMKHAKST</b>		240	
b1	<b>NPHRFQDFFL</b>	<b>SSTEAAQSYL</b>	<b>QGFSKNILEA</b>	<b>SFDSDFKEIN</b>	<b>RVLFGEERQK</b>	<b>QQDEESQQEG</b>	<b>VIVQLK</b>				
b2	<b>NPHRFQDFFL</b>	<b>SSTEAAQSYL</b>	<b>QGFSKNILEA</b>	<b>SFDSDFKEIN</b>	<b>RVLFGEERQK</b>	<b>QQDEESQQEG</b>	<b>VIVQLK</b>				
b3	<b>NPHRFQDFFL</b>	<b>SSTEAAQSYL</b>	<b>QGFSKNILEA</b>	<b>SFDSDFKEIN</b>	<b>RVLFGEERQK</b>	<b>QQDEESQQEG</b>	<b>VIVQLK</b>				
b4	<b>NPHRFQDFFL</b>	<b>SSTEAAQSYL</b>	<b>QGFSKNILEA</b>	<b>SFDSDFKEIN</b>	<b>RVLFGEERQK</b>	<b>QQDEESQQEG</b>	<b>VIVQLK</b>				
A8YQH5	SK	<b>KSLSTQNE</b>	<b>PFNLRSQKPI</b>	<b>YSNKFGRLE</b>	<b>ITPEKNPQLR</b>	<b>DLDVFLTSVD</b>	<b>IK</b>	<b>EGGLLMPN</b>	<b>YNSKAIVILV</b>	<b>VNKGEANIEL</b>	320
b1		<b>KSLSTQNE</b>	<b>PFNLRSQKPI</b>	<b>YSNKFGRLE</b>	<b>ITPEKNPQLR</b>			<b>EGGLLMPN</b>	<b>YNSKAIVILV</b>	<b>VNKGEANIEL</b>	
b2			<b>SQKPI</b>	<b>YSNKFGRLE</b>	<b>ITPEKNPQLR</b>			<b>EGGLLMPN</b>	<b>YNSKAIVILV</b>	<b>VNKGEANIEL</b>	
b3			<b>SQKPI</b>	<b>YSNKFGRLE</b>	<b>ITPEKNPQLR</b>			<b>EGGLLMPN</b>	<b>YNSKAIVILV</b>	<b>VNKGEANIEL</b>	
b4		<b>LSTQNE</b>	<b>PFNLRSQKPI</b>	<b>YSNKFGRLE</b>	<b>ITPEKNPQLR</b>			<b>EGGLLMPN</b>	<b>YNSKAIVILV</b>	<b>VNKGEANIEL</b>	
A8YQH5	<b>VGQREQQQQQ</b>	<b>QESWEVQR</b>	<b>RAEVSDDV</b>	<b>VIPASYPAI</b>	<b>TAT</b>	<b>SNLNFA</b>	<b>FGINAENNQR</b>	<b>NFLAGEEDNV</b>	<b>MSEIPTEVLD</b>	400	
b1	<b>VGQREQQQQQ</b>	<b>QESWEVQR</b>				<b>SNLNFA</b>	<b>FGINAENNQR</b>		<b>SEIPTEVLD</b>		
b2	<b>VGQREQQQQQ</b>	<b>QESWEVQR</b>				<b>FIA</b>	<b>FGINAENNQR</b>				
b3	<b>VGQREQQQQQ</b>	<b>QESWEVQR</b>				<b>FIA</b>	<b>FGINAENNQR</b>				
b4	<b>VGQREQQQQQ</b>	<b>QESWEVQR</b>				<b>FIA</b>	<b>FGINAENNQR</b>				
A8YQH5	<b>VTFPASGEK</b>	<b>EKLINKQSDS</b>	<b>HFTDHSSKRE</b>	<b>ERV</b>							
b1	<b>VTFPASGEK</b>										
b2											
b3											
b4											

**Figura 8. Múltiplo alinhamento das sequências dos peptídeos de CBP de sementes de BRS Xiquexique com vicilina de sementes de *V. unguiculata*. (Acesso UniProt: A8YQH5\_VIGUN). Destaques em cinza representam regiões de similaridade. Alinhamento realizado através do BLASTp.**

```

081934 MKLGSVFTFT LAYILLVTSS KLPSVAGDDV GSVIDASLFD QLLKHRNDPA CEGKGFYSYN AFVTAARSFG GFGTTGDTNT 80
b4 DV GSVIDASLFD QLLK GFYSYN AF SFG GFGTTGDTNT

081934 RKREVA AFLA QTSHE TTGGA AGSPDGPYAW GYCFVTERDK SNKYCDPGTP CPAGKSYGR GPIQLTHNYN YAQAGRALGV 160
b4 R GYCFVTER GPIQLTHNYN YAQAGRALGV

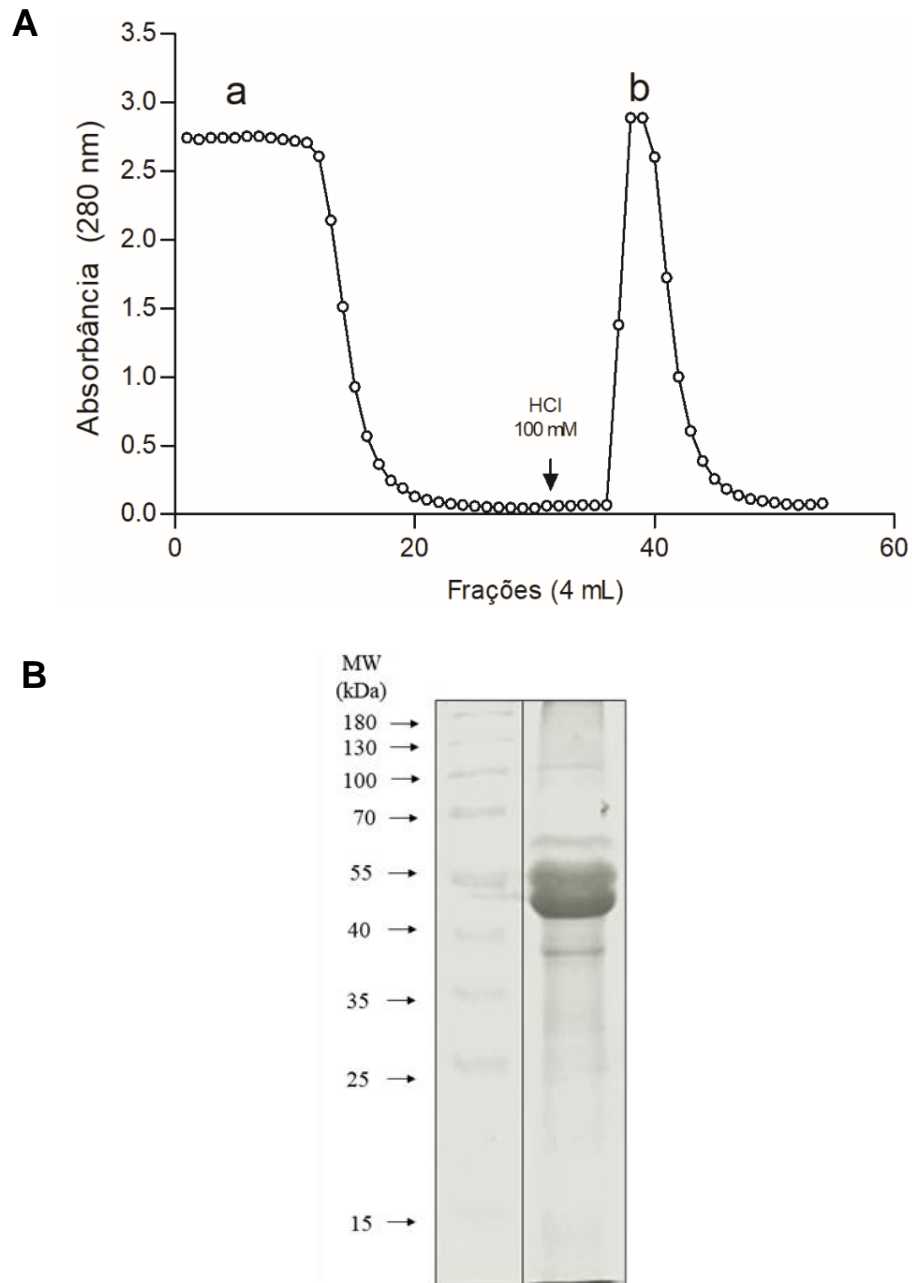
081934 DLINNPDLVA RDAVISFKTA IWFWMTPQGN KPSCHDVITN RWTPSAADVA ANRTPGFGVI TNIINGGIEC GRGPSPASGD 240
b4 DLINNPDLVA RDAVISFKTA IWFWMTPQGN KPSCHDVITN RWTPSAADVA ANR

081934 RIGFYKRYCD VLHLSYGNL NCRDQRPFGG
b4 DQRPFGG

```

**Figura 9. Alinhamento das sequências dos peptídeos da banda b4 de CBP de sementes de BRS Xiquexique com quitinase de sementes de *C. ensiformis*. (Acesso UniProt: O81934\_CANEN). Destaques em cinza representam regiões de similaridade. Alinhamento realizado através do BLASTp.**



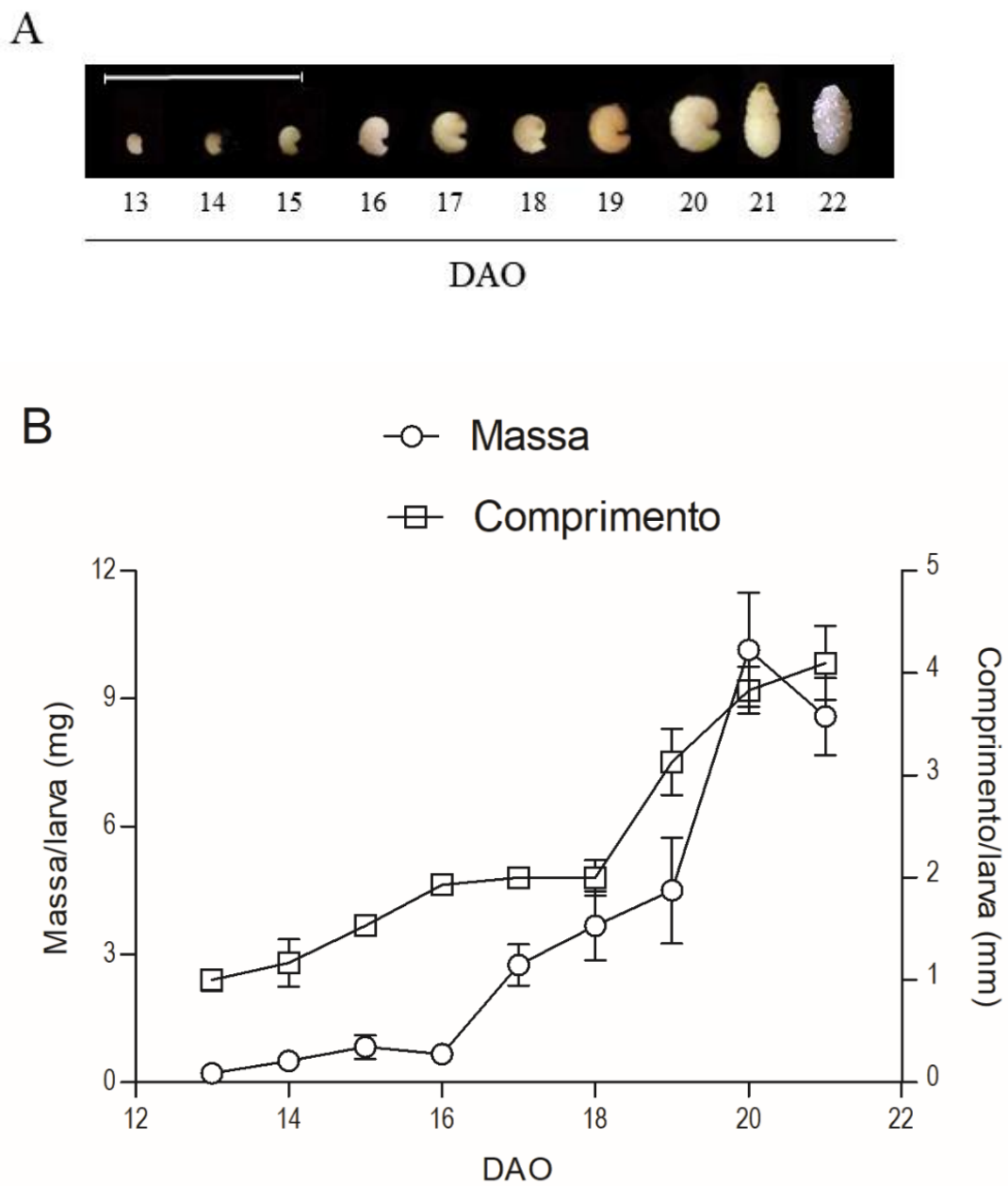


**Figura 10. Isolamento e caracterização de proteínas com afinidade à quitina (CBP) de sementes de *V. unguiculata* cv. Fradinho. A:** Cromatografia de afinidade à quitina. Proteínas não retidas (a) foram coletadas com acetato de sódio 100 mM e as proteínas retidas em quitina (b) foram eluídas com HCl 100 mM. **B:** SDS-Page e *western blotting* da fração CBP. MW – Marcador de massa molecular.

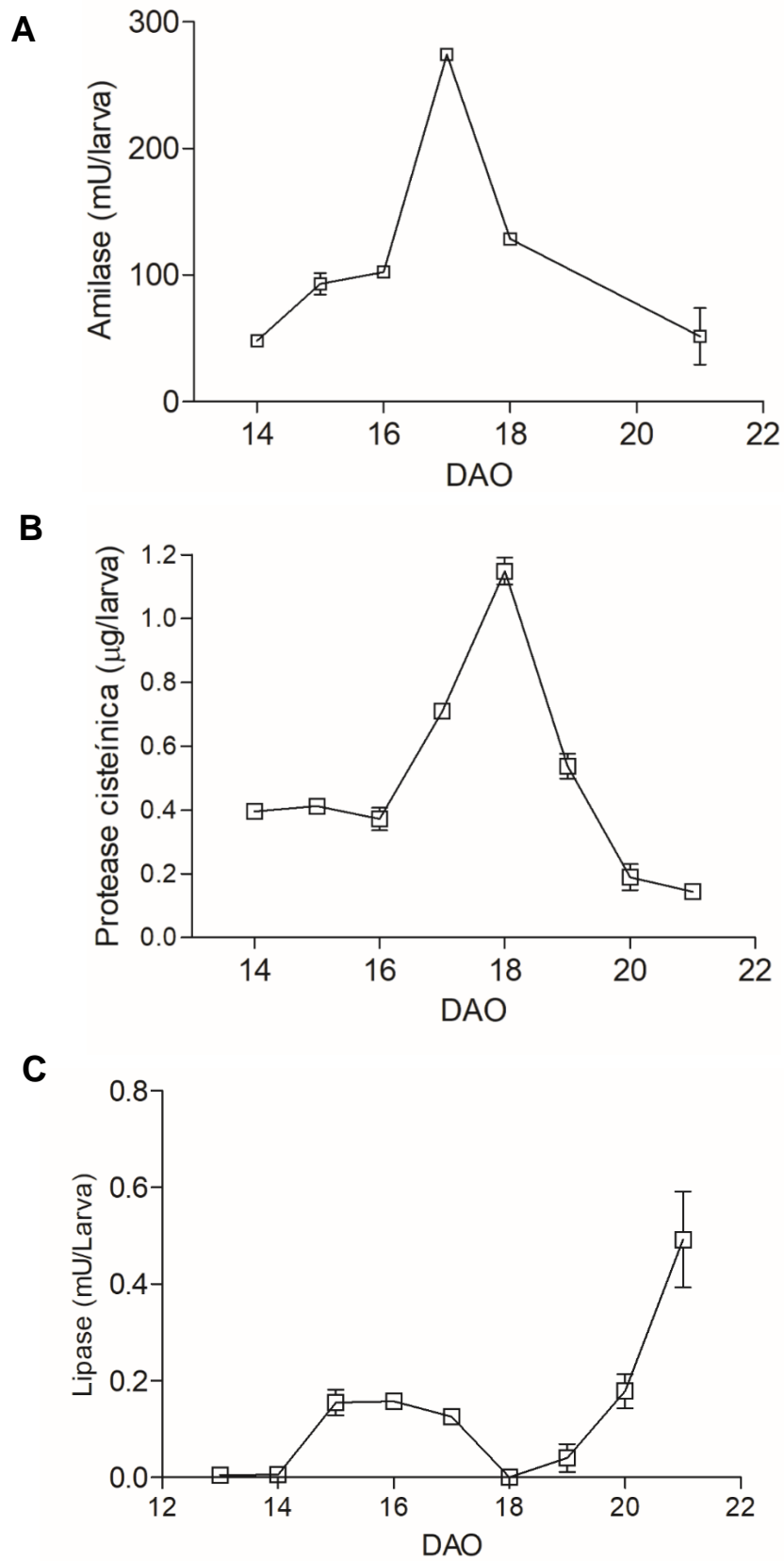
## 4.2 – Análise do desenvolvimento larval de *C. maculatus* em sementes naturais de *V. unguiculata* cv. Fradinho

Para melhor entender o desenvolvimento de *C. maculatus*, bem como o perfil metabólico de algumas macromoléculas e atividades enzimáticas, larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> instares e pupas presentes em sementes do cv. Fradinho foram coletadas de 13 a 22 DAO (Figura 10) e submetidas a determinação de atividades enzimáticas (Figura 11) e dosagens de macronutrientes (Figura 12). A morfologia aparente das larvas durante o desenvolvimento foi similar entre 13 e 20 DAO (Figura 10-A), variando a massa e o comprimento (Figura 10-B). No 21<sup>o</sup> DAO já observamos a formação de pré-pupas e no 22<sup>o</sup> DAO, pupas (Figura 10-A). A Figura 10-B apresenta a massa e o comprimento médios destas larvas. É possível observar ganho de massa expressivo a partir do 17<sup>o</sup> até o 20<sup>o</sup> DAO (4<sup>o</sup> instar). O comprimento é constantemente ascendente a partir do 18<sup>o</sup> DAO.

