

Toxicidade de sementes de *Canavalia rosea* (Sw.) DC. para o
bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (F.)

ALINE DA GAMA MELILA LICURGO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Março - 2020

Toxicidade de sementes de *Canavalia rosea* (Sw.) DC. para o
bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (F.)

ALINE DA GAMA MELILA LICURGO

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Março - 2020

Toxicidade de sementes de *Canavalia rosea* (Sw.) DC. para o
bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (F.)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em: 02/03/2020 Comissão examinadora:

Dr. Evenilton Pessoa Costa
LQFPP-CBB-UENF

Dr.^a Luciana Belarmindo da Silva
IFFluminense (*campus* Campos)

Dr.^a Kátia Valeski Sales Fernandes
LQFPP-CBB-UENF

Dr.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira Orientadora
LQFPP-CBB-UENF

'Alea jacta est'

*Dedico essa conquista ao meu vô
Edésio: minha primeira lembrança de
incentivo na busca de conhecimento
através da pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Desde o século XII há um conceito metafórico relacionado a anões estarem sobre ombros de gigantes. Esta expressão ganhou fama em 1675, após Isaac Newton escrever: “Se eu pude ver mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes”. Diz-se que essa metáfora expressa o significado de descobrir a verdade a partir de descobertas anteriores. Obviamente, durante o decorrer de qualquer trabalho científico, é imprescindível o estudo de pesquisas realizadas anteriormente, e foi através delas que pude chegar até aqui; mas, também gosto da interpretação desta metáfora que denota o fato de que grandes pessoas podem nos ajudar a enxergar além do que nossos olhos podem ver. Por este motivo, agradeço aqui a alguns gigantes que me ajudaram a chegar no lugar em que estou.

À minha orientadora, Elenir, por ter me acolhido no LQFPP e por toda a orientação nesta pesquisa. Agradeço pela paciência, compreensão e tolerância diante de diversos percalços durante esta caminhada. Obrigada também pelas longas conversas e conselhos que se estenderam além da vida acadêmica.

À Professora Luciana Belarmino, grande gigante que tive o prazer - e sorte!!! - de conhecer logo na primeira semana de aulas na licenciatura em Química. Obrigada por ser muito mais que uma orientadora na graduação, acreditando no meu potencial e me fazendo enxergar além do que eu imaginei. Obrigada ainda por todas as trocas enriquecedoras durante esses anos e por todas as portas que me ajudou a abrir.

Ao Kayan, obrigada por toda ajuda nos experimentos, nos seminários, nos artigos e nas crises pessoais. Obrigada ainda por aturar de perto meu humor volátil todos os dias da semana, o dia inteiro, durante esse tempo, estando – literalmente – ao meu lado. Merece uma menção honrosa!!!

À Sarah, companheira de perrengues na UFRJ, nos ônibus, no desespero dos seminários das disciplinas e nas noites e finais de semana de trabalho no laboratório. Obrigada por estar presente em todos os momentos.

Aos amigos que fiz no LQFPP: Odara, Bruna, Brenda, Geovana e Roberta- obrigada por toda a ajuda e companheirismo dispensados durante este período e por fazerem este percurso ser mais leve, prazeroso e com muito mais comida!!! À Sara Nália e à Jaqueline que dispensaram uma ajuda surreal quando muito precisei.

A todos os professores do LQFPP, em especial à Professora Olga Machado e aos Professores Gustavo Rezende e Jorge Hernandez por todas as trocas além das disciplinas.

Ao Antônio do LFBM por toda a ajuda dispensada durante a saga dos experimentos com DAPI.

Agradeço ao Evenilton Pessoa, à Professora Katia Valeski, à Professora Olga Machado e à Elane Ribeiro por aceitarem gentilmente participar da banca de defesa.

À Tia Rosany, por toda a paciência em me ouvir, acalmar, acolher e aconselhar durante um momento extremamente conturbado, me apoiando no retorno das atividades acadêmicas depois de tantos anos afastada.

Ao Thiago por - acima de tudo e de qualquer coisa - ser um companheiro, sendo o responsável por plantar em mim a semente da inquietação, me dando forças e apoio para retomar minha vida acadêmica, começar uma segunda graduação e, posteriormente, dar início ao mestrado.

À minha mãe, grande guerreira, que aguentou comigo esses dois anos de dedicação exclusiva aos estudos, além de compreender minha ausência em diversos momentos, fazendo de tudo para amenizar meu cansaço diário (com ainda mais ênfase nesses últimos meses). Agradeço, ainda, por ser paciente em todos os momentos em que eu consegui causar o efeito de um furacão em apenas alguns minutos. Só nós sabemos. Obrigada por existir e por ser assim, exatamente do jeito que é.

Ao meu irmão, por todo amor e paciência (nem sempre) durante esse tempo de “não posso te ouvir agora, estou lendo um artigo/tenho um seminário para apresentar”.

Ao meu pai por ser calma nos meus momentos de “não quero mais!!!”.

Às minhas irmãs de vida, Fernanda e Janaína, que incrivelmente me surpreendem positivamente quando eu penso não ser mais possível. Eu amo vocês. E não tenho palavras para descrever toda a minha gratidão! Obrigada também pela compreensão em tantos momentos de ausência.

Ao meu grupo preferido de “terapia coletiva” - Carol, Ulli, Kamilla e Fernanda - por me ajudar a manter o equilíbrio entre estudar, escrever, focar e rocamboalizar!

Ao Tiago Cavalcanti (maravilhossíssimo) por ser o responsável pelas minhas - **tentativas** - de manter a calma e a plenitude!

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho: Gratidão!

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| Lista de Figuras | VIII |
| Lista de Abreviaturas | X |
| RESUMO | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Sementes..... | 1 |
| 1.1.1 Importância das sementes na alimentação..... | 2 |
| 1.1.2 Perda no cultivo de grãos | 3 |
| 1.2 <i>Callosobruchus maculatus</i> | 5 |
| 1.2.1 Ciclo de vida do <i>Callosobruchus maculatus</i> | 6 |
| 1.2.2 Eventos do desenvolvimento embrionário de <i>C. maculatus</i> | 7 |
| 1.2.3 Desenvolvimento pós-embrionário..... | 10 |
| 1.3 Mecanismos naturais de defesa das sementes | 12 |
| 1.3.1 Defesas constitutivas relacionadas ao tegumento de sementes..... | 14 |
| 1.4 <i>Canavalia rosea</i> | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 Objetivo geral | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 20 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Sementes..... | 21 |
| 3.2 Insetos | 21 |
| 3.3 Caracterização morfológica das sementes | 21 |
| 3.4 Infestação das sementes..... | 22 |
| 3.5 Análise morfológica do desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> | 22 |
| 3.6 Extração proteica dos cotilédones de <i>Canavalia rosea</i> | 23 |
| 3.7 Isolamento das frações proteicas dos cotilédones de <i>Canavalia rosea</i> | 24 |
| 3.7.1 Preparo da quitina para cromatografia de afinidade | 24 |
| 3.7.2 Isolamento de proteínas por cromatografia de afinidade à quitina..... | 24 |
| 3.7.3. Isolamento de proteínas por cromatografia de troca iônica..... | 25 |
| 3.8 Visualização do perfil proteico das amostras através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) | 25 |
| 3.9 Sistema de sementes artificiais | 26 |
| 3.9.1 Sementes artificiais contendo tegumentos íntegros de <i>C. rosea</i> | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.9.2 Sementes artificiais contendo tegumentos artificiais de <i>C. rosea</i> | 27 |
| 3.9.3 Sementes artificiais sem tegumentos | 28 |
| 3.10 Quantificação de glicose, proteínas, triacilgliceróis e colesterol nas larvas | 28 |
| 3.10.1 Determinação de glicose | 28 |
| 3.10.2 Determinação de proteínas totais | 29 |
| 3.10.3 Determinação de triacilglicerol | 30 |
| 3.10.4 Determinação de colesterol | 30 |
| 3.11 Quantificação da atividade de enzimas digestivas das larvas | 31 |
| 3.11.1 Determinação da atividade de lipases | 31 |
| 3.11.2 Determinação da atividade de α -amilase | 32 |
| 3.11.3 Determinação da atividade de proteases cisteínicas | 32 |
| 3.12 Análises estatísticas de dados | 33 |
| 4 - RESULTADOS | 34 |
| 4.1 Análise da influência de sementes naturais <i>C. rosea</i> sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> | 34 |
| 4.2 Análise da influência do tegumento natural de <i>C. rosea</i> sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> | 37 |
| 4.3 Análise da morfologia dos embriões de <i>Callosobruchus maculatus</i> desenvolvidos sobre os tegumentos naturais de <i>Canavalia rosea</i> | 40 |
| 4.4 Análise da influência de sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais de <i>C. rosea</i> sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> | 42 |
| 4.5 Avaliação da influência de compostos de cotilédones de <i>C. rosea</i> sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> | 50 |
| 4.5.1 Isolamento de frações proteicas de cotilédones de <i>C. rosea</i> e avaliação da toxicidade para <i>C. maculatus</i> | 54 |
| 4.6 Fracionamento das proteínas de cotilédones de <i>C. rosea</i> através de cromatografias | 57 |
| 4.6.1 Fracionamento das proteínas da fração F0-70% por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose | 57 |
| 4.6.2 Fracionamento das proteínas da fração F70-90% por cromatografia de afinidade em quitina..... | 58 |
| 4.6.4 Avaliação da toxicidade das frações proteicas sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> | 60 |
| 4.7 Quantificação de glicose, proteínas, triacilgliceróis e colesterol nas larvas | 63 |
| 4.7.1 Quantificação de proteínas | 63 |
| 4.7.2 Quantificação de glicose | 65 |
| 4.7.3 Quantificação de triacilgliceróis..... | 67 |
| 4.7.4 Quantificação de colesterol..... | 69 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.8 | Quantificação da atividade de enzimas digestivas das larvas..... | 71 |
| 4.8.1 | Quantificação da atividade de protease cisteínica..... | 71 |
| 4.8.2 | Quantificação da atividade de lipases..... | 73 |
| 4.8.3 | Quantificação da atividade de α -amilase | 75 |
| 5. | DISCUSSÕES..... | 77 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 87 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 88 |