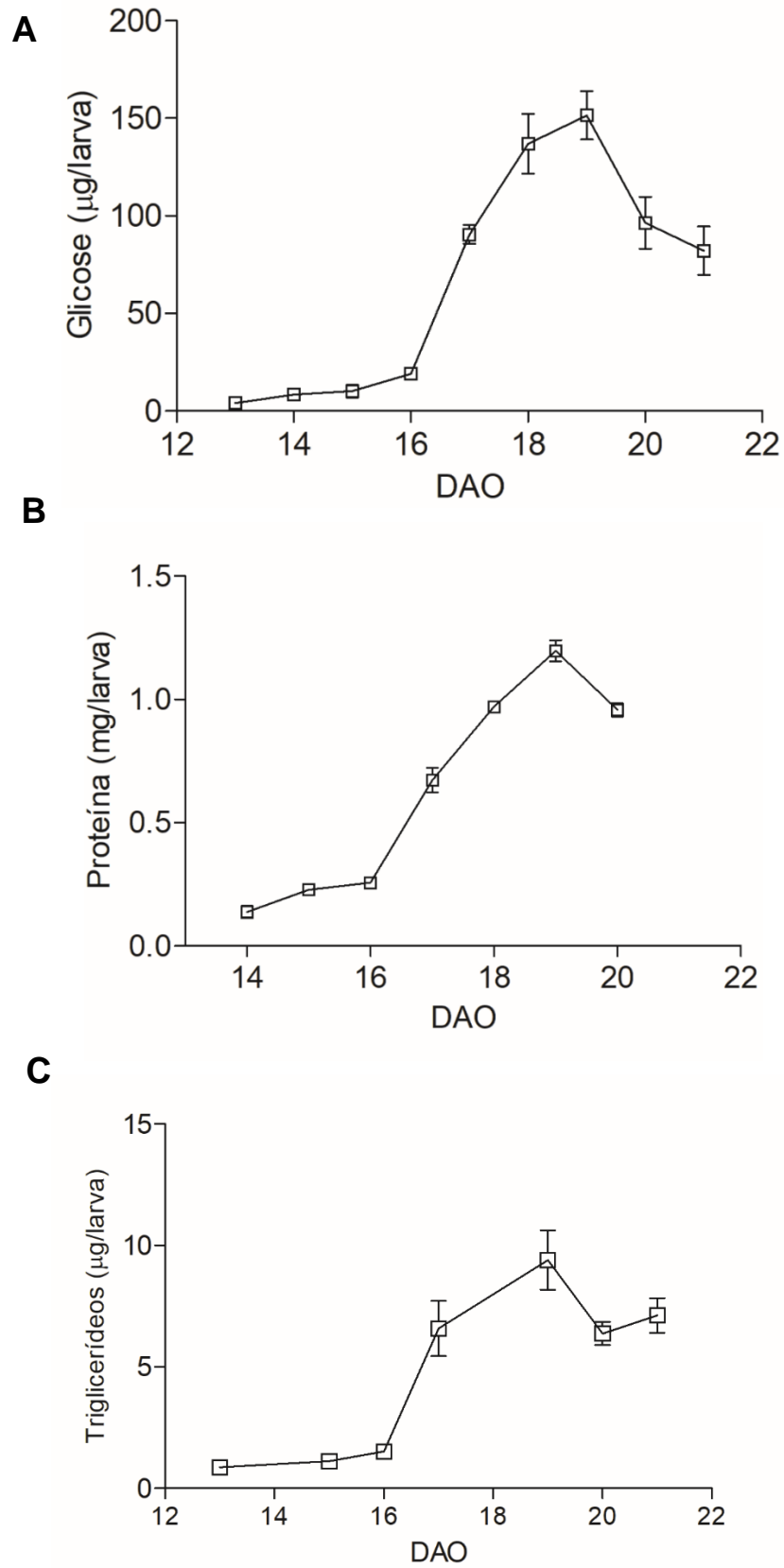
Durante o desenvolvimento larval, é possível observar que os níveis da atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase e proteases cisteínicas são crescentes a partir do 16<sup>o</sup> DAO, com máxima atividade de  $\alpha$ -amilase em 17<sup>o</sup> DAO (Figura 11-A) e de proteases cisteínicas em 18<sup>o</sup> DAO (Figura 11-B). No entanto, os níveis de lipase têm um perfil diferente ao longo do desenvolvimento, observando-se baixos níveis de atividade nas larvas, com aumento à medida que o inseto entra em estágio de pupa (Figura 11-C). As quantificações de glicose (Figura 12-A), proteínas (Figura 12-B) e triglicerídeos (Figura 12-C) se elevam a partir do 16<sup>o</sup> até o 19<sup>o</sup> DAO, quando atingem um pico e então começam a decrescer.



**Figura 11. Desenvolvimento larval de *C. maculatus* em sementes de feijão-caupi cv. Fradinho. A:** Esquematisação das larvas coletadas de 13 a 22 DAO. Barra=1 cm. **B:** Massa e comprimento das larvas de *C. maculatus* de 13 a 21 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.



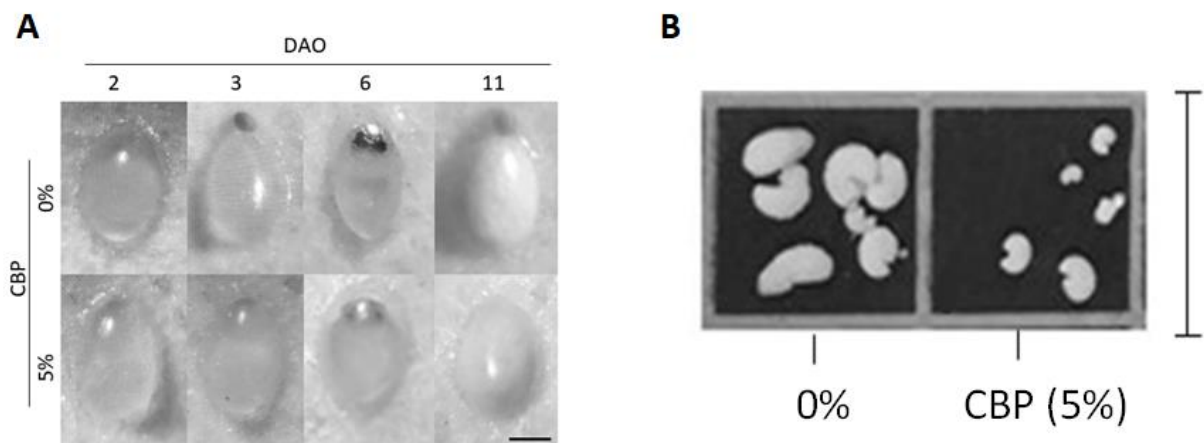
**Figura 12. Atividade enzimática em larvas de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes naturais de feijão-caupi cv. Fradinho. Atividade enzimática de **A**:  $\alpha$ -amilases, **B**: proteases cisteínicas e **C**: lipases.**



**Figura 13.** Quantificação de macromoléculas em larvas de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes naturais de feijão-caupi cv. Fradinho. Quantificação de **A:** Glicose, **B:** Proteína e **C:** Triglicérides.

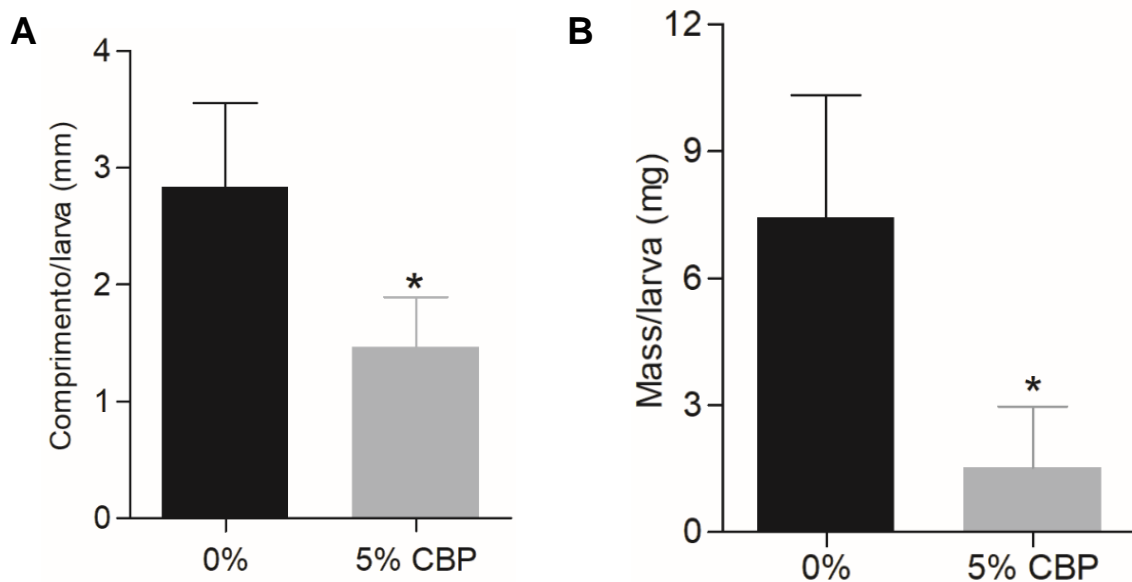
### 4.3 – Toxicidade das frações CBP de sementes de *V. unguiculata* para *C. maculatus*

Larvas desenvolvidas em sementes artificiais contendo 5 % da fração CBP de sementes do cv. BRS Xiquexique tiveram seu desenvolvimento alterado (Figuras 13 e 14). O desenvolvimento embrionário aparente e a eclosão larval não foram afetados (Figura 13-A). No 6º DAO as larvas já estavam formadas dentro dos ovos postos sobre ambas as sementes. No 11º DAO as larvas já haviam eclodido, estando os ovos com aspecto opaco, o que indica a presença de farinha e fezes larvais dentro do ovo (Figura 13-A). Quando avaliado o tamanho das larvas 20 DAO, desenvolvidas na presença de 5 % de CBP do cv. BRS Xiquexique foi observada uma redução quando comparado com larvas controle de (Figura 13-B).



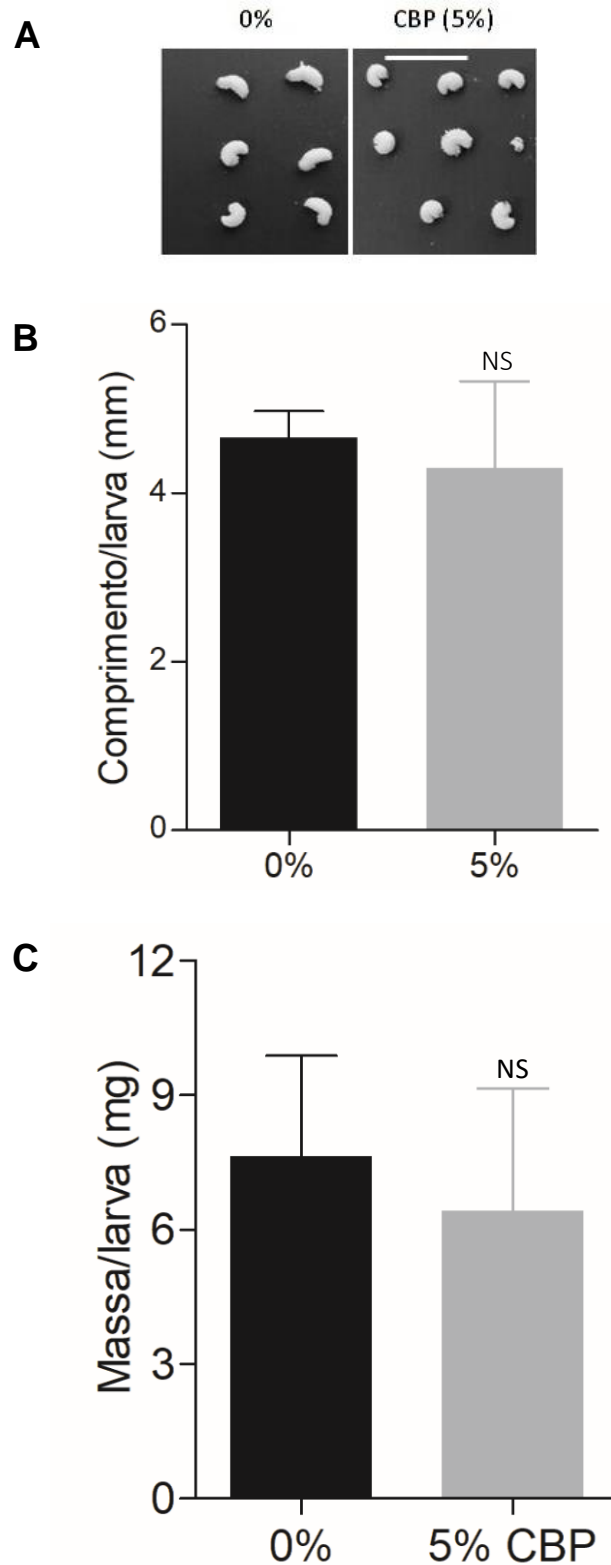
**Figura 14. Avaliação da interferência de CBP de sementes de BRS Xiquexique na penetração e morfologia larval de *C. maculatus*.** **A:** Desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* em sementes contendo 0% (controle) ou 5% de CBP. Barra = 0.1 mm. **B:** Morfologia larval de *C. maculatus* em sementes contendo 0% (controle) ou 5% de CBP em 20 DAO. Barra = 1 cm.

A massa e o comprimento das larvas de *C. maculatus*, desenvolvidas na presença de 5 % de CBP do cv. BRS Xiquexique foram bastante reduzidas (Figura 14). Larvas de 20 DAO mostraram reduções de 51,23 % no comprimento (Figura 14-A) e de 79,6 % na massa larval (Figura 13-B), quando comparados as larvas controle.



**Figura 15. Avaliação da interferência da fração CBP de sementes de BRS Xiquexique no desenvolvimento larval de *C. maculatus*.** Massa (A) e comprimento (B) das larvas de *C. maculatus* com 0% ou 5% de CBP de BRS Xiquexique em 20 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.

Apesar do cv. Fradinho também possuir proteínas com afinidade à quitina, estas proteínas não apresentaram toxicidade para *C. maculatus* (Figura 15). A morfologia (Figura 15-A), comprimento (Figura 15-B) e massa (Figura 15-C) das larvas desenvolvidas em sementes contendo 5 % de CBP do cv. Fradinho não foram alterados, sendo similares aos das larvas controle.



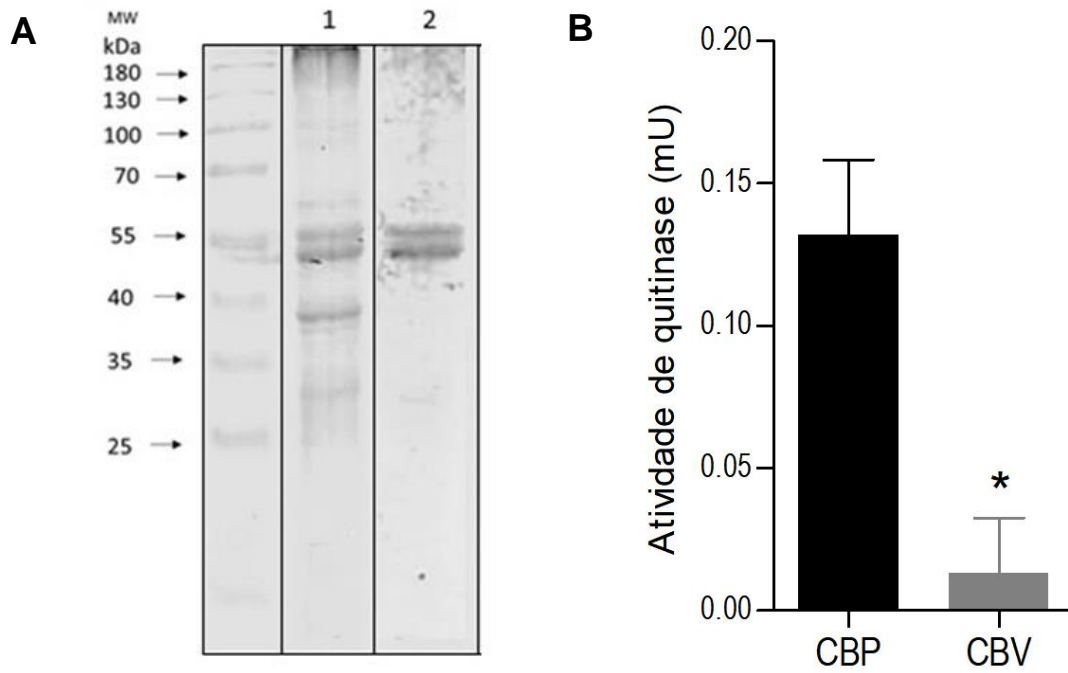
**Figura 16. Avaliação da interferência de CBP de sementes de cv. Fradinho no desenvolvimento larval de *C. maculatus*.** Morfologia (A), comprimento (B) e massa (C) larvais de *C. maculatus* com 0% (controle) ou 5% de CBP de Fradinho em 20 DAO. Barra mede 5 mm. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. NS – Não significativo em relação ao controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.



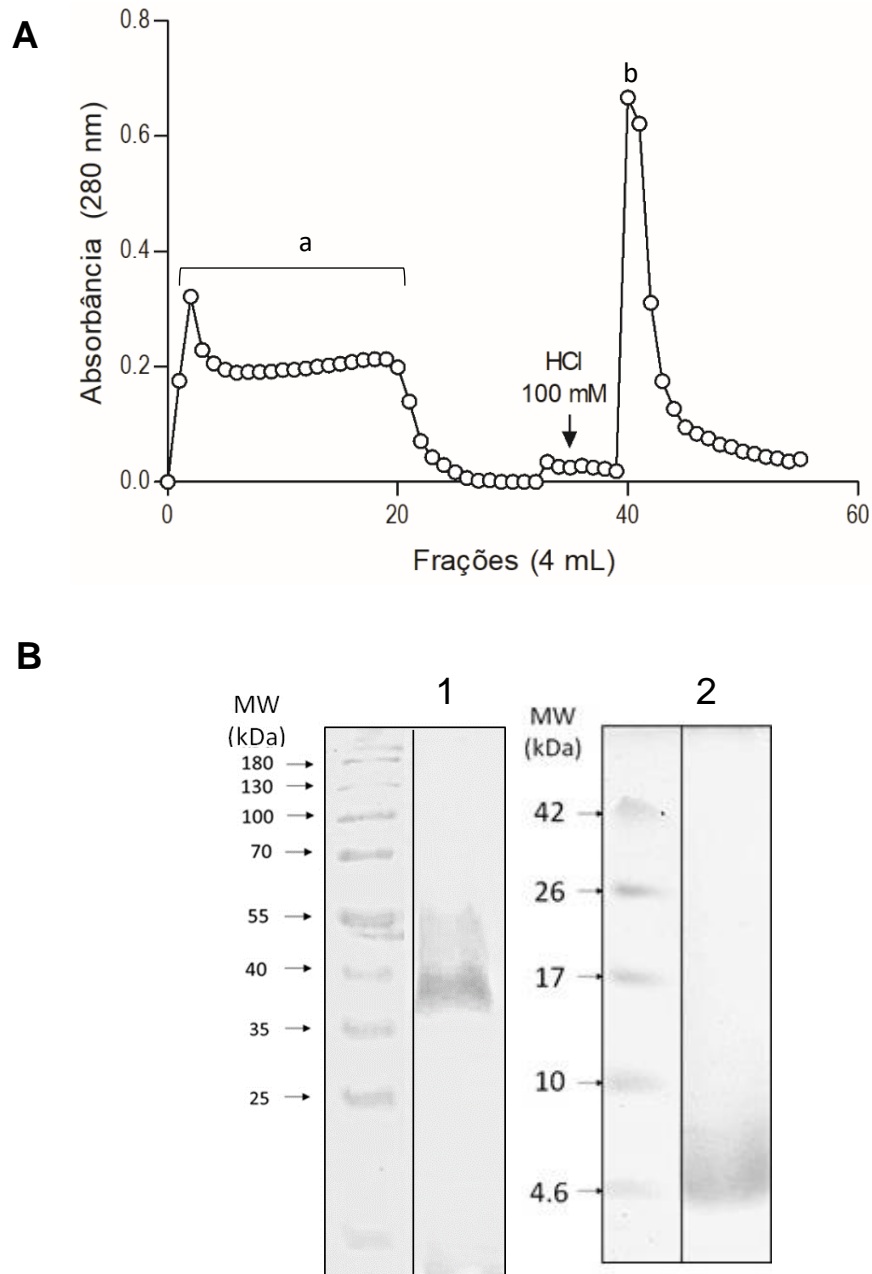
#### **4.4 – Isolamento de vicilinas e peptídeos de vicilina com afinidade à quitina de sementes de *V. unguiculata* cv. BRS Xiquexique**

No intuito de separar as vicilinas das quitinases presentes na fração CBP do cv. BRS Xiquexique, a fração foi diluída em água para separação das proteínas insolúveis em água. A fração obtida foi denominada CBV. As frações CBP e CBV foram visualizadas através de SDS-PAGE (12 %) para comparação dos perfis proteicos (Figura 16-A). O perfil proteico mostrou a presença majoritária de duas bandas na fração CBV, com massas moleculares entre 55 e 40 kDa (Figura 16-A2). A fração CBV não mostrou atividade quitinásica considerável quando comparada com a atividade observada na fração CBP (Figura 16-B), indicando uma efetiva separação entre vicilinas e quitinases.

Para investigar os prováveis domínios de ligação à quitina presentes nas vicilinas, a fração CBV foi hidrolisada *in vitro* e os peptídeos resultantes foram submetidos à cromatografia de afinidade à quitina (Figura 17). O perfil cromatográfico mostra que parte dos peptídeos gerados ainda possuíam afinidade à quitina (Figura 17-A). O produto da hidrólise, após ser eluído da matriz de quitina, foi separado em duas frações: maiores que 10 kDa [visualizado em gel SDS-PAGE (Figura 17-B1)] e menores que 10 kDa [visualizado em gel SDS-PAGE de tricina (Figura 17-B2)] com uma banda de aproximadamente 5 kDa.



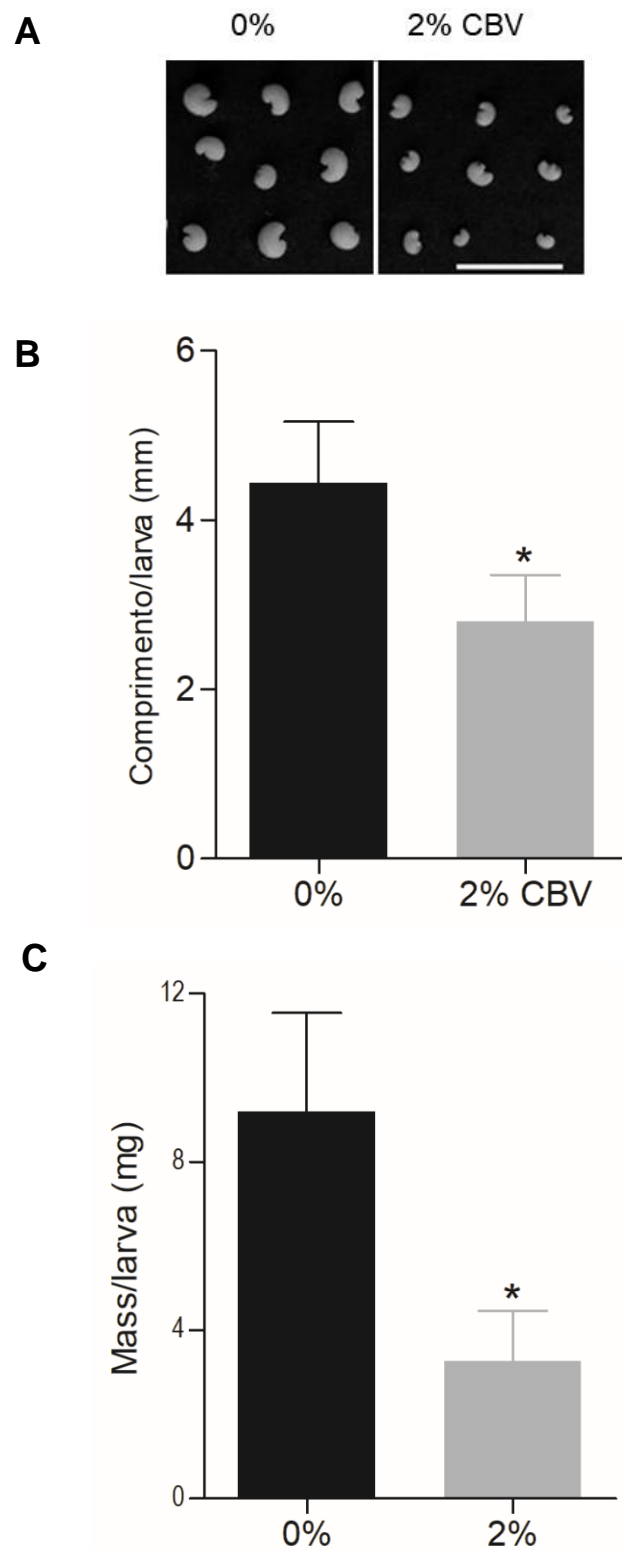
**Figura 17. Isolamento de CBV do cv. BRS Xiquexique. A:** SDS-Page (12%). MW – Marcador de massa molecular. 1 – Fração CBP. 2. Fração CBV. **B:** Ensaio de atividade de quitinase. Valores seguidos por \* apresentam diferenças estatísticas de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.



**Figura 18. Isolamento e caracterização dos peptídeos de CBV de sementes do cv. BRS Xiquexique. A:** Cromatografia de afinidade à quitina. Peptídeos não retidos (a) foram coletados com acetato de sódio 100 mM e os peptídeos retidos em quitina (b) foram eluídos com HCl 100 mM. **B1:** SDS-PAGE da vicilina hidrolisada. **B2:** SDS-PAGE de tricina dos peptídeos de CBV. MW – Marcador de massa molecular.

#### **4.5 – Avaliação da toxicidade de vicilinas com afinidade à quitina de sementes de *Vigna unguiculata* BRS Xiquexique para *C. maculatus***

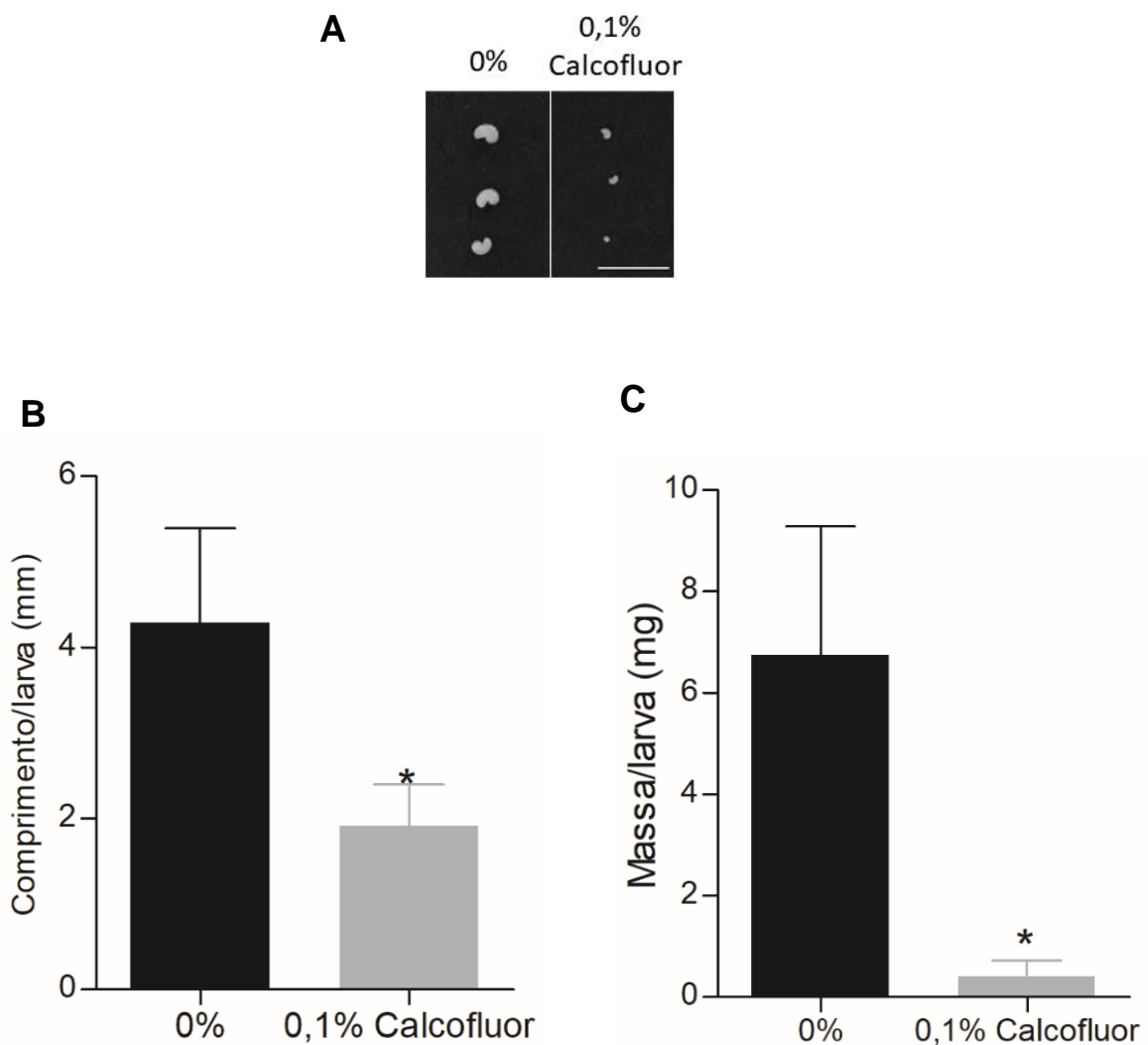
A fração CBV foi incorporada na dieta artificial (2 %) de *C. maculatus* para verificação de sua toxicidade. Foi observado que as larvas alimentadas com a fração CBV sofreram alterações em seu desenvolvimento (Figura 18). Não houve alteração na morfologia das larvas alimentadas com 2 % da fração CBV (Figura 17-A), no entanto, o comprimento (Figura 18-B) e a massa (Figura 18-C) das larvas foram significativamente reduzidos em 33.23 % e 64.3 % respectivamente, quando comparados com as larvas controle.



**Figura 19. Interferência de CBV de sementes de BRS Xiquexique no desenvolvimento larval de *C. maculatus*.** Morfologia (A), massa (B) e comprimento (C) larvais de *C. maculatus* com 0% ou 2% de CBV de BRS Xiquexique em 20 DAO. Barra = 5 mm. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.

#### 4.6 - Toxicidade de calcofluor para *C. maculatus*

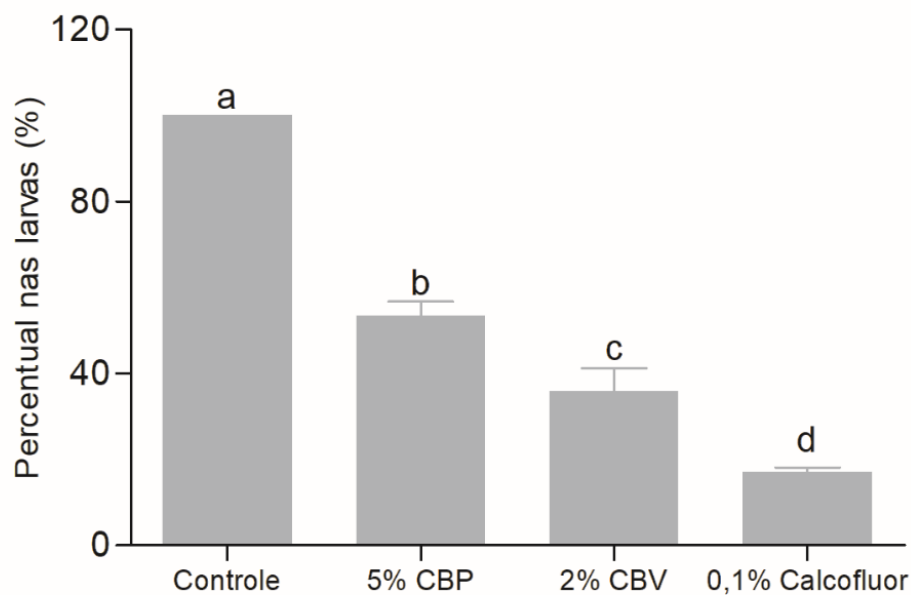
Para fins de comparação da toxicidade de ligantes de quitina para o inseto, incorporou-se calcofluor na alimentação de *C. maculatus*, considerando que este composto possui propriedade comprovada de afinidade à quitina (Wang e Granados, 2000). A concentração de 0,1 % de calcofluor já foi capaz de diminuir drasticamente o tamanho das larvas de *C. maculatus* (Figura 19). O comprimento e massa das larvas alimentadas com 0,1 % de calcofluor diminuíram 55,3 % (Figura 19-B) e 93,9 % (Figura 19-C), respectivamente.



**Figura 20. Interferência de calcofluor no desenvolvimento larval de *C. maculatus*.** **A:** Morfologia, **B:** comprimento e **C:** massa larvais de *C. maculatus* com 0 ou 0,1 % de calcofluor em 20 DAO. Barra=1 cm. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.

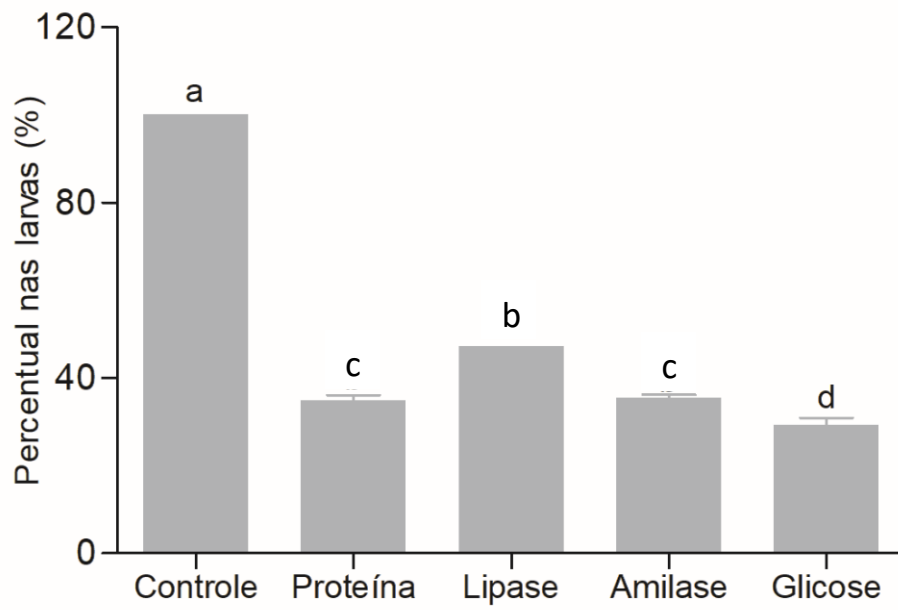
#### 4.7 – Dosagem bioquímica em larvas de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes artificiais

As larvas de *C. maculatus* de 20 DAO desenvolvidas em sementes artificiais contendo 5 % da fração CBP cv BRS Xiquexique, 2 % da fração CBV e 0,1 % de calcofluor foram submetidas à dosagem de proteases cisteínicas. Foi observado que todas essas larvas mostraram reduções de 46,5 %, 64 % e 86,2 %, respectivamente na atividade de proteases cisteínicas quando comparadas com as larvas controle (Figura 20).



**Figura 21. Interferência das frações CBP (5 %) e CBV (2 %) do cv BRS Xiquexique e 0,1 % de calcofluor nas proteases cisteínicas de larvas de *C. maculatus*.** Os valores representam a média de triplicatas experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.

As dosagens bioquímicas realizadas nas larvas de *C. maculatus* de 20 DAO que se alimentaram com 2 % da fração CBV revelaram que as quantidades de proteína e glicose e as atividades das enzimas lipase e amilase foram reduzidas para percentuais inferiores a 50 % dos valores observados nas larvas controle (Figura 21).



**Figura 22. Interferência da fração CBV (2 %) do cv BRS Xiquexique no perfil metabólico de larvas de *C. maculatus*.** Os valores representam a média de triplicatas experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras de erros indicam o desvio padrão.