Lista de Figuras

| Figura | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Estágios de extensão e segmentação da banda germinal. | 8 |
| Figura 2: Desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre sementes de <i>Vigna unguiculata</i> . | 9 |
| Figura 3: Canal alimentar de insetos. | 12 |
| Figura 4: Interferência de semente natural de <i>Canavalia rosea</i> sobre a oviposição de fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> . | 34 |
| Figura 5: Interferência de semente natural de <i>Canavalia rosea</i> sobre a penetração larval e sobrevivência de <i>Callosobruchus maculatus</i> . | 35 |
| Figura 6: Interferência de semente natural de <i>Canavalia rosea</i> sobre o desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i> . | 36 |
| Figura 7: Interferência do tegumento natural de sementes de <i>C. rosea</i> sobre os parâmetros oviposição e penetração larval de <i>C. maculatus</i> . | 37 |
| Figura 8: Análise da interferência do tegumento de <i>C. rosea</i> sobre os parâmetros de desenvolvimento e sobrevivência do <i>C. maculatus</i> . | 39 |
| Figura 9: Desenvolvimento embrionário de <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre os tegumentos de sementes naturais de <i>Canavalia rosea</i> . | 41 |
| Figura 10: Interferência do tegumento artificial de <i>Canavalia rosea</i> sobre os parâmetros de oviposição e penetração de larvas de <i>C. maculatus</i> . | 43 |
| Figura 11: Avaliação da interferência de tegumentos artificiais nos valores de massa e comprimento das larvas de <i>C. maculatus</i> . | 44 |
| Figura 12: Interferência de tegumentos artificiais de <i>C. rosea</i> na morfologia de larvas de <i>C. maculatus</i> de 20 DAO. | 45 |
| Figura 13: Espessura dos tegumentos de <i>V. unguiculata</i> e <i>C. rosea</i> . | 46 |
| Figura 14: Análise da interferência de tegumentos artificiais de <i>Canavalia rosea</i> na performance de <i>C. maculatus</i> . | 47 |
| Figura 15: Avaliação da interferência da espessura de tegumentos artificiais na sobrevivência de <i>C. maculatus</i> . | 48 |
| Figura 16: Avaliação da interferência da espessura de tegumentos artificiais na massa e tamanho das larvas de <i>C. maculatus</i> . | 49 |
| Figura 17: Avaliação da toxicidade de cotilédones de <i>Canavalia rosea</i> sobre | 51 |

os parâmetros de oviposição e penetração de *C. maculatus*.

| | |
|---|----|
| Figura 18: Interferência da ingestão de diferentes concentrações de cotilédones de <i>C. rosea</i> nos valores de massa e comprimento de larvas de <i>C. maculatus</i> . | 52 |
| Figura 19: Interferência da ingestão de diferentes concentrações de cotilédones de <i>C. rosea</i> na sobrevivência e no tamanho de larvas de <i>C. maculatus</i> . | 53 |
| Figura 20: Interferência das frações F0-70% e F70-90% sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de <i>C. maculatus</i> . | 54 |
| Figura 21: Análise da interferência das frações F0-70% e F70-90% na sobrevivência de larvas do <i>C. maculatus</i> . | 55 |
| Figura 22: Análise da interferência das frações F0-70% e F70-90% sobre os valores médios de massa das larvas do <i>C. maculatus</i> . | 56 |
| Figura 23: Perfil de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose das proteínas presentes na fração F0-70%. | 57 |
| Figura 24: Perfil de cromatografia de afinidade à quitina das proteínas presentes na fração F70-90%. | 58 |
| Figura 25: Visualização do perfil proteico em gel de eletroforese 12% das proteínas isoladas através de cromatografia. | 59 |
| Figura 26: Interferência das frações proteicas isoladas por cromatografia sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de <i>C. maculatus</i> . | 61 |
| Figura 27: Análise da interferência das frações obtidas por cromatografia na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de <i>C. maculatus</i> . | 62 |
| Figura 28: Quantificação de proteínas totais em larvas com 20 DAO. | 64 |
| Figura 29: Quantificação de glicose em larvas com 20 DAO. | 66 |
| Figura 30: Quantificação de triacilglicerois em larvas com 20 DAO. | 68 |
| Figura 31: Quantificação de colesterol em larvas com 20 DAO. | 70 |
| Figura 32: Quantificação da atividade de protease cisteínica em larvas com 20 DAO. | 72 |
| Figura 33: Quantificação da atividade de lipase em larvas com 20 DAO. | 74 |
| Figura 34: Quantificação da atividade de α -amilase em larvas com 20 DAO. | 76 |

Lista de Abreviaturas

| Abreviatura | Significado |
|-------------|--|
| 0,3 M DEAE | Fração obtida em cromatografia de troca iônica |
| °C | Graus Celsius |
| µm | Micrômetros |
| µL | Microlitros |
| µg | Micrograma |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> |
| APS | Persulfato de amônio |
| B.O.D | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| cm | Centímetro |
| cv | Cultivar |
| DAO | Dias após a oviposição |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| F0-70% | Fração precipitada em 0-70% em sulfato de amônia |
| F70-90% | Fração precipitada em 70-90% em sulfato de amônia |
| g | Gramma |
| <i>g</i> | Força da gravidade |
| h | Hora |
| HAE | Horas após a emergência |
| HAO | Horas após a oviposição |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| kDa | Kilo Daltons |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |

| | |
|-----------|---|
| MP | Membrana Peritrófica |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| N RET DEA | Fração não retida em cromatografia de troca iônica |
| Nm | Nanômetro |
| PBS | Tampão fosfato de sódio |
| PBST | Tampão fosfato de sódio contendo Tween 20 |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| RET QUIT | Fração retida em cromatografia de afinidade a quitina |
| rpm | Rotações por minuto |
| s | Segundo |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| Tris | 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| V | Volts |

RESUMO

O inseto *Callosobruchus maculatus* é a principal praga que ataca sementes do feijão *Vigna unguiculata* durante a estocagem. Esse ataque causa redução no peso e no poder germinativo das sementes, no valor nutricional e, conseqüentemente, no valor comercial dos grãos. Estudos que visam a identificação de compostos naturais tóxicos a esses insetos podem ser uma ferramenta futura para o controle dessas pragas, minimizando o uso de inseticidas. Algumas sementes não-hospedeiras, como as do gênero *Canavalia*, têm se mostrado excelentes fontes de compostos bioinseticidas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de sementes de *Canavalia rosea* para o inseto *C. maculatus*. Frações proteicas foram extraídas das sementes e isoladas por cromatografia de troca iônica e de afinidade à quitina. Os perfis proteicos foram visualizados por SDS-PAGE. Os efeitos tóxicos foram analisados através da infestação das sementes naturais e de sistema de sementes artificiais. Foram avaliados os parâmetros de desenvolvimento do inseto, incluindo a oviposição, eclosão, massa e comprimento das larvas e sobrevivência. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela marcação dos embriões com DAPI e observação por microscopia de fluorescência. As larvas sobreviventes foram submetidas à extração e a análises bioquímicas. Nossos resultados mostraram que sementes naturais de *C. rosea* foram tóxicas para o inseto. Os tegumentos naturais bloquearam 100% a penetração das larvas, porém o desenvolvimento embrionário não foi afetado. A farinha dos tegumentos apresentou toxicidade quando incorporada em tegumentos artificiais com diferentes espessuras. A farinha dos cotilédones e suas frações proteicas apresentaram alta toxicidade às larvas, causando reduções na massa e no comprimento das larvas, além de alta mortalidade. Proteínas da fração 70-90% foram capazes de se ligar a quitina, o que pode ser um indicador de um possível mecanismo de toxicidade. Foram observadas alterações na atividade de proteases cisteínicas, α -amilases e lipases e nos níveis de colesterol, triacilglicerois, proteínas e glicose em larvas de 20 DAO alimentadas com diferentes sementes artificiais testadas. Nossos resultados indicam que as sementes de *C. rosea* são ricas em compostos com atividades bioinseticidas. A identificação de compostos naturais com propriedades bioinseticidas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle de pragas mais sustentáveis.

ABSTRACT

The insect *Callosobruchus maculatus* is the main pest that attacks seeds of *Vigna unguiculata* during storage. This attack causes a reduction in the weight and germination power of the seeds, in their nutritional value and, consequently, in the commercial value of the grains. Studies that aim at the identification of natural toxic compounds to these insects may be a future tool for controlling these pests, minimizing the use of insecticides. Some non-host seeds, such as from the genus *Canavalia*, represent high sources of bioinsecticidal compounds. In this context, this work aimed to evaluate the toxicity of *Canavalia rosea* seeds to the insect *C. maculatus*. Protein fractions were extracted from seeds and isolated by ion exchange and chitin affinity chromatographies. Protein profiles were visualized by SDS-PAGE. The toxic effects were analyzed through the infestation of natural seeds and by artificial seed system. Insect development parameters were evaluated, including oviposition, larval hatching, larvae mass and length and survival. Embryonic development was assessed by marking the embryos with DAPI followed by observation under fluorescence microscopy. The surviving larvae were subjected to extraction and biochemical analyzes. Our results show that natural *C. rosea* seeds were toxic to the insect. The natural seed coat blocked 100% of the larval penetration, however the embryonic development was not affected. Seed coat flour was toxic when incorporated into thick artificial seed coat. Cotyledon flour and its protein fractions showed toxicity to the larvae, causing reductions in their mass and length and high mortality. Proteins from the 70- 90% fraction were able to bind to chitin, which may be an indicator of a possible toxicity mechanism. Alterations were observed in the activity of cysteine proteases, α -amylases and lipases and in the levels of cholesterol, triglycerides, proteins and glucose in 20 DAO larvae fed with artificial seeds containing different treatments. Our results indicate that *C. rosea* seeds are rich in compounds with bioinsecticidal activity. The identification of natural compounds with bioinsecticidal properties can assist in the development of more sustainable pest control strategies.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sementes

O grande sucesso das angiospermas com relação à dominância ecológica só foi possível devido à evolução da reprodução sexuada e da semente. A característica mais singular das angiospermas consiste no seu evento de dupla fertilização, seguido pelo desenvolvimento de uma semente envolta por um tecido materno, conhecido como tegumento. A proteção da semente é possibilitada através do fechamento do embrião em desenvolvimento, o que amplia as suas chances de atingir a maturidade, estabelecendo assim uma geração posterior. Esta característica é específica das angiospermas, não sendo apresentada por espécies oriundas de outros clados do Reino Vegetal (LAFON-PLACETTE & KOHLER, 2014; RADCHUK & BORISJUK, 2014).

A porção feminina que atua como estrutura progenitora da semente nas angiospermas é o óvulo, e este, depois de fecundado dará origem a um embrião, a um endosperma e ao revestimento da semente. O embrião é o resultado da fusão entre um núcleo polar e um núcleo de esperma, já o endosperma é desenvolvido a partir da fusão entre a oosfera de células polares e um segundo núcleo espermático para produzir (em espécies diploides) uma estrutura triploide. Por fim, o tegumento possui origem exclusivamente materna (ROSZAK; KÖHLER, 2011). Após ocorrer a fertilização, o desenvolvimento da semente dependerá de uma interação regulada entre o revestimento da semente, o embrião e o endosperma (LAFON-PLACETTE; KÖHLER, 2014).

O embrião é constituído pelo eixo embrionário e um ou mais cotilédones. Os cotilédones apresentam reservas nutritivas que garantem o desenvolvimento do embrião, representando um meio de sobrevivência destas espécies vegetais. Por este motivo, algumas sementes, como as de cereais e leguminosas, fornecem um alimento altamente nutritivo ao homem e a outros animais, sendo consideradas importantes fontes alimentares, por possuírem reservas de proteínas, amido e óleos, acumuladas durante o período de desenvolvimento e maturação (MOISE *et al.*, 2005; POWELL, 2009; BEWLEY *et al.*, 2012).

Pela grande e variada concentração de nutrientes, as sementes fazem parte da dieta preferencial de diversos organismos, incluindo pragas e patógenos, dentre eles, insetos herbívoros, correspondendo à parte da planta que mais recebe ataque de

Pragas. Por possuírem seu mecanismo de defesa baseado em proteções constitutivas, as sementes apresentam compostos químicos depositados em seus tegumentos e cotilédones desde o preenchimento dos grãos, sendo consideradas então, fontes ricas de compostos de defesa das plantas (XAVIER-FILHO, 1991).

1.1.1 Importância das sementes na alimentação

De acordo com a FAO (2019), aproximadamente 70% da alimentação humana é composta por cereais e leguminosas e os 30% restantes referem-se à ingestão de produtos de origem animal. A FAO estima ainda que são necessárias aproximadamente 300 milhões de toneladas de proteínas ao ano para manter a população atual, estimada em 7,70 bilhões de acordo com o World Bank Group (2019) e a Divisão de População da Organização das Nações Unidas (2019). A estimativa é que a população mundial alcance a marca de 7,79 bilhões até 2020 e a 8 bilhões de habitantes em 2023 (FAO, 2019; ONU, 2020).

Apesar da maior parte das proteínas provir de carne animal, desde meados dos anos 90, há uma tendência em se substituir as proteínas animais na alimentação por proteínas vegetais, por estas apresentarem uma melhor relação entre eficiência e custo, principalmente em países subdesenvolvidos. Em algumas leguminosas, por exemplo, as proteínas podem corresponder até 40% do peso seco de suas sementes (OERKE *et al.*, 1994; CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002.).

Sendo assim, sementes de leguminosas são consideradas altamente valiosas para a alimentação humana, correspondendo à principal fonte de proteína no mundo em desenvolvimento (ASIF *et al.*, 2013), principalmente para as populações de baixa renda em regiões subtropicais e tropicais onde culturas de feijão como o *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e a *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) representam importantes fontes de proteínas (20-25%), além de carboidratos (50-60%) e lipídios (1-2%) (MOURA *et al.*, 2007).

Devido ao melhor custo benefício da proteína vegetal utilizada para alimentação, o mercado nesta área tem crescido exponencialmente em todo o mundo, inclusive no Brasil. Segundo dados da FAO (2019), China, Estados Unidos, Brasil, Índia e Indonésia (citados por ordem de importância) são os países que mais contribuem para a produção mundial de grãos (FAO, 2019).

Estima-se que a produção de grãos no Brasil na safra 2019/20 chegue a 248 milhões de toneladas, o melhor resultado da história, de acordo com o 4º levantamento do Boletim da Safra de Grãos, divulgado em 08 de janeiro de 2020 pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). O resultado esperado divulgado aponta para um aumento de 2,5% ou 6,1 milhões de toneladas em relação à safra 2018/19 (CONAB, 2020).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2019), a cultura do feijão é uma das mais importantes para a alimentação da população brasileira, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor de feijão do mundo. De acordo com o Balanço de Oferta e Demanda da Conab, na safra de 2019/2020, o Brasil produziu 3,02 milhões de toneladas deste grão. Dentre as principais espécies de feijão cultivadas no Brasil, pode-se citar *Phaseolus vulgaris* (feijão comum), *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Cajanus cajan* (feijão-guandu). O Brasil, junto com Myanmar, Índia, Estados Unidos, México e Tanzânia são responsáveis por 56,99% do total de feijão produzido no mundo (FAO, 2019; CONAB, 2020).

Dentre as diferentes espécies de feijão cultivadas, as sementes de *Phaseolus vulgaris* e de *Vigna unguiculata* fornecem uma importante fonte de proteína vegetal para alimentação humana por possuírem baixo preço de produção e alto valor nutricional (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Essas sementes são consumidas principalmente por populações de baixa renda, especialmente em regiões da África, América Central e América do Sul. No Brasil, esses feijões são considerados os principais alimentos presentes na alimentação das populações, sendo *V. unguiculata* consumida principalmente nas regiões Norte e Nordeste (FAO, 2019).