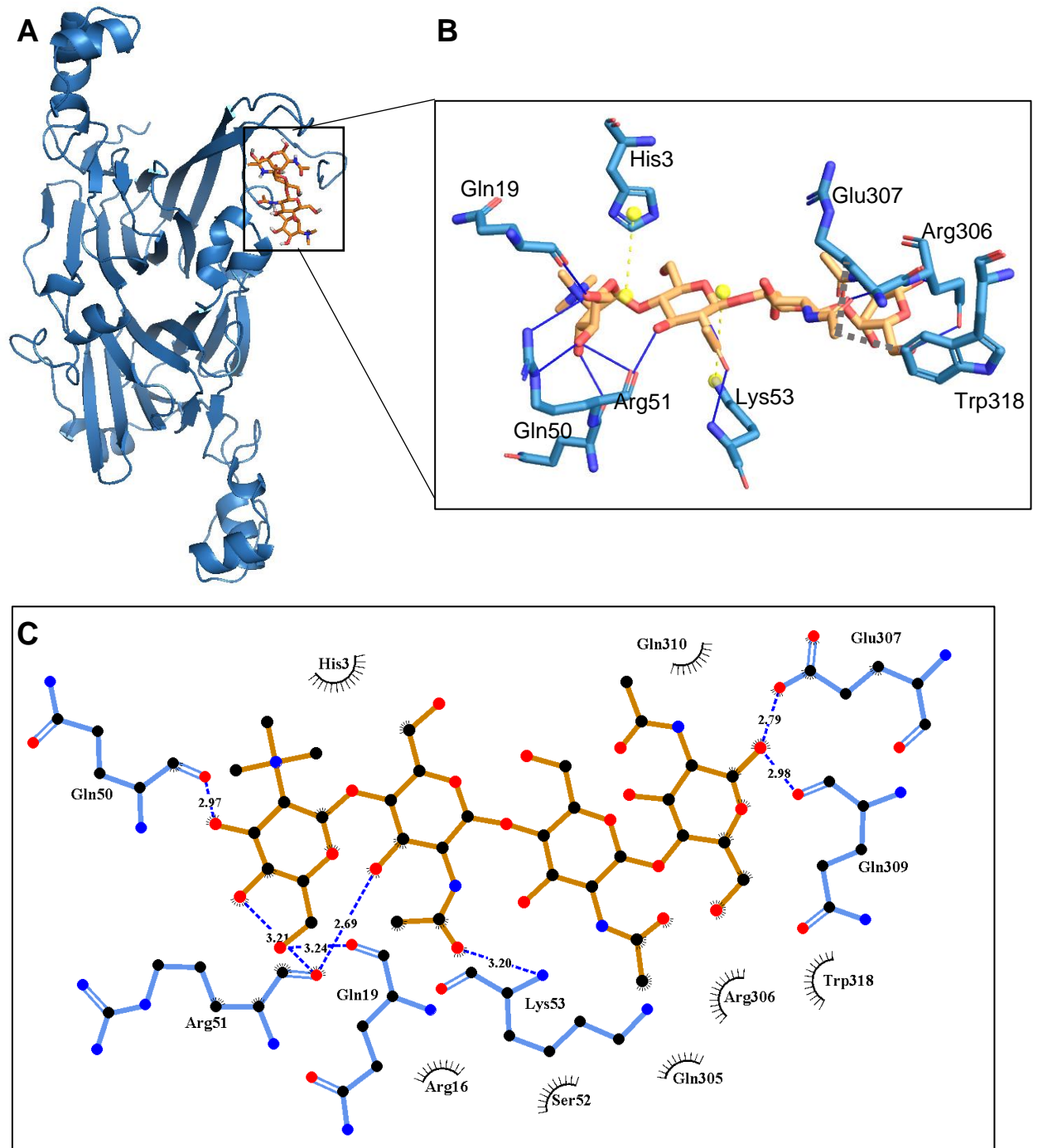
#### 4.8 – Modelagem molecular do monômero de vicilina e docking com tetraglicídeo de *N*-acetilglicosamina

As sequências de peptídeos obtidas através das análises de espectrometria de massas, foram submetidas ao BLASTp para serem alinhadas apenas com proteínas armazenadas no PDB, isto é, proteínas que possuem informação sobre sua estrutura tridimensional. Após a busca no banco de dados do PDB, a proteína que mostrou maior similaridade e cobertura com a sequência de peptídeos obtida da amostra foi uma vicilina de *V. angularis* (cadeia A) [PDB: 2EA7]. A Figura 22 mostra o alinhamento da sequência dos peptídeos obtidos da banda b1 com a proteína 2EA7.A. A partir da sequência da proteína 2EA7.A foi deduzida o restante da sequência da banda b1. O modelo da proteína 2EA7.A foi utilizado como *template* para a modelagem molecular da banda b1. A estrutura tridimensional obtida está representada na Figura 23-A.

Utilizando a estrutura obtida a partir da banda b1, foi realizado o *docking* molecular do monômero da vicilina com o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>. O encaixe que mostrou menor energia de ligação (-7,75 kcal/mol), indicando uma ligação espontânea, foi selecionado para que fossem analisados os resíduos de interação com (NAG)<sub>4</sub>. Os resíduos His3, Arg16, Ser52, Gln305, Arg306, Gln310 e Trp318 formam interações hidrofóbicas com (NAG)<sub>4</sub>. Os resíduos Arg51, Glu307, Gln19, Lys53 formam ligações de hidrogênio com o açúcar, enquanto His3 e Lys 53 interagem com (NAG)<sub>4</sub> por pontes salinas (Figura 23-B; Tabela 2).

2EE7.A	IVHREHHESR	EEVSVSSGKN	NPFYFNDRW	FRTLVRNEWG	HIRVLQRFQD	50
b1	REHQESQ	EESDSR GQN	NPFYFSDRW	FHTLFRNQYG	HIR	
2EA7.A	RSKMQNLEN	YRVVEFKSKP	NTLLPHHAD	ADFLLVVLNG	TAVLTLVNP	100
b1	SKQIQNLEN	YR SKP	NTLLPHHAD	ADFLLVVLNG	RAVLTIVNP	
2EA7.A	SRDSYILEQG	HAQKI PAGTT	FFLVNPDDNE	NLRI IKLAIP	VNNPHRFQDF	150
b1	GRDSYILEQG	HAQKI PAGTT	FFLVNPDDND	NLRI IKLAIP	VNNPHRFQDF	
2EA7.A	FLSSTEAQQS	YLRGFSKNIL	EASFDSDSFE	INRVLFGEER	QQQQGEESRE	200
b1	FLSSTEAQQS	YLRGFSKNIL	EASFDSDSFE	INRVLFGEER	QQQQGEESRE	
2EA7.A	EGVIVELKRE	QIQELMKHAK	SSSRKELSSQ	DEPFNLRSK	PIYSNKFGRW	250
b1	EGVIVQLK		SLSSQ	DEPFNLR K	PIYSNKFGRL	
2EA7.A	YEMTPEKNPQ	LKDLDFVFISS	VDMKEGALLL	PHYSSKAIVI	MVINEGEAKI	300
b1	HEITPEKNPQ	LKDLDFVFISS	VDMK LLH	PHYR AIVI	LVVNKGEANL	
2EA7.A	ELVGLSDQQQ	QKQQEESLEV	QRYRAELSED	DVFVI PAAYP	VAINATSNLN	350
b1	ELVGLSDQQQ	QKQQEESLEV	QR		SNLN	
2EA7.A	FFAFGINAEN	NRRNFLAGGK	DNVMSEIPTE	VLEVSFPASG	KKVEK+LIKK	400
b1	FLAFGINAEN	NQRNFLAGEK	SEIPTE	VLDVTFPASG	EKVEKGLINK	
b1		NFLAGEK	DNVMSDIPR			
2EA7.A	QSESHFVDAQ	PEQQQREEGHK	GRKGSLSIL	GSLY		450
b1	QSESHFVDAQ	PEQQQR				

**Figura 23.** Alinhamento da sequência de peptídeos de b1 com vicilina de *V. anguilaris*. Código de acesso PDB: 2EA7. Destaques em cinzas representam as regiões de similaridades.



**Figura 24. Potencial sítio de ligação à quitina na estrutura do monômero de vicilina (b1, cv. BRS Xiquexique).** **A:** Estrutura tridimensional do monômero de vicilina do cv. BRS Xiquexique obtida através do AutoModel utilizando a proteína 2EA7.A como template. Imagem criada a partir do PyMol. **B:** Interações entre resíduos de vicilina e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas amarelas=pontes salinas. Linhas tracejadas pretas=interações hidrofóbicas. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **C:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos de vicilina com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio.

Esferas vermelhas=átomos de oxigênio. [Esqueletos de carbono em azul representam os resíduos de vicilina e esqueletos de carbono em laranja representam (NAG)<sub>4</sub> nas Figuras **B** e **C**].

**Tabela 2. Interações entre o monômero de vicilina e (NAG)<sub>4</sub>.** \* Distância entre átomos de carbono nas interações hidrofóbicas. Distância entre H e átomos aceptores nas ligações de hidrogênio. Distância entre os centros de carga nas pontes salinas. Dados obtidos através do programa PLIP Web Tool e LigPlot+ v. 2. 2. 4.

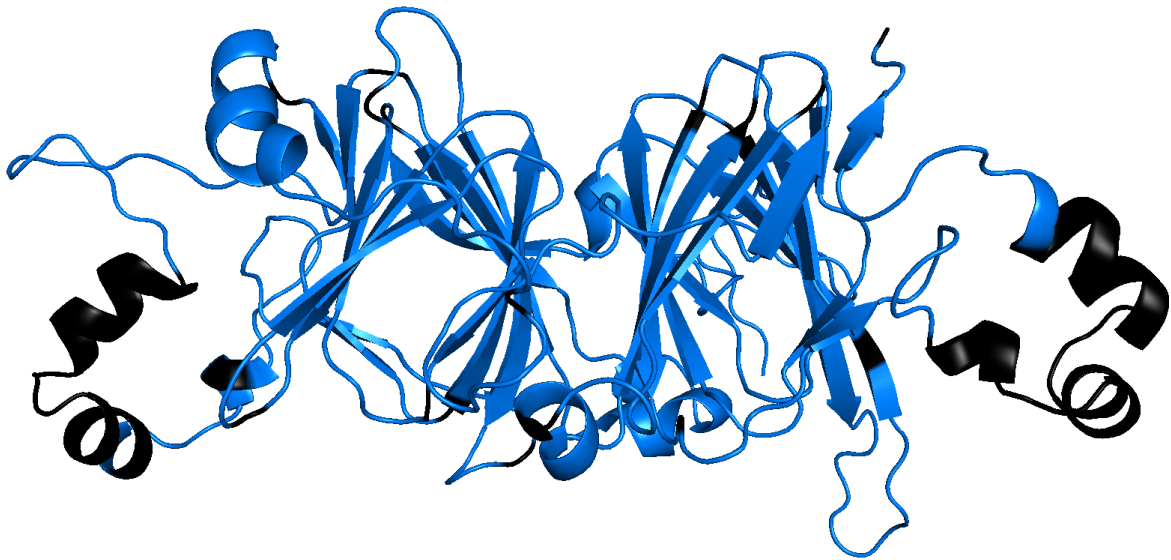
<b>Resíduo</b>	<b>Distância (Å)*</b>	<b>Tipo de interação</b>	<b>Participa de interação hidrofóbica</b>
His3	4,29	Ponte salina	x
Arg16	-	Interação hidrofóbica	x
Gln19	2,54	Ligação de hidrogênio	x
Gln50	2,44		
Arg51	3,29		
Arg51	2,97		
Arg51	2,83		
Arg51	2,20		
Ser52	-	Interação hidrofóbica	x
Lys53	2,27	Ligação de hidrogênio	
Lys53	5,42	Ponte salina	
Gln305	-	Interação hidrofóbica	x
Arg306	3,80		x
Glu307	2,57	Ligação de hidrogênio	x
Glu307	1,88		
Glu307	1,87		
Gln309	2,98		x
Gln310	-	Interação hidrofóbica	x
Trp318	3,89		x

#### 4.9 – Hidrólise, *in silico*, da vicilina e localização dos possíveis sítios de ligação à quitina e sítios de glicosilação nos peptídeos

Inicialmente fizemos buscas para identificar as proteases majoritárias em *C. maculatus*. As buscas realizadas em dados de proteoma e transcriptomas (Tabela 3) mostraram que proteases cisteínicas do tipo catepsina L foram encontradas na maioria das buscas, como sendo a protease majoritária em larvas. Sendo assim, essa protease foi escolhida para simular a hidrólise, *in silico*, do monômero da vicilina. Estas enzimas clivam ligações peptídicas que envolvem resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Rawlings e Salvesen, 2013). A partir da estrutura tridimensional da vicilina, obtida através da modelagem molecular, as regiões com resíduos aromáticos e hidrofóbicos mais acessíveis (expostos) na estrutura tridimensional do monômero, foram selecionadas (Figura 24-preto) como os pontos de hidrólise. Os resultados mostraram que 19 peptídeos foram obtidos, com tamanhos que variaram de 39 a 9 resíduos de aminoácidos (Tabela 4).

**Tabela 3. Busca das proteases digestivas majoritárias em larvas de *C. maculatus***

Transcriptoma			Proteoma
Sayady <i>et al.</i> , (2016)	Moon <i>et al.</i> , (2004)	Pedra <i>et al.</i> , (2003)	Nogueira <i>et al.</i> , (2012)
Catepsina B	<b>Catepsina L</b>	<b>Catepsina L</b>	<b>Catepsina L</b>
	Catepsina B	Protease Aspártica	Carboxipeptidase Serínica
	Carboxipeptidase	Endopeptidase Cisteínica	Catepsina B
			Catepsina D
			Aminopectidase N
			Peptidase Aspártica
			Carboxipeptidase
			Peptidase Serínica



**Figura 25. Resíduos aromáticos e hidrofóbicos expostos na estrutura tridimensional do monômero da vicilina.** Estrutura obtida a partir do programa AutoModel utilizando a proteína 2EA7.A como template. Imagem criada a partir do PyMol. Azul=monômero de vicilina. Preto=resíduos hidrofóbicos e aromáticos mais expostos.

Os sítios de ligação à quitina previamente publicados na literatura EITPEK (Rocha *et al.*, 2018) e REQUIRELMK (Miranda *et al.*, 2020), foram buscados manualmente nas sequências dos 19 peptídeos gerados após a hidrólise *in silico* da banda b1. Os resultados mostraram (Tabela 4) um peptídeo de 12 aminoácidos (GRLHEITPEKNP) que possui o sítio de ligação à quitina previamente identificado por Rocha *et al.* (2018). Uma região bastante similar ao sítio de ligação previamente identificado por Miranda *et al.* (2020) foi identificado em um peptídeo de 19 aminoácidos (KREQIQELMKHAKSSSRKS). A única diferença dessa região encontrada no peptídeo de vicilina, comparando com o sítio identificado por Miranda *et al.* (2020) é a presença de um resíduo de glutamina (Q) ao invés de uma arginina (R) na posição 5 do sítio.

Os resultados obtidos através da predição do programa ELM revelaram possíveis sítios de glicosilação nos peptídeos. No maior peptídeo, de 39 aminoácidos, foi localizada a região RSGQ (Tabela 4), denominada pelo ELM como MOD\_GLCNHglycan, e classificada como um sítio de ligação a glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos são polímeros lineares longos, não flexíveis, que têm como base estrutural unidades dissacarídicas repetidas (Pepi *et al.*, 2021). Um dos monossacarídeos que compõem os dissacarídeos é sempre a *N*-acetilglicosamina ou

a *N*-acetilgalactosamina, sendo o outro monossacarídeo, na maioria dos casos, um ácido urônico (Pepi *et al.*, 2021).

A região INATSN foi localizada em um peptídeo de 29 aminoácidos (Tabela 4). Esse sítio denominado pelo ELM como MOD\_N-GLIC\_1 é considerado um sítio de glicosilação. Nas glicosilações do tipo N-ligadas, um resíduo de *N*-acetilglicosamina é ligado a um resíduo de asparagina através de uma ligação amida. O resíduo de asparagina deve ser pertencente a uma sequência Asn-X-Thr ou Asn-X-Ser, onde X pode ser qualquer aminoácido, com exceção da prolina (An *et al.*, 2009).

**Tabela 4. Peptídeos obtidos através da clivagem *in silico* pela catepsina L.** Regiões destacadas representam prováveis sítios de ligação a quitina, de acordo com Rocha *et al.*, (2018) e Miranda *et al.*, (2020). Regiões destacadas representam sítios de glicosilação detectados pelo programa ELM.

Peptídeo	Nº de resíduos
IVHREHQESQEE SDS <u>RS</u> GQNNPFYFSDRWFHTLFRNQY	39
GHIRVLQRFDQRSKQIQNLENYRVVEFKSKP	31
NTLLPHHADA	11
DFLLVVLNGRAVLTLVNP	18
DGRDSYILEQGHAKIP	17
AGTTFFLVNP	10
NDNDNLRIIKLAIPVNNP	18
HRFQDFFLSSTEAAQSSYL	18
GEEQKQQDEESQQEGVIVQL	20
<u>KRE</u> QIQELMKHAKSSSRKS	19
LSSDEPFNLRNSKPIYSNKF	20
GRLHEITPEKNP	12
QLKDLDVFISSVDM	14
KEGALLHPHYRSKAIVILVVNKGEA	25
NLELVGQREQQQQQEESEV	21
QRYRAELSEDDVFPAAYPVA <u>INATSN</u> L	29
NFLAFGINA	9
ENNQRNFLAGEKDNV	15
INKQSESHFVDAQPE	15

#### 4.10 - Docking dos peptídeos de vicilina obtidos da hidrólise *in silico* com tetraglicídeo de *N*-acetilglicosamina

Os peptídeos obtidos da hidrólise, *in silico*, do monômero de vicilina onde foram localizados possíveis sítios de ligação à quitina e sítios de glicosilação (Tabela 4) foram selecionados para ensaios de docking com NAG<sub>4</sub>. Foram selecionados o peptídeo de 39 aminoácidos onde se localiza a região **RSQG** agora denominado PEP1; peptídeo de 19 aminoácidos (**KREIQELMKHAKSSSRKS**) denominado PEP2; O peptídeo de 12 aminoácidos (**GRLHEITPEKNP**) denominado PEP3; e PEP4 o peptídeo de 29 aminoácidos onde temos um possível sítio de glicosilação **INATSN** (Tabela 4).