1.1.2 Perda no cultivo de grãos

O cultivo de sementes de leguminosas pode ser afetado negativamente devido a diversos fatores, como por exemplo, a práticas agrônômicas aplicadas de forma indevida, mudanças climáticas e estresses abióticos e bióticos que podem ocorrer tanto no campo quanto no armazenamento. Dentre os estresses bióticos, destaca-se o ataque de pragas que se alimentam das sementes durante o período de armazenamento pós- colheita, em razão da grande concentração de nutrientes de reserva que estas apresentam (MISHRA *et al.*, 2018).

Dentre as pragas de grãos estocados, destacam-se os bruquídeos, sendo responsáveis pelas perdas mais severas no rendimento de grãos (TSIALTAS; IRAKLI; LAZARIDOU, 2018). O dano causado por insetos na pós-colheita é diverso, e varia de acordo com as espécies de bruquídeos e seus biótipos, além da cultura atacada (MISHRA *et al.*, 2018).

Representantes da ordem Coleoptera, família Chrysomelidae e sub família Bruchidae, os bruquídeos representam mais de 1700 espécies de 62 gêneros em todo o mundo. Aproximadamente 20 espécies de bruquídeos são conhecidas como pragas de sementes armazenadas em diversas culturas pelo mundo (ROMERO; JOHNSON, 2004).

Dentre as espécies mais estudadas de bruquídeos, destacam-se o *Callosobruchus chinensis* e o *Callosobruchus maculatus*, ambos responsáveis por severas perdas em culturas de feijão mungo (*Vigna radiata*) e de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (MAINA; MBAYA; MAILAFIYA, 2012; SOMTA *et al.*, 2007). Diferentes espécies de *Callosobruchus* causam danos às sementes de leguminosas que variam, em média, de 5 a 10% em locais de clima temperado e de 20 a 30% em países tropicais (KIRADOO; SRIVASTAVA, 2010). Durante a estocagem, em épocas de grandes infestações, podem causar também danos de até 100%, num período entre 3 e 6 meses (GBAYE; MILLARD; HOLLOWAY, 2011; WAR *et al.*, 2017).

As larvas destes insetos se desenvolvem no interior dos cotilédones das sementes, consumindo as suas reservas energéticas. Mais de uma larva pode se desenvolver dentro de um único grão e por este motivo e, devido às diversas adaptações desenvolvidas por esta praga, os prejuízos causados às sementes são severos. As perdas nas colheitas devido ao ataque de bruquídeos podem ser classificadas como diretas ou indiretas (TRIPATHY, 2016; BECK; BLUMER, 2011).

À medida que se alimentam dos cotilédones, danificam diretamente os grãos de leguminosas armazenados, reduzindo o seu valor nutricional, e impactando no valor comercial. Em geral, o ataque desta praga faz com que as sementes se tornem inadequadas para o consumo humano e inviáveis para plantio e comercialização. Além disso, o ataque aos cotilédones deixa as sementes suscetíveis a pragas e patógenos oportunistas, impactando negativamente na capacidade de germinação e no seu potencial de crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BECK; BLUMER, 2011; DE SÁ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2016).

Como forma de amenizar os prejuízos causados pelos ataques de bruquídeos na estocagem, os produtores recorrem à utilização de inseticidas fumegantes (KEDIA *et al.*, 2015; TRIPATHY, 2016). A fosfina é utilizada praticamente em todo o sistema de armazenagem de grãos para o controle de pragas. O produto, disponível em diversas marcas comerciais, é um inseticida à base de brometo de metila, ácido sulfúrico e ácido cianídrico, e forma uma substância letal que se decompõe quando em contato com o ar. Está disponível em forma de pastilhas, que são adicionadas nos locais de armazenamento de grãos, liberando um gás tóxico quando entra em contato com a umidade do ar. É eficiente em até 100% na mortalidade das pragas, com um período de segurança recomendado de quatro dias (EMBRAPA, 2019). Apesar de eficiente à curto prazo, essa prática é de difícil acesso para pequenos produtores, devido ao alto custo e aos possíveis riscos de toxicidade. A fosfina expõe os armazenadores e técnicos, que nem sempre estão preparados para efetuar a fumigação de forma segura. Há vários relatos de acidentes letais com intoxicações ou explosões. Além disso, após a exposição dos grãos às pastilhas de fosfina, estes precisam permanecer estocados por um período mínimo de uma semana para evitar acúmulo de resíduos químicos nos alimentos. A fumigação com fosfina possui ainda um alto risco de poluição ambiental (KEDIA *et al.*, 2015; TRIPATHY, 2016; WAR *et al.*, 2017).

Como forma de amenizar os efeitos causados pela utilização de pesticidas, métodos alternativos para o controle de *C. maculatus* têm sido estudados (BADII *et al.*, 2014).

1.2 *Callosobruchus maculatus*

A ordem Coleoptera é a que possui o maior número de membros dentro da classe dos Insetos, com aproximadamente 370 mil espécies descritas, o que corresponde a 40% de todos os insetos (CHAPMAN, 2013). Seus representantes são conhecidos popularmente como besouros e o termo “coleópteros” do grego “embainhados”, referem-se ao primeiro par de asas rígidas externas, denominadas élitros, responsáveis por proteger o segundo par membranoso de asas posteriores, utilizadas no voo (BRUSCA; BRUSCA, 2007; BECK; BLUMER, 2011; CHAPMAN, 2013). Acredita-se que o sucesso evolutivo de insetos dessa ordem possa estar

relacionado à presença dos élitros, que possibilitam a exploração de diferentes nichos ecológicos (CHAPMAN, 2013).

Pertencentes à ordem Coleoptera e à família Chrysomeloidae, *Callosobruchus* é um dos gêneros da subfamília Bruchinae (besouros de sementes). (BECK; BLUMER, 2011), sendo representado pelas principais pragas de grãos de leguminosas economicamente importantes. Este gênero inclui pelo menos 20 espécies, originárias principalmente da Ásia e da África, dentre as mais comuns, *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis*, *C. subinnotatus*, *C. analis* e *C. rhodesianus* (KEDIA *et al.*, 2013).

O *Callosobruchus maculatus* é um inseto agrícola oriundo da África e da Ásia e, atualmente, se espalha pelo mundo tropical e subtropical sendo considerado, por este motivo, uma praga cosmopolita. É a praga mais importante do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) durante o período de armazenamento e, por este motivo, esta espécie é conhecida popularmente como besouro-do-feijão ou gorgulho-do-caupi (BECK; BLUMER, 2011; KEDIA *et al.*, 2013). São responsáveis também pelo ataque de importantes espécies de leguminosas, como *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris* (DE SÁ *et al.*, 2018). A infestação ocorre majoritariamente nos grãos estocados, podendo ocorrer infestação cruzada, quando os *C. maculatus* atacam também as sementes no interior de suas vagens, no campo (GALLO *et al.*, 2002; WAR *et al.*, 2017).

Estes insetos possuem um corpo com aproximadamente 3 mm de comprimento, tórax com coloração preta, onde é possível se observar pubescências douradas e uma mancha em forma de “X” nos élitros. É possível observar dimorfismo sexual em sua fase adulta, onde as fêmeas são maiores que os machos (GALLO *et al.*, 2002).

1.2.1 Ciclo de vida do *Callosobruchus maculatus*

Após a inseminação, as fêmeas adultas ovipositam sobre os tegumentos de sementes. Os ovos, de aproximadamente 0,75 mm são ovais ou fusos, possuem coloração clara e brilhante e ficam aderidos firmemente à superfície do tegumento. Após a embriogênese, período com duração máxima de seis dias, a larva de 1º instar eclode o ovo, penetrando o tegumento e chegando ao cotilédone da semente sem sair

da proteção do ovo. À medida que a larva escava os cotilédones para se alimentar, o ovo adquire uma coloração branca opaca devido à deposição de farinha dos cotilédones. Em algumas situações, é possível observar também a presença de manchas, devido ao preenchimento com resíduos de fezes das larvas (BECK; BLUMER, 2011).

Todo o desenvolvimento pós-embriogênese é dado nos cotilédones das sementes onde, após consumi-los, as larvas crescem e passam pelo período de pupação, sofrendo progressivamente um processo de esclerotização. Nos últimos estágios de pupação, é possível observar vestígios de asas, patas e olhos (BASTOS, 1981; DE SÁ *et al.*, 2014).

Durante o período de pupação, ocorre a metamorfose completa da larva para o adulto. Embora o tegumento da semente ainda permaneça intacto, é possível observar uma janela redonda entre 1-2 mm no local em que o besouro está em fase de pupação. Após um período aproximado de 25 dias após a oviposição (DAO), os insetos adultos mastigam o tegumento e emergem para o exterior das sementes (BECK; BLUMER, 2011).