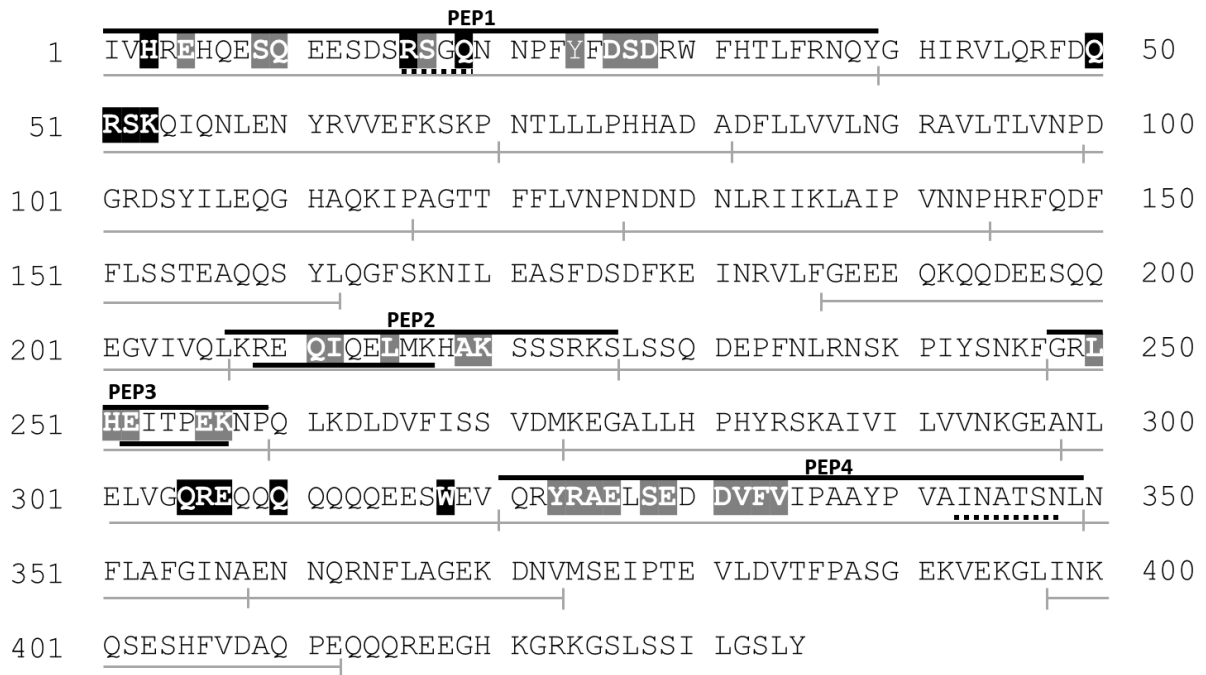
Os encaixes que mostraram as menores energias de ligação, para cada uma das interações entre os peptídeos e (NAG)<sub>4</sub>, foram selecionados para as análises dos resíduos de interação. Na Figura 25 é mostrada a sequência primária da proteína modelo, destacando os pontos da clivagem *in silico* (traços verticais), os sítios de ligação à quitina previamente identificados por Rocha *et al.*, (2018) e Miranda *et al.*, (2020), outros possíveis sítios de glicosilação, identificados pelo programa ELM; os resíduos de interação do monômero com (NAG)<sub>4</sub> (Figura 23-B) e os resíduos de interação dos peptídeos com (NAG)<sub>4</sub>.

O docking do PEP1 com (NAG)<sub>4</sub> mostrou energia de ligação negativa (-6,593 kcal/mol), indicando a espontaneidade da ligação. Os resultados mostraram que o peptídeo interage com NAG<sub>4</sub>, através de ligações de hidrogênio com os resíduos Glu5, Ser9, Ser17, Tyr24, Asp26, Ser27 e Asp28 e através de interações hidrofóbicas com os resíduos Gln10, Ser17, Ser27 e Asp28 (Figura 26, Tabela 5). Dentre essas interações, apenas a interação entre (NAG)<sub>4</sub> com o resíduo Ser17 envolve a região **RSQG**, previamente descrita pelo ELM como um sítio de ligação a glicosaminoglicanos.

O docking do PEP2 com (NAG)<sub>4</sub> mostrou energia de ligação negativa (-7,962 kcal/mol). O zdocking revelou interações do (NAG)<sub>4</sub>, através de ligações de hidrogênio, com os resíduos Gln4, Leu8, Ala12 e Lys13 (Figura 27, Tabela 5) e através de interações hidrofóbicas com os resíduos Ile5, Leu8 e Ala12. Dentre essas, as interações entre (NAG)<sub>4</sub> e os resíduos Gln4, Ile5 e Leu8 envolvem a região



**REIQELMK**, previamente descrita por Miranda *et al.*, (2020) como um sítio de ligação à quitina.

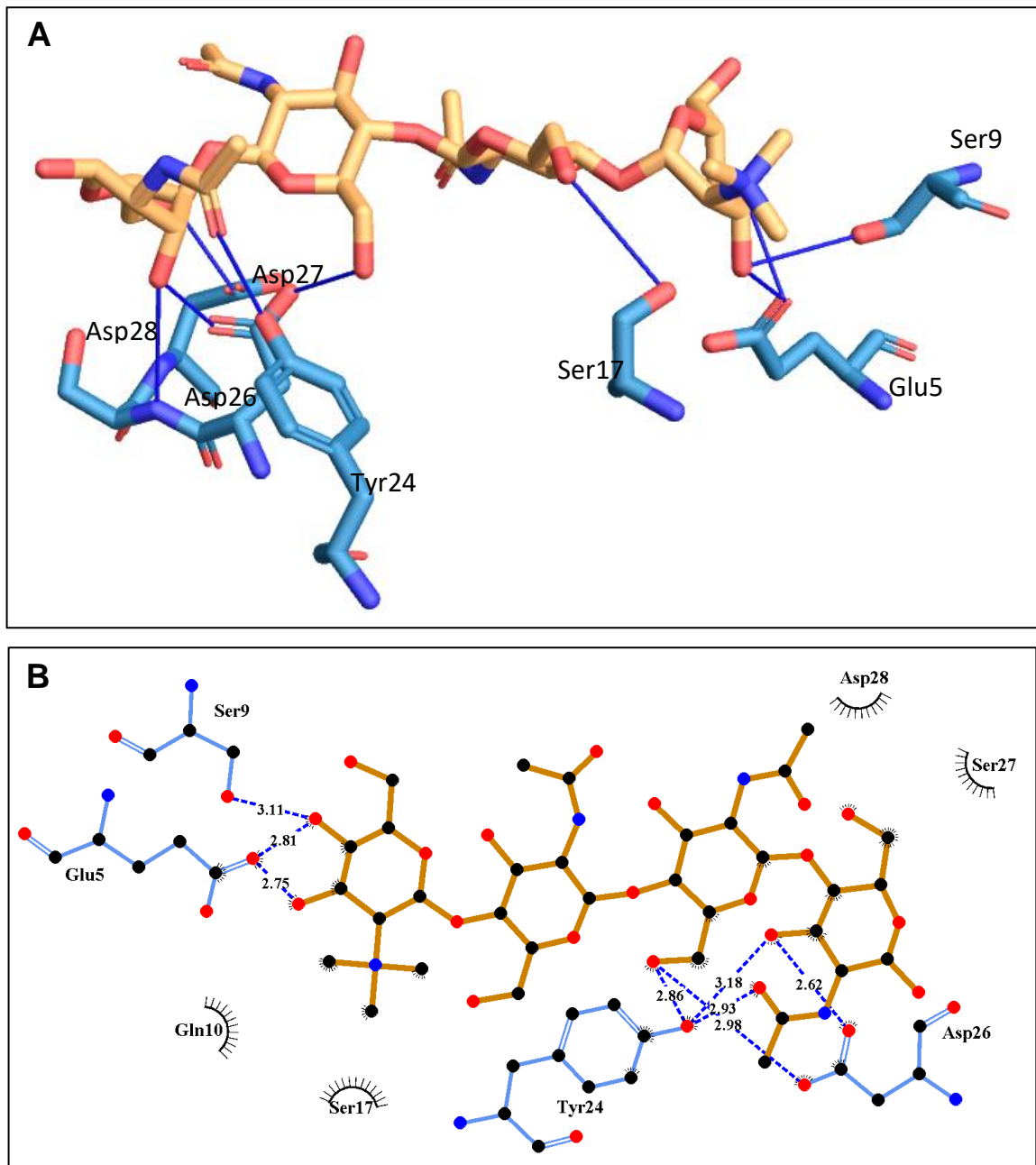


**Figura 26. Estrutura primária da vicilina do cv. BRS Xiquexique.** Traços verticais: pontos escolhidos para a clivagem *in silico*. Sublinhado contínuo: sítios de ligação à quitina identificados por Rocha *et al.*, (2018) e Miranda *et al.*, (2020). Sublinhado pontilhado: Sítios de glicosilação identificados pelo programa ELM. Resíduos destacados em preto: Resíduos de interação do monômero com (NAG)<sub>4</sub>. Resíduos destacados em cinza: Resíduos de interação dos peptídeos (PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4) com (NAG)<sub>4</sub>.

O docking do PEP3 com NAG<sub>4</sub> mostrou energia de ligação igual a -7,341 kcal/mol e interações do (NAG)<sub>4</sub>, através de ligações de hidrogênio, com os resíduos Leu3, Glu5 e Lys10, através de interações hidrofóbicas com os resíduos Leu3, His4, Glu9 e Lys10, além de uma ponte salina com Glu9 (Figura 28, Tabela 5). Dentre essas, as interações entre (NAG)<sub>4</sub> e os resíduos Glu5, Glu9 e Lys10 envolvem a região **EITPEK**, previamente descrita por Rocha *et al.*, (2018) como um sítio de ligação à quitina.

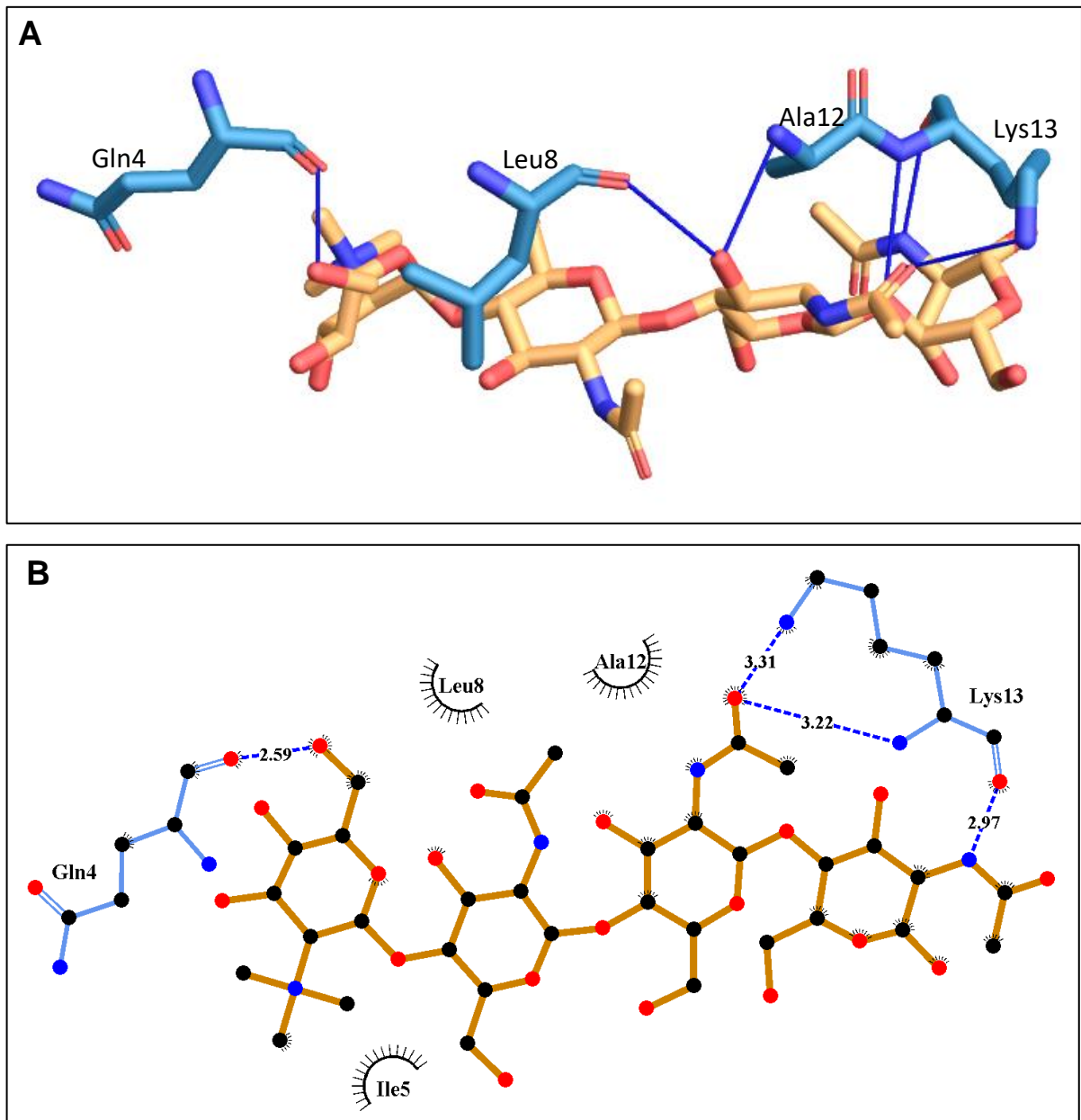
O docking do PEP4 com (NAG)<sub>4</sub> mostrou energia de ligação igual a -7,814 kcal/mol e interações do (NAG)<sub>4</sub>, através de interações hidrofóbicas com os resíduos Tyr3, Arg4, Ala5, Glu9, Val12, Phe13 e Val14. Ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Glu6, Ser8, Asp11, Val12 e Val14 também foram observadas, além de uma ponte salina com o aminoácido Asp11 (Figura 29, Tabela 5). Nenhuma das interações

mostradas envolve a região **INATSN**, previamente descrita pelo ELM como um sítio de glicosilação.

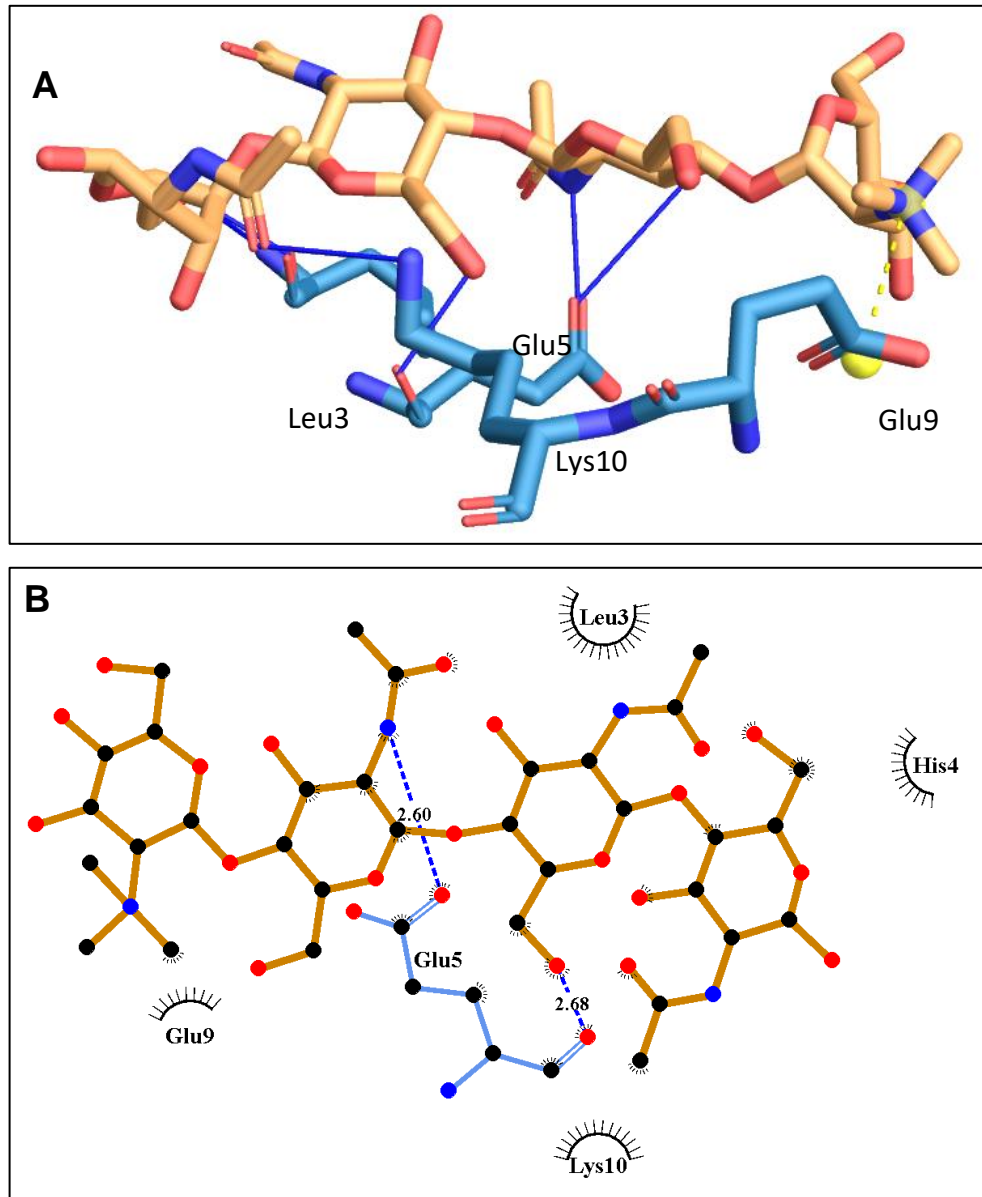


**Figura 27. Docking molecular entre o peptídeo PEP1, obtido *in silico*, com (NAG)<sub>4</sub>.** **A:** Interações entre resíduos do PEP1 e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **B:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos do PEP1 com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio. Esferas