Após a emergência, os adultos de *C. maculatus* não precisam de comida ou água. Os adultos estarão completamente maduros entre 24 e 36 horas após sua emergência. Os machos procuram as fêmeas para inseminar e as fêmeas armazenam esperma viável em sua espermateca, estrutura presente no aparelho reprodutor feminino para armazenar espermatozoides. Após a cópula, o ciclo de vida do *C. maculatus* é reiniciado através da oviposição. Uma fêmea adulta é capaz de colocar até 100 ovos durante a sua vida adulta, que varia entre 1 e 2 semanas. (EADY, 1991; BECK; BLUMER, 2011).

1.2.2 Eventos do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*

Após a oviposição das fêmeas de *C. maculatus* nos tegumentos de sementes, inicia-se a divisão do núcleo zigótico. Cada núcleo filho dará origem a um energídeo. Os núcleos se tornarão muito próximos uns dos outros, consequência das sucessivas divisões dos energídeos, formando o estágio de blastoderma sincicial. A formação de uma membrana plasmática ao redor de cada núcleo do blastoderma sincicial dará origem ao blastoderma celular (DE SÁ, 2017).

Uma vez formado o blastoderma celular, período de 12 a 16 horas após a oviposição, os eventos de gastrulação (evidenciado pela formação do mesoderma, ectoderma e endoderma), e o posicionamento das células (que originarão a banda germinal) e das membranas extra-embrionárias (serosa e âmnion) ocorrerão simultaneamente (GILBERT; BARRESI, 2013). Na região ventral do ovo, a banda germinal dará origem ao futuro embrião, enquanto o restante do blastoderma dará origem às membranas extra-embrionárias (GILLOTT, 2005; CHAPMAN, 2013; DE SÁ, 2017).

Durante a formação da banda germinal, entre 20 e 24 HAO, inicia-se nos embriões um processo denominado extensão da banda germinal (DE SÁ *et al.*, 2014), um evento comum durante a embriogênese de insetos, que se caracteriza pela extensão da região posterior do embrião em direção à sua região anterior até quase tocar o lobo cefálico. À medida que a banda germinal vai se estendendo, os segmentos cefálicos, torácicos e abdominais vão se tornando mais definidos (Figura 1) (GILLOTT, 2005; CHAPMAN, 2013).

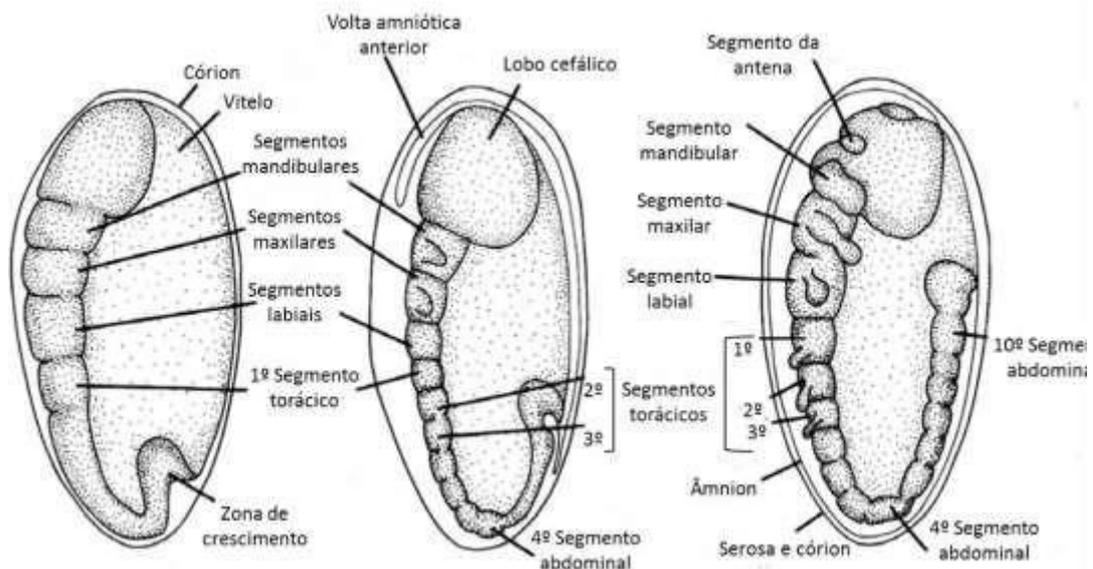


Figura 1: Estágios de extensão e segmentação da banda germinal. Representação dos estágios de extensão e segmentação da banda germinal em *Bruchidius obtectus* com 48, 52 e 72 horas de desenvolvimento embrionário (DE SÁ, 2017).

No período entre 24 a 28 HAO, os embriões encontram-se em transição entre as fases de extensão e retração da banda germinal (DE SÁ *et al.*, 2014). Na fase de retração da banda germinal, a região posterior que havia crescido em direção à região anterior, retorna à sua posição original (Figura 2) (GILLOTT, 2005; CHAPMAN, 2013).

A retração da banda germinal será concluída no período entre 36 e 52 HAO e o processo de alongamento e retração da banda germinal é caracterizado pela definição dos segmentos embrionários e pelo aparecimento de apêndices de patas (Figura 2) (DE SÁ *et al.*, 2014). Entre 60 e 76 HAO os embriões encontram-se no estágio de fechamento dorsal, quando as células da gema na região dorsal são cobertas por células embrionárias. Durante este evento, os apêndices de patas e os segmentos ventrais ficam completamente evidentes. O fechamento dorsal completo ocorrerá entre 84 e 88 HAO (Figura 2) (DE SÁ *et al.*, 2014).

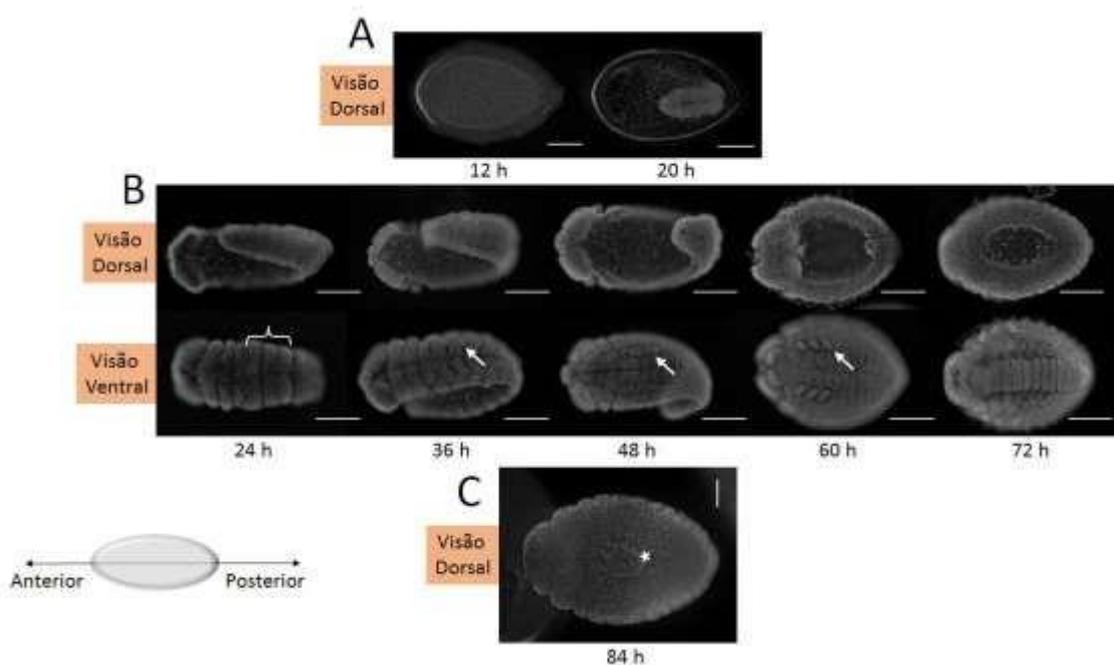


Figura 2: Desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes de *Vigna unguiculata*. Microscopia ótica de fluorescência (DAPI) do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*. Os tempos em h indicam horas após a oviposição (HAO). **A:** visão dorsal dos embriões de 12 e 20 HAO dentro dos ovos; **B:** visão dorsal e ventral de embriões de 24 a 72 HAO fora dos ovos; **C:** visão dorsal de um embrião de 84 HAO fora do ovo. Chaves brancas destacam os segmentos torácicos, setas brancas apontam os apêndices de patas e a estrela branca indica uma pequena parte do vitelo ainda exposta ao final do fechamento dorsal. Barra de escala = 50 μ m (DE SÁ, 2017).

Em um período aproximado de 5 dias após a oviposição (DAO), ocorre o fim da embriogênese, momento em que a larva eclodirá do ovo, penetrando os tegumentos e cotilédones das sementes (DE SÁ *et al.*, 2014).

1.2.3 Desenvolvimento pós-embrionário

De uma forma geral, os insetos podem ser considerados ametábolos, hemimetábolos ou holometábolos, de acordo com o seu desenvolvimento. Em insetos holometábolos a larva e o adulto diferenciam-se morfologicamente e, entre essas duas fases, apresentam um estágio de pupa, que ocorrerá especificamente entre o último estágio larval (4º ínstar) e a fase adulta. A pupa é uma das características marcantes do desenvolvimento de insetos holometabólicos e, dentre outras ordens, ocorre em Coleópteras (CHAPMAN, 2013).

Após o período de embriogênese, o desenvolvimento de *C. maculatus* pode ser dividido em sete instares: o 1º ocorre até o 9º dia após a oviposição (DAO); o 2º entre os 10º e 13º DAO; o 3º instar, entre os 14º e 17º DAO; o 4º, entre o 18º e 20º DAO; a pré-pupa, aos 21 DAO; a pupa, aos 24 DAO; e, finalmente, a fase adulta. Entre os estágios de pupa e adulto, o inseto não se alimenta. Sendo assim, é somente no estágio larval que ocorrem os processos de digestão e absorção de nutrientes, com pico de atividade no 3º instar (CHI *et al.*, 2009; DE SÁ *et al.*, 2014).

Durante os estágios de desenvolvimento larval em insetos holometábolos ocorre a estocagem de nutrientes, que serão utilizados posteriormente nos processos de metamorfose (entre os estágios de pupa e adulto) e servirão como reserva energética e nutritiva para os insetos na fase adulta (MIRTH; RIDDIFORD, 2007).

Dentre as macromoléculas envolvidas durante a estocagem de nutrientes, destacam-se os lipídeos, sendo consideradas as mais importantes para os insetos. Devido à alta demanda energética necessária para os processos de metamorfose, são essenciais para o crescimento, reprodução e para o provimento da energia necessária durante os longos períodos de jejum (HAHN; DENLINGER, 2007). As reservas energéticas de lipídeos, em alguns insetos, correspondem a mais da metade de seu peso seco. A maior parte é estocada na forma de triacilgliceróis, nos adipócitos, normalmente sintetizados a partir de carboidratos obtidos na dieta (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006).

Os carboidratos, por sua vez, incluindo açúcares simples, amido e outros polissacarídeos, são utilizados para a manutenção do metabolismo energético (durante as fases de pupa e adulta), para a síntese de quitina e no processo de voo (KAUFMANN; BROWN, 2008).

1.2.4 Processos digestivos em insetos

O intestino dos insetos é formado basicamente por um canal alimentar que percorre todo o corpo, indo da boca em direção ao ânus, sendo dividido em três porções: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Figura 3) (DOW, 1987; CHAPMAN, 2013). As associações entre insetos e plantas são tão diversificadas que, entre os diferentes tipos de insetos, existem variações entre a composição alimentar, as estruturas presentes no trato digestivo e as enzimas secretadas (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003).

A porção do intestino médio compreende um tubo simples e é nela que se concentram os processos de digestão e absorção de nutrientes, correspondendo à porção mais importante do trato intestinal (DOW, 1987; CHAPMAN, 2013).

Em algumas espécies de insetos, o intestino médio é revestido internamente por uma membrana acelular formada majoritariamente por quitina e proteínas, denominada membrana peritrófica (MP) (Figura 3). Sua principal função é separar o conteúdo do lúmen intestinal das células epiteliais do intestino médio de algumas espécies de insetos, protegendo estas células da abrasão mecânica ou química de alimentos e da penetração de microrganismos presentes nestes. É responsável também pela reciclagem das enzimas digestivas dos insetos (TERRA, 2001; WANG; GRANADOS, 2001; HEGEDUS *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos descrevem a presença de uma variação da membrana peritrófica em intestino de bruquídeos, como *C. maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. Nestes insetos, foi indicada a presença de um gel, denominado gel peritrófico no revestimento do intestino médio. Apesar de ser composto também por quitina e proteínas, esse gel se diferencia da membrana peritrófica, por não possuir resistência mecânica, além de apresentar diferenças referentes a permeabilidade (TERRA, 2001).

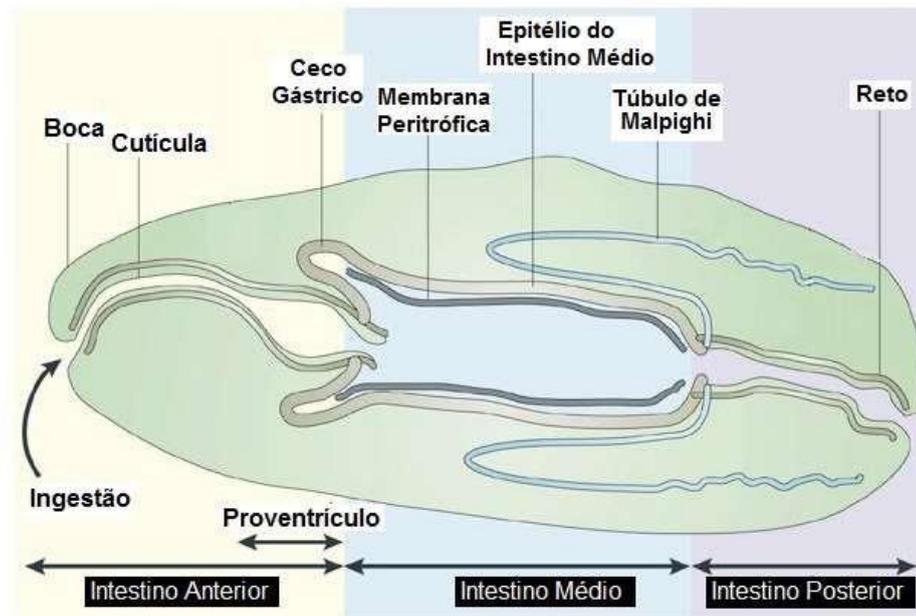


Figura 3: Canal alimentar de insetos. Esquema representativo do canal alimentar de insetos, indicando as porções principais (intestinos anterior, médio e posterior) e a presença da membrana peritrófica (Adaptado de VALLET-GELY; LEMAITRE; BOCCARD, 2008).

Nos insetos, os aminoácidos essenciais são obtidos através da digestão de proteínas ingeridas na alimentação. Ao alimentar-se de sementes de leguminosas, o processo digestivo de muitas espécies de insetos é regulado pela ação de proteases que promovem a quebra das proteínas, gerando aminoácidos livres essenciais (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015).

Apesar de não serem consideradas enzimas digestivas principais, carboidrases como α -glucosidases e amilases, também desempenham um importante papel na digestão de insetos bruquídeos e diversos trabalhos mostram seus potenciais para o controle de pragas (LEMOS *et al.*, 1990; PEDRA *et al.*, 2003; DE SÁ *et al.*, 2014; DE SÁ *et al.*, 2018).

1.3 Mecanismos naturais de defesa das sementes

As plantas terrestres correspondem a uma fonte nutricional para mais de um milhão de espécies de insetos pertencentes a diversos grupos taxonômicos. Estes insetos utilizam variadas estratégias ao se alimentarem, a fim de obter nutrientes de todas as partes da planta, tanto das partes acima quanto abaixo do solo (HOWE & JANDER, 2008).

Em resposta à herbivoria, como forma de se protegerem contra o ataque de insetos, as plantas evoluíram uma variedade de mecanismos de defesas. A relação inseto-planta resultou, então, em uma coevolução onde ambos desenvolveram diversos aspectos para se defenderem uns dos outros (AGRAWALL, 2000; HARUTA *et al.*, 2001; HOWE & JANDER, 2008).

De uma maneira geral, os mecanismos de defesa das plantas podem ser classificados em defesas induzidas ou defesas constitutivas. Classifica-se como defesa induzida a indução direta da síntese de compostos tóxicos, iniciada a partir do ataque de pragas e patógenos. As defesas constitutivas podem ser definidas como estruturas e/ou compostos tóxicos que estão presentes na composição da planta, independentes do ataque de pragas e patógenos (SILVA; XAVIER-FILHO 1991; AGRAWAL, 1999). Uma extensa diversidade de compostos defensivos pode se concentrar constitutivamente em tecidos de sementes conferindo resistência contra diversos tipos de predadores (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002).

As sementes quiescentes, por estarem em pausa metabólica, não possuem capacidade de disparar resposta de defesas induzidas ao serem atacadas pelos agressores e, por isso, desenvolveram mecanismos de defesa constitutivos. A maioria desse tipo de defesa é concentrada nas sementes, já que estas são os veículos de propagação e sobrevivência das espécies, além de serem principais alvos de ataque, devido à sua grande reserva energética. Sendo assim, sementes maduras já contêm naturalmente defesas constitutivas com o objetivo de reduzir os possíveis ataques dos agressores (HARUTA *et al.*, 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002).

As defesas constitutivas das sementes podem basear-se em defesas físicas, onde a espessura e a dureza de tegumentos podem funcionar como barreiras ao ataque de insetos, ou em defesas químicas, onde a presença de moléculas tóxicas tanto em tegumentos como em cotilédones protegem as sementes contra os ataques de pragas (SILVA; XAVIER-FILHO, 1993).