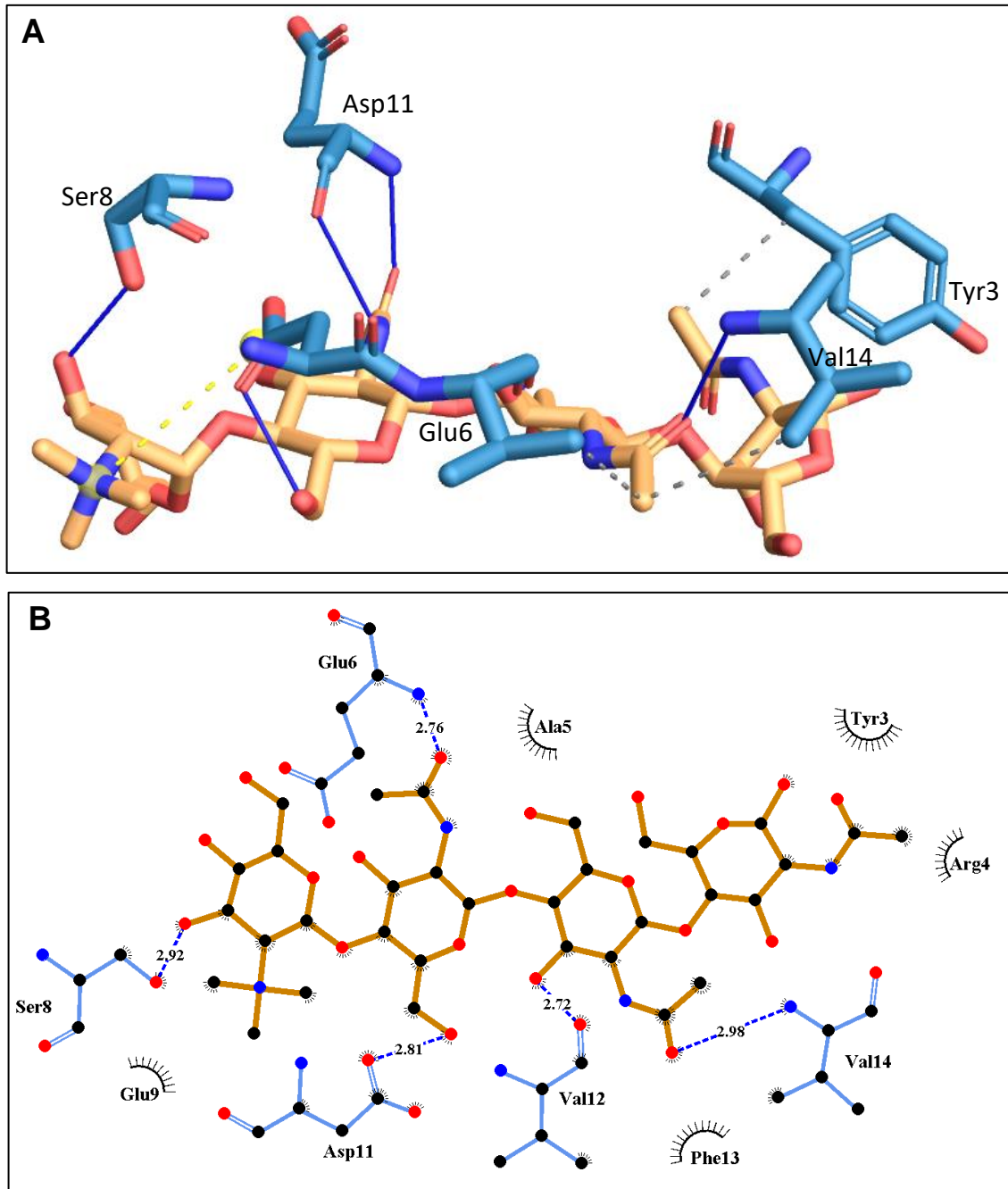
vermelhas=átomos de oxigênio. [Esqueletos de carbono em azul representam os resíduos de PEP1 e esqueletos de carbono em laranja representam (NAG)<sub>4</sub> nas Figuras A e B].



**Figura 28. Docking molecular entre o peptídeo PEP2, obtido *in silico*, com (NAG)<sub>4</sub>.** **A:** Interações entre resíduos do PEP2 e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **B:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos do PEP2 com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio. Esferas vermelhas=átomos de oxigênio. [Esqueletos de carbono em azul representam os resíduos de PEP2 e esqueletos de carbono em laranja representam (NAG)<sub>4</sub> nas Figuras A e B].



**Figura 29. Docking molecular entre o peptídeo PEP3, obtido *in silico*, com (NAG)<sub>4</sub>.** **A:** Interações entre resíduos do PEP3 e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas amarelas=pontes salinas. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **B:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos do PEP3 com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio. Esferas vermelhas=átomos de oxigênio. [Esqueletos de carbono em azul representam os resíduos de PEP3 e esqueletos de carbono em laranja representam (NAG)<sub>4</sub> nas Figuras A e B].



**Figura 30. Docking molecular entre o peptídeo PEP4, obtido *in silico*, com (NAG)<sub>4</sub>. A:** Interações entre resíduos do PEP4 e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas amarelas=pontes salinas. Linhas tracejadas cinzas=interações hidrofóbicas. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **B:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos do PEP4 com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio. Esferas vermelhas=átomos de oxigênio [Esqueletos de carbono em azul representam os resíduos de PEP4 e esqueletos de carbono em laranja representam (NAG)<sub>4</sub> nas Figuras A e B].

**Tabela 5. Interações entre os peptídeos de vicilina e (NAG)<sub>4</sub>.** \*\*\* Distância entre átomos de carbono nas interações hidrofóbicas. Distância entre H e aceptores nas ligações de hidrogênio. Distância entre os centros de carga nas pontes salinas.

Peptídeo	Resíduo	Distância (Å)***	Tipo de interação	Interação hidrofóbica
PEP1	Glu5	1,89	Ligação de hidrogênio	x
	Glu5	1,81		
	Ser9	3,58		
	Gln10	-	Interação hidrofóbica	x
	Ser17	3,20	Ligação de hidrogênio	x
	Tyr24	2,24		x
	Asp26	1,69		x
	Asp26	2,11		x
	Ser27	3,03		x
	Asp28	1,94		x
PEP2	Gln4	1,72	Ligação de hidrogênio	x
	Ile5	-	Interação hidrofóbica	x
	Leu8	3,39	Ligação de hidrogênio	x
	Ala12	3,01		x
	Lys13	2,35		x
	Lys13	1,97		
	Lys13	2,79		
PEP3	Leu3	3,12	Ligação de hidrogênio	x
	Leu3	1,80		
	His4	-	Interação hidrofóbica	x
	Glu5	1,74	Ligação de hidrogênio	x
	Glu5	1,58		
	Glu5	3,78		
	Glu9	4,64	Ponte salina	x
	Lys10	2,78	Ligação de hidrogênio	x
PEP4	Tyr3	1,78	Interação hidrofóbica	x
	Arg4	-		x
	Ala5	-		x
	Glu6	2,70	Ligação de hidrogênio	x
	Glu6	1,86		
	Ser8	1,87		
	Glu9	-		Interação hidrofóbica
	Asp11	1,79	Ligação de hidrogênio	x
	Asp11	4,68	Ponte salina	
	Val12	1,79	Ligação de hidrogênio	x
	Val12	3,89	Interação hidrofóbica	
	Phe13	-		x
	Val14	2,14	Ligação de hidrogênio	x
	Val14	3.83	Interação hidrofóbica	x

## 5 DISCUSSÃO

Sementes têm sido estudadas como fontes de compostos com potencial para o controle do inseto *Callosobruchus maculatus*. Nesse contexto, sementes de espécies não-hospedeiras, como a *Canavalia ensiformis*, *Albizzia lebeck*, *Dioclea máxima*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* entre outras têm se destacado como potencialmente tóxicas para esse inseto, chegando a impedir 100% a penetração das larvas (Souza *et al.*, 2011; De Sá *et al.*, 2014; De Sá *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

No entanto, muitos trabalhos também dão ênfase na investigação acerca da resistência ou suscetibilidade de variedades de sementes com apelo comercial, como o feijão-caupi para a infestação por *C. maculatus* (Costa e Junior, 2004; Castro *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2016; Kpoviessi *et al.*, 2019; Titilope e Kannike, 2018). Estas pesquisas analisam algumas características da interação inseto-planta para a classificação da espécie como resistência ou suscetibilidade. Dentre essas características, destacam-se: preferência de oviposição, eclosão larval, taxa de sobrevivência, duração do ciclo de vida do inseto, longevidade do adulto, massa e comprimento das larvas, quantidade da massa da semente consumido e vigor germinativo da semente após a infestação (De sá *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2016; Messina *et al.*, 2019). A caracterização de cultivares comerciais resistentes é de extrema importância, pois abrem caminhos para um futuro com um sistema agrícola mais sustentável (Timko e Singh, 2008).

Cruz *et al.*, (2016), estudando nove cultivares de *V. unguiculata*, desenvolvidos pela Embrapa, destacaram os cultivares BRS Pajeú, BRS Guariba e BRS Xiquexique como apresentando características de resistência, como baixa oviposição e sobrevivência larval, entretando não foi mostrada a fonte de toxicidade desses cultivares para o inseto. Como já descrito anteriormente, sabe-se que a presença de proteínas com afinidade à quitina em sementes de leguminosas tem sido relacionada com a toxicidade para insetos (Macedo *et al.*, 1993; Yunes *et al.*, 1998; Motta *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2020). Baseados nisso, o objetivo desse trabalho foi o isolamento e caracterização de proteínas com afinidade à quitina de sementes do cultivar BRS-Xiquexique e a avaliação da toxicidade para o inseto *Callosobruchus maculatus* (Fabr.).

Proteínas com afinidade à quitina foram isoladas por cromatografia e análises por experimentos de *Western blotting*, e espectrometria de massas comprovaram a presença de vicilinas e quitinases na fração CBP do cv. BRS Xiquexique. As bandas majoritárias desta fração foram reativas com o anticorpo anti-vicilina, corroborando com dados que mostram que essas proteínas podem representar até 80 % do conteúdo proteico em sementes de certas leguminosas (Freitas *et al.*, 2004). A presença de vicilinas majoritárias, com massas moleculares entre 40 e 70 kDa tem sido mostrada desde a década de 90 (Macedo *et al.*, 1993), ocorrendo também vicilinas com massas entre 12 a 33 kDa, resultantes da fragmentação pós traducionais (Pedrosa *et al.*, 1997).

Bandas minoritárias reagiram com anticorpo anti-quitinase e a presença dessas proteínas também foi confirmada por espectrometria de massas. Embora a análise de espectrometria de massas tenha mostrado a presença de quitinase na banda b4, recortada do gel, essa banda não havia mostrado reatividade considerável com o anticorpo anti-quitinase, isso pode se dever ao fato do anticorpo usado ter sido produzido contra quitinases de *A. pavonina*, podendo não ter afinidade por todas as quitinases presentes em *V. unguiculata*.

A fração CBP, quando adicionada a 5 % na dieta artificial do inseto, causou uma diminuição de 79,6 % na massa e 51,2 % no comprimento das larvas de 20 DAO.

Com o intuito de se investigar se a toxicidade observada na fração CBP se devia a quitinase ou a vicilina ou a um sinergismo entre ambas, isolamos a fração CBV, rica em vicilinas. Essa fração não apresentou atividade quitinásica considerável, indicando uma separação efetiva. A fração CBV, em concentração de 2 %, diminuiu 64,3 % a massa e 33,2 % o comprimento das larvas de 20 DAO, confirmando a toxicidade das vicilinas ao inseto. As vicilinas da fração CBV foram hidrolisadas e alguns peptídeos resultantes preservaram a sua afinidade à quitina, indicando que a afinidade não está relacionada unicamente com a preservação da estrutura terciária do monômero de vicilina. Resultados similares já haviam sido observados para peptídeos resultantes da hidrólise de vicilinas do cv. IT81D1045. Esses peptídeos além de manterem a afinidade à quitina, mantiveram suas propriedades tóxicas (Uchôa *et al.*, 2009).

A relação entre vicilinas e a resistência à infestação de *C. maculatus* em sementes de *V. unguiculata* foi mostrada pela primeira vez para os cultivares IT81D-



1045 e IT81D-1032 (Sales et al., 1992; Macedo et al., 1993). As vicilinas isoladas dessas sementes foram mais refratárias à digestão por proteases do inseto do que as vicilinas de cultivares suscetíveis (Sales et al., 1992). Vicilinas do cv. IT81D 1045, em concentração de 2 %, foram capazes de diminuir a massa larval em 50 % (Macedo et al., 1993). O mecanismo de toxicidade das vicilinas mostrou estar relacionado à sua capacidade de se ligar à quitina presente na matriz peritrófica/gel peritrófico do intestino médio das larvas, somada à sua menor digestibilidade por proteases dos insetos (Sales et al., 1992; Sales et al., 2001). Sales et al., (2005) estudaram a emergência de insetos adultos, o período de desenvolvimento total (PDT) e a excreção de vicilina por *C. maculatus* criados em sementes do cv. IT81D1045 e do cv. EPACE 10 (suscetível a infestação). Os resultados mostraram que os insetos criados em sementes resistentes tiveram menor emergência e aumento no PDT, quando comparados com insetos criados nas sementes suscetíveis. Os insetos emergidos das sementes resistentes, excretaram níveis 7 vezes maiores de vicilinas do que os insetos emergidos de sementes suscetíveis, indicando uma dificuldade em digerir e absorver as vicilinas do cultivar resistente (Sales et al., 2005).

As vicilinas isoladas de sementes suscetíveis, como os cvs. CE-31, EPACE 10 e Pitiuba não foram tóxicas para o inseto, além de terem sido digeridas mais eficientemente pelas proteases digestivas de *C. maculatus* (Sales et al., 2005). Nossos resultados também mostraram que a fração CBP isolada do cultivar Fradinho (suscetível a *C. maculatus*) não apresentou nenhum efeito tóxico sobre as larvas. Embora algumas vicilinas de cultivares suscetíveis também tenham afinidade à quitina, essa interação parece ser muito mais fraca do que a ligação entre a quitina e as vicilinas de sementes resistentes (Sales et al., 1992; Macedo et al., 1993, Sales et al., 2001; Uchôa et al., 2009).

Vicilinas que se ligam à quitina, tóxicas para insetos, também foram isoladas de outras espécies (Yunes et al., 1998). A vicilina isolada de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* é uma glicoproteína dimérica, com duas subunidades de 66,2 e 63,8 kDa e foi tóxica para larvas de *C. maculatus*, causando 50 % de mortalidade e diminuindo 50 % da massa larval, em concentração de 1,0 %. A afinidade à quitina no intestino das larvas, associada à sua baixa digestibilidade por proteases do inseto, também foram relatadas como possível mecanismo de toxicidade dessa vicilina (Moura et al., 2007). Proteínas com massa molecular entre 50 e 40 kDa

isoladas do tegumento de *Albizia lebbbeck*, similares às vicilinas, foram tóxicas para as larvas de *C. maculatus*, diminuindo 78 % a massa larval, em concentração de 0,1 %. Essas proteínas também apresentaram forte afinidade à quitina (Souza *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos apontam a ligação à matriz peritócica de insetos como o mecanismo de toxicidade das proteínas com afinidade à quitina. A MP é descrita como tendo papel importante na proteção do intestino contra danos físicos, substâncias químicas e penetração de microrganismos, além de participar da reciclagem das enzimas digestivas (Wang e Granados, 2000). Logo, a interferência nas funções da MP pode ser letal aos insetos. Trabalhos anteriores mostraram que o bloqueio da formação da matriz peritócica em *Trichoplusia ni* – importante praga agrícola – levou a mudança da fisiologia e perda de proteção do intestino médio contra infecções virais. O agente causador do bloqueio da MP, neste estudo, foi o calcofluor. O calcofluor é um derivado de estilbeno com alta afinidade à quitina. Baixas concentrações de calcofluor, como 1 %, foi capaz de dissociar, *in vitro*, proteínas que se encontravam fortemente ligadas a MP de *T. ni*. Os mesmos ensaios usando soluções de guanidina HCl 6 M e ureia 6 M não obtiveram a mesma eficácia (Wang e Granados, 2000). Considerando as propriedades do calcofluor, fomos testá-lo quanto a sua toxicidade para as larvas de *C. maculatus*, como comparativo para as nossas amostras. A concentração de 0,1 % de calcofluor foi capaz de diminuir a massa larval em 93,9 %, mostrando que interferências na MP podem comprometer seriamente o desenvolvimento do inseto.

Embora não se mostrem como proteínas majoritárias na fração CBP, quitinases também estão presentes nessa fração e provavelmente estão contribuindo para a perturbação da MP do inseto, conseqüentemente para a toxicidade. As bandas reativas ao anticorpo anti-quitinase na fração CBP, apresentaram massas moleculares acima de 55 kDa e abaixo de 40 kDa. Uma quitinase de 22 kDa isolada de cotilédones de feijão-caupi já havia sido previamente isolada e caracterizada como tóxica para *C. maculatus* e fungos (Gomes *et al.*, 1996). As quitinases são abundantes em plantas e podem apresentar massas moleculares variadas. Quitinases de classe I do feijão-caupi, expressas em *Pichia pastoris*, apresentaram massas moleculares de 34 e 37 kDa (Landim *et al.*, 2017). O genoma de *Arabidopsis* contém 25 quitinases com tamanhos variando entre 211 a 430 aminoácidos e massas moleculares entre 20 e 50

kDa (Grover, 2012). No genoma do arroz são encontradas 49 quitinases com 178 a 479 aminoácidos e massas moleculares entre 18 e 50 kDa (Grover, 2012).

A toxicidade de quitinases, isoladas de diversas fontes, para inseto tem sido bastante estudada. Uma quitinase isolada de *Bacillus subtilis* reduziu a atividade das enzimas intestinais (fosfatase alcalina e fosfatase ácida) e o crescimento da larva do tabaco (*Spodoptera litura*) (Chandrasekaran *et al.*, 2014). Uma quitinase de *Pseudomonas fluorescens* apresentou atividade inseticida contra *Helopeltis theivora* (Suganthi *et al.*, 2017). Quitinases isoladas do tegumento de *Glycine max*, com massas moleculares entre 30 e 40 kDa, foram tóxicas, em concentração de 0,1 %, na alimentação de *C. maculatus*, diminuindo a sobrevivência larval em 77 % (Silva *et al.*, 2018).

Para melhor entender os efeitos que proteínas tóxicas teriam sobre o metabolismo das larvas, foi necessário inicialmente analisar o perfil metabólico das larvas de *C. maculatus* em sementes suscetíveis. Nossos resultados mostraram que no terceiro e quarto instar a média do comprimento larval é de 2 e 4 mm no 16º e 20º DAO, estes dados estão de acordo com a literatura onde relata-se que no terceiro e quarto instar, a média do comprimento larval é de 2,43 e 3,64 mm, quando desenvolvidas em temperaturas 25 a 32 °C (Devi e Devi, 2014). Nos 21º e 22º DAO observamos o inseto já em estágio de pupa, no 1º e 2º estágios, respectivamente, dados também em acordo com a literatura (Devi e Devi, 2014).