Diversas publicações apontam o estudo do envolvimento de proteínas vegetais como mecanismos de defesa das plantas, como as arcelinas (BLAIR *et al.*, 2010), as quitinases (COELHO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018), as canatoxinas (OLIVEIRA *et al.*, 1999; FOLLMER *et al.*, 2001; MULINARI *et al.*, 2011), as vicilinas (MACEDO *et al.*, 1993; SALES *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2008; ALEXANDRE *et al.*, 2011), as lectinas (NUNES *et al.*, 2015), proteínas inativadoras de ribossomos

(RIPs) dos tipos 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas e glicohidrolases (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

1.3.1 Defesas constitutivas relacionadas ao tegumento de sementes

O tegumento, revestimento externo das sementes, possui origem materna, sendo formado pelas transformações do envoltório do óvulo. Possui morfologia extremamente diversa entre diferentes espécies, apresentando variações em relação à textura, espessura, dureza, coloração e porosidade (MOISE *et al.*, 2005).

Este tecido é a primeira barreira protetora da semente contra a penetração de insetos, sendo de extrema importância para a preservação do embrião (SOUZA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016; DE SÁ *et al.*, 2018). Suas funções também se relacionam ao direcionamento de nutrientes para o tecido meristemático, controle de processos de dormência e germinação, controle de absorção de água e promoção de trocas gasosas entre os meios interno e externo das sementes (BEWLEY, 1997; WEBER; BORISJUK; WOBUS, 2005).

Apesar de diversos estudos indicarem os tegumentos como defesa predominantemente física nas sementes, a partir da década de 70 vários estudos investigaram a interferência de compostos químicos de tegumentos no desenvolvimento de bruquídeos. Em 1977, Janzen mostrou a relação entre a espessura de tegumentos e a sobrevivência de larvas de *C. maculatus* em 73 espécies de sementes, concluindo que a espessura não era determinante para a sobrevivência do inseto e sugerindo que a presença de compostos químicos estaria relacionada à toxicidade deste tecido para o *C. maculatus* (JANZEN, 1977).

Durante a predação das sementes por bruquídeos, os tegumentos são a primeira parte a ser atacada. Alguns aspectos de desenvolvimento do inseto podem ser bastante afetados pelas propriedades tóxicas desse tecido; sendo assim, a capacidade desse tecido em impedir ou retardar a penetração de insetos após a embriogênese é fundamental para o sucesso de processos de defesas constitutivas em sementes (SILVA *et al.*, 2016).

Alguns estudos com sementes não hospedeiras de *C. maculatus* mostraram que as larvas morrem durante a penetração do tegumento, confirmando que este

tecido é uma barreira eficaz contra a penetração desses insetos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011; DE SÁ *et al.*, 2014).

Pesquisas realizadas por nosso grupo de estudo mostraram que proteínas do tipo vicilina (proteínas de armazenamento 7S) estão presentes como constituintes de tegumentos de sementes de *C. ensiformis*, *A. lebeck*, *P. vulgaris* e *P. lunatus* e mostraram-se tóxicas para as larvas de *C. maculatus* (OLIVEIRA *et al.*, 1999; MORAES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2012). De Sá *et al.* (2018) mostraram que os tegumentos de *C. ensiformis* são determinantes para a resistência que as sementes apresentam para o inseto, bloqueando em 100% a penetração das larvas.

1.2.2 Proteínas com afinidade a quitina

Diversos estudos sugerem que o mecanismo de toxicidade de compostos de sementes para o desenvolvimento de *C. maculatus* esteja relacionado à capacidade de se ligarem e/ou degradarem a matriz de quitina, polímero de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina que reveste o trato intestinal de insetos e à capacidade de inibirem algumas enzimas digestivas (YUNES *et al.*, 1998; MOURA *et al.*, 2007; DE SÁ *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

As vicilinas (globulinas de armazenamento 7S) são proteínas multifuncionais e receberam destaque em algumas pesquisas devido às suas propriedades antimicrobianas e inseticidas, bem como outras atividades (BÄUMLEIN *et al.*, 1995; BRAUN *et al.*, 1996; CHUNG; NEUMANN; POLYA, 1997; GOMES *et al.*, 1997; SHUTOV *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2003; MANNERS, 2007; MARCUS; GOULTER; MANNERS, 2008; PAES *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos mostraram que vicilinas isoladas de diferentes sementes de leguminosas, quando incorporadas na dieta de insetos, afetaram seu desenvolvimento, levando à diminuição no crescimento das larvas e ao aumento da mortalidade. Os resultados indicam que a toxicidade destas proteínas está relacionada a sua afinidade à quitina presente na matriz peritrófica / gel peritrófico do intestino de insetos (YUNES *et al.*, 1998; MOTA *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2007; PAES *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Oliveira *et al.* (2014) mostram ainda correlação entre a afinidade de vicilinas à quitina e a resistência à proteólise por peptidases digestivas em *C. maculatus* no processo de toxicidade destas proteínas. Foi demonstrado também que as vicilinas são o principal fator de resistência de cultivares de *Vigna unguiculata* resistentes a *Callosobruchus maculatus* (MACEDO *et al.*, 1993; SALES *et al.*, 2001). Todos esses trabalhos sugerem que as propriedades tóxicas dessas proteínas de armazenamento possam estar relacionadas a interações com glicoproteínas e outros constituintes da membrana peritrófica. Após a interação com a membrana, parte dessas vicilinas podem ainda ser absorvidas pelo epitélio intestinal, atingindo o ambiente interno das larvas (UCHOA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As quitinases são glicosil hidrolases que atuam na degradação da ligação β -1,4-glicosídica entre resíduos de *N*-acetilglucosaminas de quitina. Proteínas do tipo quitinase tem suas toxicidades a insetos associadas à degradação da membrana peritrófica ou gel peritrófico do intestino de insetos (SILVA *et al.*, 2018). Em plantas, estas enzimas estão relacionadas ao mecanismo de defesa contra ataques de pragas e patógenos (SANTOS *et al.*, 2007). Alguns trabalhos relatam ainda a importância das quitinases na degradação da parede celular de fungos, também composta por quitina. Gomes *et al.* (1996) mostram a toxicidade de uma quitinase isolada de sementes de *Vigna unguiculata* a fungos fitopatogênicos e ao bruquídeo *C. maculatus*. A incorporação de quitinases isoladas de tegumentos de sementes de soja na dieta de *C. maculatus* afetou o desenvolvimento das larvas e sua sobrevivência, causando 90% de mortalidade (SILVA *et al.*, 2018).

Trabalhos com sementes do gênero *Canavalia*, como a *Canavalia ensiformis*, conhecida popularmente como feijão-de-porco, mostraram que essas sementes possuem uma grande variedade de compostos, como proteínas, altamente tóxicos para bruquídeos (OLIVEIRA, *et al.*, 1999; FOLLMER *et al.*, 2001; MULINARI *et al.*, 2011; DE SÁ *et al.*, 2018). Os efeitos de sementes do gênero *Canavalia* sobre a oviposição, desenvolvimento embrionário e larval e penetração de *C. maculatus* mostram o alto potencial tóxico que sementes desse gênero apresentam (OLIVEIRA *et al.*, 1999; DE SÁ *et al.*, 2018). Entretanto, dentro desse gênero pouco se estudou sobre outras espécies, como por exemplo, a *Canavalia rosea*, sendo desconhecida a toxicidade que essas sementes apresentam para bruquídeos.

1.4 *Canavalia rosea*

Representante da família Fabaceae, a *Canavalia rosea* (Sw.) DC. é uma videira perene, cujo nome do gênero refere-se a uma derivação latinizada de 'Kanavali', que significa 'escalador da floresta' e 'erva de escalada' (AUSTIN, 2004). Já seu nome específico, refere-se ao latim 'roseus', que significa 'rosado', em referência à coloração de suas flores (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). Apresenta variados sinônimos heterotípicos como *Canavalia maritima* (Aubl.) Thouars, *Canavalia obtusifolia* (Lam.), *Canavalia apiculata* (Piper), *Canavalia arenicola* (Piper), *Dolichos littoralis* (Vell.), *Dolichos maritimus* (Aubl.), *Dolichos emarginatus* (Jacq.) e *Dolichos roseus* (Sw.). Dentre as nomenclaturas vernaculares, em inglês pode ser citada como 'beach bean', 'baybean' e 'seaside'; no Brasil é conhecida como 'feijão de praia'; na Costa Rica e no México como 'frijol-de-la-playa', dentre tantos outros. (VANTAPARAST, 2010; MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014; BFG, 2015; SNAK, 2020).