Durante os períodos de alimentação das larvas de insetos, no geral, muitas reservas são acumuladas para serem usadas durante longos períodos sem alimentação (Arrese e Soulages, 2010). No caso de *C. maculatus*, um inseto holometábolo, estes períodos se referem à metamorfose e à fase de vida adulta, em que estes não se alimentam (Beck e Blumer, 2011).

Com relação as macromoléculas e suas hidrolases, observa-se que uma importante macromolécula que os insetos utilizam como reserva energética no corpo gorduroso é o glicogênio. O metabolismo de glicogênio conta principalmente com as enzimas  $\alpha$ -amilases, responsáveis pela hidrólise de amido proveniente da alimentação e pela hidrólise do glicogênio para liberar glicose em períodos em que há demanda energética (Arrese e Soulages, 2010; Terra e Ferreira, 2012). As atividades de  $\alpha$ -amilase nas larvas de *C. maculatus* apresentaram pico de atividade no 17º DAO, caindo em seguida. Quando comparamos essa atividade com a quantidade de glicose,

observamos que o pico de glicose é 19<sup>o</sup> DAO, imediatamente após a subida da amilase. Visto que as  $\alpha$ -amilases são descritas em insetos como estando envolvidas nos processos de digestão de carboidratos provenientes da alimentação (Holtof *et al.*, 2019), podemos sugerir que esse aumento de glicose pode ser resultado da quebra de amido ingerido pelo inseto. A redução da quantidade de glicose e da atividade das amilases coincide com a aproximação do período de pupação, período em que a larva não mais se alimenta (Arrese e Soulages, 2010).

Os aminoácidos advindos da digestão larval de proteínas da alimentação também são armazenados pelos insetos para que haja uma fonte de aminoácidos para síntese de estruturas proteicas na fase adulta (Holtof *et al.*, 2019; Kanost *et al.*, 1990). Nesta fase, a síntese de proteínas de armazenamento é feita pelo corpo gorduroso (Arrese e Soulages, 2010). As enzimas digestivas do tipo proteases cisteínicas são as principais responsáveis pela atividade proteolítica em *C. maculatus* (Moon *et al.*, 2004). O pico de atividade dessas proteases foi observado em 18<sup>o</sup> DAO, coincidindo com os maiores valores de proteínas, que foram observados entre o 18<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> DAO. As proteínas foram as macromoléculas mais abundantes nas larvas, alcançando concentrações superiores a 1 mg/larva, valor que representa cerca de 10 % da massa da larva.

Os triglicerídeos foram as macromoléculas menos concentradas nas larvas de *C. maculatus*, o que pode se dever ao fato de as sementes de feijão possuírem baixos níveis de lipídeos, de 1 a 3,5 %, dependendo do cultivar (Medeiros, 2013). Entretanto, mesmo em baixas concentrações, os triglicerídeos são os principais lipídeos estocados em insetos. Os triglicerídeos são armazenados nos adipócitos, as principais células-troncos reserva do corpo gorduroso e as lipases são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise dessas macromoléculas estocadas (Arrese e Soulages, 2010). À medida que a larva foi ganhando massa, os níveis de triglicerídeos foram aumentando, apresentando concentração máxima no 19<sup>o</sup> DAO. Diferentemente das amilases e proteases cisteínicas, as lipases apresentaram as maiores atividades no período de pupa, após o 20<sup>o</sup> DAO. Esses dados indicam que essas reservas de triglicerídeos são usadas, pelo inseto, apenas da fase de pupa em diante.

Cruz *et al.*, (2016) mostraram diminuições significativas nas atividades de proteases cisteínicas,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase em larvas de 20 DAO de *C. maculatus* desenvolvidas em sementes do cv. BRS Xiquexique. Assim fomos

investigar acerca da atividade de proteases cisteínicas nas larvas alimentadas com as frações CBP, CBV e com calcofluor. Nossos resultados mostraram reduções de 46,5 %, 64 % e 86,2 % na atividade dessas proteases em larvas alimentadas com CBP, CBV e calcofluor, respectivamente. A falha no processo de digestão de proteínas pode alterar o crescimento, desenvolvimento e armazenamento de energia (Holtof *et al.*, 2019; Kanost *et al.*, 1990). Reduções nas quantidades de proteína e glicose e na atividade das enzimas lipase e amilase foram observadas em larvas de 20 DAO, que se alimentaram com 2 % da fração CBV. Esses dados sugerem que a ligação desses compostos a quitina da MP tenha interferido na reciclagem das enzimas, causando um desbalanço energético e reduzindo o ganho de massa corporal das larvas.

Através dos experimentos de modelagem, obtivemos uma estrutura tridimensional da vicilina monomérica que está de acordo com a estrutura clássica das vicilinas, onde se pode identificar um domínio C-terminal, um domínio N-terminal e conformações do tipo  $\beta$ -barril em cada um destes domínios, seguidos por  $\alpha$ -hélices (Rocha *et al.*, 2018; Kesari *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2020). Embora inúmeros trabalhos descrevam a afinidade à quitina como relacionada a toxicidade das vicilinas, essas proteínas não apresentam o sítio clássico de ligação à quitina, reforçando a necessidade da investigação dos possíveis sítios de ligação a quitina, presente nas vicilinas.

Rocha *et al.*, (2018) mostraram através de experimentos de docking, que possíveis sítios de ligação à quitina do trímero de vicilina encontram-se nos vértices da estrutura, e que esta interação ocorre principalmente através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Além disso, foi sugerido que a energia livre de ligação entre o trímero de vicilina de IT81D-1053 (resistente à *C. maculatus*) foi menor do que a predita entre o trímero de vicilina de Epace 10 (suscetível à *C. maculatus*) (Rocha *et al.*, 2018). Miranda *et al.*, 2020 sugeriram uma região de ligação à quitina na alfa-hélice nº 8 da vicilina monomérica. Esta alfa-hélice está menos exposta quando a vicilina está em configuração trimérica. Neste trabalho utilizamos a mesma abordagem de docking cego com a vicilina monomérica realizada por Miranda *et al.* (2020).

Através do docking da vicilina monomérica com (NAG)<sub>4</sub>, observamos que o resíduo de Lys53 participa da interação com (NAG)<sub>4</sub> através de ponte salina. O resíduo Lys216 também interagia com (NAG)<sub>4</sub> por ponte salina no trabalho de Miranda

*et al.*, 2020. Dentre as interações com (NAG)<sub>4</sub> envolvendo ligações de hidrogênio, os aminoácidos Gln, Arg e Glu também foram vistos por Miranda *et al.*, 2020 interagindo com (NAG)<sub>4</sub> através dessas ligações.

Quando buscamos entre o proteoma e transcriptoma de larvas de *C. maculatus* acerca de suas enzimas digestivas, a catepsina L foi encontrada na maioria dos trabalhos, estando de acordo com o fato destas enzimas serem as catepsinas quantitativamente mais importantes do intestino médio de insetos (Terra e Ferreira, 2012). O sítio de glicosilação RSGQ predito pelo ELM está contido no maior peptídeo gerado da hidrólise *in silico* (39 resíduos de aminoácido). Este peptídeo tem tamanho similar aos peptídeos obtidos *in vitro*. Todos os experimentos de docking mostraram um valor de  $\Delta G$  negativo, indicando que a interação entre a proteína/peptídeos e (NAG)<sub>4</sub> pode ocorrer de forma espontânea.

O sítio de glicosilação RSGQ possui os resíduos Ser17 de PEP1 e os resíduos Arg16 e Gln19 da vicilina monomérica interagindo com (NAG)<sub>4</sub>. Este sítio foi o que encontramos mais resíduos coincidentes através dos dockings. Dos resíduos de vicilina que interagiram com (NAG)<sub>4</sub>, Arg e Gln são os que aparecem com mais frequência. Além disso, o aminoácido Gln seguido de Arg aparece em duas regiões distintas que interagiram com (NAG)<sub>4</sub>: **QRSK** e **QREQQQ**. Assim como no sítio sugerido por Miranda *et al.*, (2020), a região QRSK também está contida em uma alfa hélice (Miranda *et al.*, 2020).

O sítio de ligação à quitina REQUIRELMK sugerido por Miranda *et al.*, (2020) está contido em PEP2, o peptídeo que mostrou menor valor de  $\Delta G$  (-7,962) dentre todos os dockings. Na interação de REQUIRELMK com NAG<sub>4</sub> o valor de  $\Delta G$  observado foi ainda menor (-8.3 kcal/mol) (Miranda *et al* 2020).

Dos 4 resíduos detectados nas interações com (NAG)<sub>4</sub> no PEP3, 3 deles estavam contidos no sítio de ligação à quitina EITPEK previamente descrito por Rocha *et al.* (2018). Destes, os resíduos de Gln interagem com (NAG)<sub>4</sub> por pontes de hidrogênio como foi visto também por Rocha *et al.*, (2018). Apesar dos resíduos de aminoácidos do PEP4 não terem coincidido com o sítio de glicosilação INATSN, o fragmento **YRAELSEDDVFV** foi maior região de interação com (NAG)<sub>4</sub> encontrada com menor energia de ligação, depois de PEP2.

As ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foram as principais interações em todos os experimentos de docking. Os grupos hidroxilas presentes nas N-acetilglicosaminas, bem como em outros açúcares, faz com que esses monômeros sejam bons candidatos a participarem das ligações de hidrogênio. Além disso, a presença de átomos eletronegativos como O e N tanto no açúcar como nos resíduos de aminoácidos também contribui para esta interação.

Esta abordagem *in silico* contribui para o melhor entendimento acerca da interação entre vicilinas e à quitina. No entanto, espera-se identificar os peptídeos gerados pela hidrólise *in vitro* para confirmar os resíduos envolvidos na interação entre as vicilinas e a quitina. O desenvolvimento de novos cultivares de feijão-caupi visando a presença de vicilinas tóxicas para *C. maculatus* e para outras pragas e patógenos contribui para o manejo integrado de pragas reduzindo a quantidade de pesticidas utilizada.

## 6 CONCLUSÕES

- Proteínas com afinidade à quitina, como vicilinas e quitinases, foram isoladas de sementes de *Vigna unguiculata* do cv. BRS Xiquexique e foram tóxicas para as larvas do inseto *C. maculatus*;
- Sementes de *Vigna unguiculata* do cv. Fradinho, susceptível a infestação pelo inseto, também possuem vicilinas com afinidade a quitina, entretanto essas proteínas não apresentaram toxicidade contra o inseto;
- O composto ligante de quitina, calcofluor, em baixa concentração (0,1 %) foi tóxico para larvas de *C. maculatus*;
- A atividade de proteases cisteínicas foi reduzida em larvas alimentadas com 5 % da fração CBP, 2 % da fração CBV e 0,1 % de calcofluor;
- A capacidade de ligação à quitina foi preservada em peptídeos originados da hidrólise, *in vitro*, das vicilinas do cv. BRS Xiquexique;
- Análises, *in silico*, mostraram que interações entre o monômero de vicilina e o tetrâmero de N-acetilglicosamina ocorrem espontaneamente através de ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas;
- Sítios de glicosilação e sítios de ligação à quitina foram localizados em quatro peptídeos originados pela hidrólise, *in silico*, da vicilina do cv. BRS Xiquexique;
- Análises, *in silico*, revelaram que interações moleculares entre peptídeos de vicilina e o tetrâmero de N-acetilglicosamina ocorrem espontaneamente e principalmente através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.



## BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, S.; Khan, M. A.; Ahmad, N. Determination of susceptibility level of phosphine in various strains of Dhora (*Callosobruchus maculatus* F.). **International Journal Of Agriculture & Biology**, v. 4, n. 3, p. 329–331, 2002.
- Amorim, T. M. L., Macedo, L. L. P., Uchôa, A. F., Oliveira, A. S., Pitanga, J. C. M., Macedo, F. P., Santos, E. A., Sales, M. P. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7738–7745, 2008.
- An, H. J., Froehlich, J. W., Lebrilla, C. B. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 4, p. 421-426, 2009.
- Arrese, E. L., Soulages, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 207-225, 2010.
- Asif, M., Rooney, L. W., Ali, R., Riaz, M. N. Application and opportunities of pulses in food system: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 11, p. 1168-1179, 2013.
- Ávila, C. J., Vivan, L. M., Tomquelski, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. **Embrapa** (Circular Técnica 23), ISSN 1679-0464, 2013.
- Bard, G. C. V., Nascimento, V. V., Oliveira, A. E. A., Rodrigues, R., Cunha, M., Dias, G. B., Vasconcelos, I. M., Carvalho, A. O., Gomes, V. M. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are  $\alpha$ -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Biopolymers**, v. 102, p. 335-343, 2014.
- Bastos, E. A. **A Cultura do Feijão-Caupi no Brasil**. Teresina: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016.
- Beck, C. W.; Blumer, L. S. **A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus***. Alexandria: National Science Foundation, 2011, 17 p.
- Beltrati, C. M.; Paoli, A. A. S. Sementes. In: Apezato-da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S. M. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2012, 438 p.

- Benhalima, H., Chaudhry, M. Q., Mills, K. A., Price, N. R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 3, p. 241–249, 2004.
- Bewley, J. D.; Black, M. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Nova York: Springer, 2013, 392 p.
- Bixenmann, R. J., Coley, P. D., Weinhold, A., Kursar, T. A. High herbivore pressure favors constitutive over induced defense. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 17, p. 6037–6049, 2016.
- Boukar, O., Belko, N., Chamarthi, S., Togola, A., Batiemo, J., Owusu, E., Haruna, M., Diallo, S., Umar, M. L., Olufajo, O., Fatokun, C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415–424, 2019.
- Bridge, P. D.; Sawilowsky, S. S. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: comparative power of the t-test and wilcoxon rank-sum test in small samples applied research. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 52, n. 3, p. 229–235, 1999.
- Brusca, G. J.; Brusca, R. C. **Invertebrados**. 2a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2007, 968 p.
- Cândido, E. S., Pinto, M. S. F., Pelegrini, P. B., Lima, T. G., Silva, O. N., Pogue, R. Grossi-de-Sá, M. F., Franco, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, p 3290-3305, 2011.
- Cardoso, M. J. Bastos, E. A. Andrade Junior, A. S. De Athayde Sobrinho, C. **Feijão-Caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2017, 244 p.
- Castro, M. J. P., Baldin, E. L. L., Cruz, P. L., Souza, C. M., Silva, P. H. S. Characterization of cowpea genotype resistance to *Callosobruchus maculatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1201-1209, 2013.
- Chandrasekaran, R., Revathi, K., Thanigaivel, A., Kirubakaran, S. A., Senthil-Nathan, S. Bacillus subtilis chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 116, p. 1–12, 2014.
- Chapman, R. F., Simpson, S. J., Douglas, A. E. **The Insects: Structure and Function**. (5 Ed) Cambridge: Cambridge University Press, 2013, 929 p.
- Chung, R. P. T.; Neumann, G. M.; Polya, G. M. Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. **Plant Science**, v. 127, n. 1, p. 1–16, 1997.

- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <https://www.conab.gov.br>. Acesso em dezembro de 2020.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2018, v. 5.
- Copeland, L. O., McDonald, M. **Principles of Seed Science and Technology**. 4 ed. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001, 798 p.
- Costa, N. P., Junior, A. L. B. Efeito de genótipos de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., sobre o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 77-83, 2004.
- Cruz, L.P., de Sá, L.F.R., Santos, L.A., Gravina, G. A., Carvalho, A. O., Fernandes, K. V. S., Freire Filho, F. R., Gomes, V. M., Oliveira. A. E. A. Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 117–128, 2016.
- Dahiya, N.; Tewari, R.; Hoondal, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, 2006.
- Dantzger, M., Vasconcelos, I. M., Scorsato, V., Aparicio, R., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Bowman – Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224-235, 2015.
- De Sá, L. F. R. Ventury, K. E., Machado, Olga L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. Oliveira, A. E. A. Toxic effect of *Canavalia ensiformis* seed coat on larval development of *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 313–326, 2018.
- De Sá, L. F. R., Wermelinger, T.T., Ribeiro, E. S., Gravina, G. A., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J., Venancio, T. M., Rezende, G. L., Oliveira, A. E. A. Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 60, n. 1, p. 50–57, 2014.
- Devi, M. B., Devi, N. V. Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 74, n. 23, p. 74-76, 2014.
- Ding, X., Gopalakrishnan, B., Johnson, L. B., White, F. F., Wang, X., Morgan, T. D., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. **Transgenic Research**, v. 7, p. 77–84, 1998.

- Dos Santos, K. B., Guedes, I. A., Karl, A. L. M., Dardenne, L. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-peptide Dataset. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 2020.
- Dowd, P. F., Mehta, A. D., Boston, R. S. Relative toxicity of the maize endosperm ribosome-inactivating protein to insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3775–3779, 1998.
- Dunwell, J. M.; Purvis, A.; Khuri, S. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 7–17, 2004.
- Egorov, Ts. A., Odintsova, T. I. Defense peptides of plant immunity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 1–9, 2012.
- El-Araby, M.M., El-Shatoury, E.H., Soliman, M.M., Shaaban, H. F. Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds. **AMB Expr**, v. 10, n. 90, 2020.
- ELM — the eukaryotic linear motif resource in 2020. Disponível em: <http://elm.eu.org/>. Acesso em dezembro de 2020.
- Engvall, E., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.
- FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **Seeds in Emergencies**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. 202 p.
- FAO - International Year of Pulses (2016). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/pulses-2016/about/en/>. Acesso em 2021.
- Fatokun, C. A., Tarawali, S. A., Singh, B. B., Kormawa, P. M., Tamò, M. **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Ibadan, Nigéria: IITA, 2002.
- Ferreira, S. R. **Toxicidade de proteínas com afinidade à quitina de cultivares de *Vigna unguiculata* para o inseto *Callosobruchus maculatus***. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 52 p., 2018.
- Fox, C. W. The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Oecologia**, v. 96, n. 1, p. 139–146, 1993.

- Freire Filho, F. R., Ribeiro, V. Q., Rocha, M. M., Damasceno e Silva, K. J., Nogueira, M. S. R., Rodrigues, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1682–1687, 2004.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. Vicilin-type globulins follow distinct patterns of degradation in different species of germinating legume seeds. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 323–329, 2007.
- Freitas, R. S. Qualidade de grãos de feijão armazenados sob atmosfera modificada. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 45 p., 2009.
- Gallardo, K.; Thompson, R.; Burstin, J. Reserve accumulation in legume seeds. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 10, p. 755–762, 2008.
- Galo, D. Nakano, O. Neto, S. S. Carvalho, R. P. L. Baptista, G. C. Filho, E. B. Parra, J. R. P. Zuchi, R. A. Alves, S. B. Vendramin, J. D. Marchini, L. C. Lopes, J. R. S. Omoto, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920 p.
- Gatehouse, A. M. R., Dewey, F. M., Dove, J., Fenton, K. A., Pusztai, A. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*; mechanism of toxicity. **Science of Food and Agriculture**, v. 35, p. 373–380, 1984.
- Gatehouse, J. A., Lycett, G. W., Delauney, A. J., Croy, R. R. D., Boulter, D. Sequence specificity of the post-translational proteolytic cleavage of vicilin, a seed storage protein of pea (*Pisum sativum* L.). **Biochemical Journal**, v. 212, n. 2, p. 427–432, 1983.
- Gomes, V. M., Mosqueda, M., Blanco-Labra, A., Sales, M. P., Fernandes, K. V. S., Cordeiro, R. A., Xavier-Filho, J. Vicilin Storage Proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) Seeds Inhibit Fungal Growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4110–4115, 1997.
- Gomes, V. M., Okorokov, L. A., Rose, T. L., Fernandes, K. V., Xavier-Filho, J. Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1379, n. 2, p. 207–16, 1998.
- Gomes, V. M.; Oliveira, A. E. A.; Xavier-Filho, J. Chitinase and alpha beta-1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 1, p. 86-90, 1996.

- Graham, P. H.; Vance, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 872–877, 2003.
- Grover, A. Plant chitinases: Genetic diversity and physiological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, p. 57-73, 2012.
- Gupta, M., Sharma, P., Nath, A. K. Purification of a novel  $\alpha$ -amylase inhibitor from local Himalayan bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds with activity towards bruchid pests and human salivary amylase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1286-1293, 2014.
- Haruta, M., Major, I. T., Christopher, M. E., Patton, J. J., Constabel, C. P. A. Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): Cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 347–359, 2001.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review Entomology**, v. 54 p. 285–302, 2009.
- Holtof, M., Lenaerts, C., Cullen, D., Broeck, J. V. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019.
- Jalil, S. U., Mishra, M., Ansari, M. I. Current view on chitinase for plant defence. **Trends in Biosciences**, v. 8, n. 24, p. 6733–6743, 2015.
- Kabir, S. R., Rahman, Md. M., Tasnim, S., Karim, Md. R., Khatun, N., Hasan, I., Amin, R., Islam, S., Nurujjaman, Md., Kabir, A. H., Sana, N. K., Ozeki, Y., Asaduzzaman, A. K. M. Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 62–68, 2016.
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Heusden, M. C. V., Ziegler, R. Insect haemolymph proteins. **Advances in Insect Physiology**, v. 22, p. 299-396, 1990.
- Keneni, G., Bekele, E., Getu, E., Imtiaz, M., Damte, T., Mulatu, B., Dagne, K. Breeding food legumes for resistance to storage insect pests: Potential and limitations. **Sustainability**, v. 3, n. 9, p. 1399–1415, 2011.
- Kesari, P., Neetu; Sharma, A., Katiki, M., Kumar, P., Gurjar, B. R., Tomar, S., Sharma, A. K., Kumar, P. Structural, Functional and Evolutionary Aspects of Seed Globulins. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 3, p. 267–277, 2017.
- Kini, S.G., Wong, K.H., Tan, W.L., Xiao, T., Tam, J. P. Morintides: cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 68, 2017.

- Kitajima, S., Kamei, K., Taketani, S., Yamaguchi, M., Kawai, F., Komatsu, A., Inukai, Y. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 6, 2010.
- Kpoviessi, A. D., Agbahoungba, S., Agoyi, E. E., Chougourou, D. C., Assogbadjo, A. E. Resistance of cowpea to bruchid (*Callosobruchus maculatus* Fab.): Knowledge level on the genetic advances. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 11, n. 8, p. 185–195, 2019.
- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., Pareek, N. Chitinases—Potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 88, 2018.
- Kunz, D., Oliveira, G. B., Brascher, T. C., Samuels, R. I., Macedo, M. L. R., Souza, L. F., Dafré, A. L., Silva, C. P. Phaseolin ingestion affects vesicular traffic causing oxidative stress in the midgut of *Callosobruchus maculatus* larvae, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 228, p. 34-40, 2019.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- Lagarda-Diaz, I., A. Guzman-Partida, and L. Vazquez-Moreno. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.
- 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., Medeiros, 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. 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**, v. 135, p 89-103, 2017.
- Laskowski, R., Swindells, M. B., LigPlo+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778-2786.
- Liu, X., Cooperb, A. M. W, Zhanga, J., Zhub, K. Y. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 114, p. 109–115, 2019.
- Lorini, I., Collins, P. J., Daglish, G. J., Nayak, M. K., Pavic, H. Detection and characterisation of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 358–364, 2007.

- Lorini, I., Krzyzanowski, F. C., França-Neto, J. B., Henning, A. A., Henning, F. A. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. 1a ed. Brasília: Embrapa, 2015.
- Macedo, L. L. P., Amorim, T. M. L., Uchôa, A. F., Oliveira, A. S., Ribeiro, J. K. C., Macedo, F. P., Santos, E. A., Sales, M. P. Larvicidal effects of a chitin-binding vicilin from *Erythrina velutina* seeds on the mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 802–808, 2008.
- Macedo, M. L. R., Andrade, L. B. S., Moraes, R. A. Xavier-Filho, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 105, n. 1, p. 89–94, 1993.
- Macedo, M. L. R., Damico, D. C. S., Freire, M. G. M., Toyama, M. H., Marangoni, S., Novello, J. C. Purification and characterization of an *N*-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelreuteria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2980–2986, 2003.
- Malik, A. P. Purification and properties of plant chitinases: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. e12762, 2019.
- Marcus, J. P., Green, J. L., Goulter, K. C., Manners, J. M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **The Plant Journal**, v. 19, n. 6, p. 699-710, 1999.
- Medeiros, Jackeline Lima de. **Caracterização bioquímica e funcional de isolados proteicos e genótipos de excelência de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- Mendonça, E. S., Vartak, P. H., Rao, J. U., Deshpande, M. V. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 4, p. 373-376, 1996.
- Messina, F. J., Lish, A. M., Gompert, Z. Components of cowpea resistance to the seed beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Economic Entomology**, doi: 10.1093/jee/toz117, 2019.
- Michaud, D. Nguyen-Quoc, B., Bernier-Vadnais, N., Faye, L. Yelle, S. Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 3, p. 497–503, 1994.
- Miranda, M. R. A., Uchôa, A. F., Ferreira, S. R., Ventury, K. E., Costa, E. P., Carmo, P. R. L., Machado, O., Fernandes, K. V. S., Oliveira, A. E. A. Chemical modifications



- of vicilins interfere with chitin-binding affinity and toxicity to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) insect: a combined in vitro and in silico analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 20, p. 5596–5605, 2020.
- Mishra, S. K., Macedo, M. L. R., Panda, S. K., Panigrahi, J. Bruchid pest management in pulses: past practices, present status and use of modern breeding tools for development of resistant varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 172, p. 4-19, 2017.
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaitė-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 5, p. 620-644, 2005.
- Moon, J., Salzman, R. A., Ahn, J. E., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 3, p. 283–291, 2004.
- Mota, A. C., DaMatta, R. A., Lima F. M., Silva, C. P. Xavier-Filho, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 9, p. 873–880, 2003.
- Moura, F. T., Oliveira, A. S., Macedo, L. L. P., Vianna, A. L. B. R., Andrade, L. B. S., Martins-Miranda, A. S., Oliveira, J. T. A., Santos, E. A., Sales, M. P. Effects of a chitin-binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 260–266, 2007.
- Mudryj, A. N., Yu, N., Aukema, H. M. Nutritional and health benefits of pulses. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1197-204, 2014.
- Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., Ikegami, T., Uegaki, K. Tertiary structure and carbohydrate recognition by the chitin-binding domain of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, n. 3, p. 670–680, 2008.
- Nascimento, W. M. **Hortaliças leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016, 232 p.
- Nogueira, F. C. S., Silva, C. P., Alexandre, D., Samuels, R. I., Soares, E. L., Aragão, F. J. L., Palmisano, G., Domont, G. B., Roepstorff, P., Campos, C. A. P. Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2704-15, 2012.

- Oliveira, A. E. A., Fernandes, K. V. S., Souza, A. J., Santos, P. O. Influence of the soybean seed coat upon seed infestation and development of the insect *Callosobruchus Maculatus*. In: Davies, S., Evans, G. (Eds). Soybean and wheat crops. Growth, fertilization and yield. New York: Nova Science Publishers. 2009, p. 1-14.
- Oliveira, A. S., Migliolo, L., Aquino, R. O., Ribeiro, J. K. C., Macedo, L. L. P., Andrade, L. B. S., Bemquerer, M. P., Santos, E. A., Kiyota, S., Sales, M. P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and doublés activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7342-7349, 2007.
- Oliveira, C. F. R., Moura, M. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B., Macedo, M. L. R. A chitin-binding lectin from *Moringa oleífera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 67-76, 2017.
- ONU - FAO marca Dia Mundial das Leguminosas destacando benefícios da biodiversidade do solo (2020). **ONU News**. Disponível em: [news.un.org](https://news.un.org). Acesso em 2021.
- ONU - FAO: consumo e produção de leguminosas têm perdido espaço na América Latina. (2016) **Nações Unidas Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/>. Acesso em 2021.
- ONU - Leguminosas podem ajudar a combater as mudanças climáticas, a fome e a obesidade. (2016) **Nações Unidas Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/>. Acesso em 2021.
- Paes, E. V., Uchôa, A. F., Pinto, M. S.T., Silva, C. P., Fernandes, K. V.S., Oliveira, A. E.A., Xavier-Filho, J. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, n. 1, p. 11–17, 2008.
- Pedra, J. H. F., Brandt, A., Westerman, R., Lobo, N., Romero-Severson, J., Murdock, L. L., Pittendrigh, B. R. Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and  $\alpha$ -amylases associated with food breakdown. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 405-412, 2003.
- Pedrosa, C., Trisciuzzi, C., Ferreira, S. T. effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2025-2030, 1997.
- Pepi, L. E., Sanderson, P., Stickney, M., Amster, J. I. Developments in mass spectrometry for glycosaminoglycan analysis: A review. **Molecular & Cellular Proteomics**, In Press, Journal Pre-proof <https://doi.org/10.1074/mcp.R120.002267>, 2021.

- Pimentel, M. A. G., Faroni, L. R. D., Tótola, M. R., Guedes, R. N. C. G. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v. 63, n. 9, p. 876–881, 2007.
- Raven, P. H.; Eichhorn, S. E., Evert, R. F. **Biologia Vegetal**. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, 2672 p.
- Rawlings, N. D., Salvesen. G (Eds). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3<sup>a</sup> Ed. Londres: Academic Press, 2013, 3938 p.
- 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., Perales, P., Gomes, V. M. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 4, p. 399-405, 2007.
- Ribeiro, V. Q. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002, 108 p.
- Rocha, A. J., Sousa, B. L., Girão, M. S., Barroso-Neto, I. L., Monteiro-Júnior, J. E., Oliveira, J. T.A., Nagano, C. S., Carneiro, R. F. Monteiro-Moreira, A. C.O., Rocha, B. A.M., Freire, V. N., Grangeiro, T. B. Cloning of cDNA sequences encoding cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins: Computational simulations suggest a binding mode of cowpea vicilins to chitin oligomers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 565–573, 2018.
- Ruppert, E. E.; Fox, R. S.; Barnes, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Editora Roca, 2005.
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., Schroeder, M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. w1, w443–w447, 2015.
- Sales M.P., Macedo M.R.L., X.-F. J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: **Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 945–950, 1 dez. 1992
- Sales, M. P., Andrade, L. B. S., Ary, M. B., Miranda, A. R. A., Teixeira, F. M., Oliveira, A. S., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship with trypsin inhibitor and vicilin excretion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 142, n. 4, p. 422-426, 2005.

- Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-De-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 27–34, 2001.
- Santos, J. P.; Mantovani, E. C. **Perdas de grãos na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA- CNPMS, 1997.
- Sayadi A, Immonen E, Bayram H, Arnqvist G. The De Novo transcriptome and its functional annotation in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 2016.
- Schägger, H.; Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.
- SENAR - Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Grãos: armazenamento de milho, soja, feijão e café**. Brasília: Senar, 2018, 100 p.
- Sharma, P., Nath, A. K., Kumari, R., Bhardwaj, S. V. Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from *Albizia lebbek* seeds. **Journal of Forestry Research**, v. 23, p. 131-137, 2012.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.
- Shutov, A. D., Braun, H., Chesnokov, Y. V., Bäumlein, H. A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 1, p. 79–89, 1998.
- Silva, A. C., Santos, D. C., Junior, D. L. T., Silva, P. B., Santos, R. C., Siviero, A. Cowpea: A Strategic Legume Species for Food Security and Health. In: **Legume Seed Nutraceutical Research**. Londres: IntechOpen, 2019.
- Silva, N. C., Conceição, J. G., Ventury, K. E., De Sá, L. F. R., Oliveira, E. A. G., Santos, I. S., Gomes, V. M., Costa, M. N., Ferreira, A. T. S., Perales, J., Xavier-Filho, J., Fernandes, K. V. S., Oliveira, A. E. A. Soybean seed coat chitinase as a defense protein against the stored product pest *Callosobruchus maculatus*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1449–1456, 2018.
- Singh, B. B., Singh, S. R. And Adjadi, O. Bruchid resistance in cowpea. **Crop Science**, v. 25, p. 736-739, 1985.

- Singh, G., Arya, S. K. Antifungal and insecticidal potential of chitinases: A credible choice for the eco-friendly farming. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, 2019.
- Slavokhotova, A. A., Shelenkov, A. A., Andreev, Ya. A., Odintsova, T. I. Hevein-like antimicrobial peptides of plants. Hevein-like antimicrobial peptides of plants. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 13, p. 1659–1674, 2017.
- Smith, P. K. Krohn, R. I., Hermanson, G. T. Mallia, A. K. Gartner, F. H. Provenzano, M. D. Fujimoto, E. K. Goetze, N. M. Olson, B. J. Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.
- Souza, A. J., Santos, P. O., Pinto, M. S.T., Wermelinger, T. T., Ribeiro, E. S., Souza, S. C., Deus, M. F., Souza, M. C., Xavier-Filho, J., Fernandes, K. V.S., Oliveira, A. E. A. Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Crop Protection**, v. 30, n. 6, p. 651-657, 2011.
- Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., Chandrashekara, K. N. Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 222-227, 2017.
- Suharti, T., Djam'an, D. F. The potential of RIP (Ribosome Inactivating Protein) as biopesticides. **Buletin Eboni**, v. 1, n. 1, p. 33-39, 2019.
- Teixeira, F. M., Oliveira, A. S., Macedo, L. L. P., Santos, E. A., de Sales, M. P. Effects of a chitin binding vicilin from *Erythrina velutina* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*). **Protein and Peptide Letters**, v. 15, n. 3, p. 270-274, 2008.
- Terra, W. R. Ferreira, C. 11 - Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: Lawrence Irwin, G. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Academic Press, 2012, p. 365-418.
- Terra, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47–61, 2001.
- Tetreau, G.; Wang, P. Chitinous structures as potential targets for insect pest control. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Singapore: Springer New York LLC, 2019. v. 1142, p. 273–292.
- Timko, M. P.; Singh, B. B. Cowpea, a multifunctional legume. In: Moore, P. H.; Ming, R. (Eds.). **Genomics of tropical crops**. New York: Springer, 2008. p. 222–258.
- Titilope, R. B., Kannike, M. A. Laboratory evaluation of six improved cowpea *Vigna unguiculata* varieties for susceptibility to seed beetle, *Callosobruchus maculatus*

- (Coleoptera: Chrysomelidae) in storage. **Journal of Crop Protection**, v.7, n. 3, p. 273-281, 2018.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.
- Tuda, M., Kagoshima, K., Toquenaga, Y., Arnqvist, G. Global genetic differentiation in a cosmopolitan pest of stored beans: Effects of geography, host-plant usage and anthropogenic factors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2014.
- Tyagi, B., Trivedi, N., Dubey, A.  $\alpha$ -Amilase inhibitor: a compelling plant defense mechanism against insect/pests. **Environment & Ecology**, v. 32, n 3, p. 995-999, 2014.
- Uchôa, A. F., Miranda, M. R. A., Souza, A. J., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S., Lemos, F. J. A. Oliveira, A. E. A., Xavier-Filho, J. Toxicity of hydrolyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 8056–8061, 2009.
- Vasconcelos, M. A., Penha, S. S., Castro e Silva, V. R., Leite, T. A., Souza, E. B., Souza, B. W. S., Teixeira, E. H., Silva, A. L. C. Fruticulosin: A novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus fruticulosus* seeds that exhibits toxic and antileishmanial activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 658, n. 15, p. 46-53, 2018.
- Vidal, W. N; Vidal, M. R. R. **Botânica Organografia**: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Viçosa: Editora UFV, 2007, 124 p.
- Wang, G., Bunkers, G. J., Walters, M. R., Thoma, R. S. Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1224-1228, 2001.
- Wang, P., Granados, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 135-143, 2000.
- Wang, X., Bunkers, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 2, 20, p. 669-673, 2000.
- War, A. R. Paulraj., M. G, Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

- War, A. R., Taggar, G. K., Hussain, B., Taggar, M. S., Nair, R. M., Sharma, H. C. Plant defence against herbivory and insect adaptations. **AoB Plants**, v. 10, n. 4, p. 37, 2018.
- Welbaum, G. E. Natural Defense Mechanisms in Seeds. In: Basra, A. (Ed). **Handbook of Seed Science and Technology**. CRC Press, 2006, p. 451-473.
- Wittstock, U., Gershenzon, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 300-3007, 2002.
- Yao, Q., Wu, C., Luo, P., Xiang, X., Liu, J., Mou, L., Bao, J., A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1477-1485, 2010.
- Yunes, A. N. A., De Andrade, M. T., Sales, M. P., Morais, R. A., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M., Xavier-Filho, J. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 1, p. 111–116, 1998.
- Zhou, J., Chen, J., Xu, N., Zhang, A., Chen, K., Xin, F., Zhang, W., Ma, J., Fang, Y. The broad-specificity chitinases: their origin, characterization, and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 3289–3295, 2019.
- Zhu, K. Y., Merzendorfer, H., Zhang, H. Zhang, J. Muthukrishnan, S. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 61, n. 1, p. 177–196, 2016.