A *Canavalia rosea* é conhecida por fazer parte do grupo de "plantas pantropicais derivadas do mar" (TAKAYAMA *et al.* 2008). Dentre os habitats típicos desta espécie, podem-se citar as praias, o litoral acima da maré alta e as dunas frontais ou foredunas. Pode ocorrer ocasionalmente perto de lagoas costeiras ou, ainda, em estradas. É frequentemente encontrada associada a outro tipo de videira pantropical, a *Ipomoea pes-caprae* (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). A *C. rosea* é considerada uma colonizadora extremamente bem-sucedida, sendo uma das plantas costeiras mais comuns e difundidas, ocorrendo em áreas de litorais dos cinco continentes e também em muitas ilhas (TAKAYAMA *et al.*, 2008; MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014; MOHAJER *et al.*, 2017). No Brasil, é encontrada em cidades litorâneas das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste e em ilhas oceânicas, como Fernando de Noronha e Trindade. Aparece nos domínios fitogeográficos da Amazônia e Mata Atlântica (BFG, 2015; SNAK, 2020).

Acredita-se que a *C. rosea* se tornou uma pioneira pantropical em decorrência da dispersão em longas distâncias de suas sementes que, ao atingirem a maturação, são arremessadas com intensidade para fora de suas vagens e, em contato com a areia na costa, alcançam as correntes oceânicas (VATANPARAST *et al.*, 2011). Devido ao seu baixo peso, à presença de espaços contendo ar em seu

interior e à capacidade de permanecer impermeável na água durante anos, são capazes de flutuar pelos oceanos, percorrendo longas distâncias geográficas (THIEL; GUTOW, 2005). Germinam ao atingirem as margens litorâneas, iniciando um novo processo de colonização. Possuem, ainda, adaptações únicas para o ambiente que colonizam, como a capacidade de tolerar a alta salinidade do solo e da água e o enterramento na areia (MATOS *et al.*, 2004; GALLEGO-FERNÁNDEZ; MARTÍNEZ, 2011). São capazes também de crescer e se desenvolver em locais com baixo teor de matéria orgânica e de nutrientes e em altas temperaturas (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014).

Canavalia rosea desempenha um importante papel na geomorfologia das praias e dunas frontais, sendo considerada parte de um conjunto funcional de plantas costeiras tropicais. Por atuar como colonizadora de areia, cobre grandes áreas e seu rápido crescimento permite, inclusive, a cobertura de dunas móveis. Sua densa cobertura reduz o impacto direto do vento e das ondas na areia, além de amenizar o impacto das tempestades; suas raízes ligam os substratos impedindo que a areia se desloque. Formam, então, um tapete contínuo que estabiliza o substrato arenoso em que esta planta cresce, sendo extremamente importante para o controle da erosão costeira (SEENA; SRIDHAR, 2006; MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014). Possui importância econômica diversificada, sendo utilizada em processos de paisagismo, em jardins à beira-mar, pela sua capacidade de crescer rapidamente e de conservar dunas de areia, formando jardins densos e esteticamente atraentes. (D’CUNHA; SRIDHAR, 2011). Devido ao seu alto teor de proteínas nas folhas, flores e sementes, a *C. rosea* é utilizada como adubo verde na Índia e na alimentação de gados na África e no Sudeste Asiático (MATOS *et al.*, 2004).

Alegam-se a *C. rosea* diversas propriedades medicinais (medicina popular), sendo utilizada no tratamento de tuberculose, de intoxicação por peixes, dores, reumatismo e hanseníase. Atua ainda no tratamento de queimaduras, no estancamento de sangramentos e no combate de infecções causadas por algumas bactérias gram-positivas. Verificou-se ainda que *C. rosea* é considerada citotóxica para vírus, bactérias, fungos, células de câncer cervical e hepático, podendo ainda atuar no tratamento para diminuir os níveis de açúcar no sangue (MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014).

Suas sementes fornecem uma fonte alternativa de nutrição por possuírem elevados níveis de proteínas, aminoácidos essenciais e baixos níveis de fatores

antinutricionais. Em análise bioquímica, verificou-se que os valores proteicos e energéticos de suas sementes são superiores aos valores apresentados por culturas de grãos comumente utilizados na alimentação. Os valores de carboidratos e ácidos graxos encontrados foram superiores com relação aos da soja. Os valores de aminoácidos essenciais como fenilalanina e lisina encontrados na análise mostraram-se superiores aos padrões de referência da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SEENA; SRIDHAR; RAMESH, 2005).

Há relato da utilização de sementes de *Canavalia rosea* na alimentação desde 1771, sendo consumidas por povos indígenas na Austrália, África e Sudeste Asiático. As vagens e sementes jovens são comestíveis; as maduras necessitam ser embebidas para retirada de toxinas, descascadas, cozidas ou assadas. Podem ser, ainda, torradas e moídas, sendo seu pó utilizado como substituto do café (SEENA; SRIDHAR, 2006; MENDOZA-GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; LITHGOW, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de tegumentos e cotilédones de sementes de *Canavalia rosea* sobre o desenvolvimento do inseto *Callosobruchus maculatus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de oviposição, eclosão larval, desenvolvimento larval e emergência de adultos de *C. maculatus* infestando sementes naturais de *C. rosea*;
- Avaliar o desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus* sobre tegumentos de sementes naturais de *C. rosea*;
- Avaliar os efeitos de tegumentos artificiais e naturais de *C. rosea* sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*;
- Isolar frações proteicas de cotilédones de *C. rosea* e avaliar a toxicidade sobre o desenvolvimento do inseto;
- Avaliar as alterações nos padrões bioquímicos e no processo digestivo das larvas alimentadas com as farinhas e frações proteicas de *C. rosea*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sementes

As sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) foram obtidas comercialmente na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ.

As sementes de *Canavalia rosea* foram coletadas no litoral da Praia de Manguinhos, São Francisco do Itabapoana, RJ.

Todas as sementes foram acondicionadas em frascos de vidro, fechados e mantidos à temperatura de -70 °C.

3.2 Insetos

Os insetos *Callosobruchus maculatus* foram obtidos através de uma colônia mantida no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos localizado no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Para a manutenção da colônia, sementes hospedeiras de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) foram infestadas por 24 h com fêmeas de 48 horas após a emergência (HAE). As sementes infestadas foram armazenadas em frascos de vidro vedados com tampas perfuradas, mantidos no escuro à temperatura de 28 °C e umidade relativa entre 60-80% em estufas incubadoras B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). A cada novo ciclo de vida do inseto (período entre 25 e 30 dias), os insetos adultos emergidos foram utilizados para infestação de novas sementes e para a infestação dos experimentos.

3.3 Caracterização morfológica das sementes

Para verificação da espessura dos tegumentos das sementes de *C. rosea* e *V. unguiculata*, 10 sementes de cada espécie foram descascadas e 20 fragmentos de tegumentos foram reservados de forma aleatória para as medições. Os pedaços de tecido foram submetidos à análise da espessura utilizando um micrômetro digital eletrônico Marathon com faixa de detecção entre 0-25 mm, conforme metodologia descrita por Cruz *et al.* (2016).

3.4 Infestação das sementes

Sementes naturais de *C. rosea* foram infestadas com fêmeas de *C. maculatus* (com 48 h de idade), na proporção de 3 fêmeas por semente, durante 24 h, a 28 °C e umidade relativa entre 60-80% em estufas do tipo B.O.D. Após o período de infestação, as fêmeas de *C. maculatus* foram descartadas e os ovos postos foram contabilizados com o auxílio de um estereoscópio. A eclosão larval foi monitorada pelo período máximo de 7 DAO (dias após a oviposição) e o desenvolvimento larval foi monitorado pelo período máximo de 16 DAO. A emergência de insetos adultos foi monitorada durante o período de 25 a 40 DAO.

O efeito da toxicidade foi definido através do comparativo dos parâmetros de desenvolvimento do inseto infestando a semente hospedeira de *V. unguiculata* (cv. fradinho) e as sementes de *C. rosea*.

3.5 Análise morfológica do desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus*

A análise morfológica do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* em sementes de naturais de *C. rosea* foi realizada através da marcação dos embriões com DAPI, de acordo com metodologia descrita por De Sá *et al.* (2014).

Aproximadamente 400 g de sementes de *V. unguiculata* e *C. rosea* foram infestadas com fêmeas de 48 h de idade durante o período de 4 h, em estufa incubadora B.O.D. a 28 °C.

Nos tempos de 24, 48, 60 e 72 HAO (horas após a oviposição) retirou-se aproximadamente 100 g de sementes de *V. unguiculata* e *C. rosea* dispondo-as em frascos de vidro contendo 100 mL de cloro comercial (hipoclorito de sódio 4,3-5%). O frasco foi agitado suavemente por 30 s para facilitar o descolamento dos ovos da superfície dos tegumentos. Os ovos foram recuperados utilizando-se uma peneira Falcon® Cell Strainer de 70 µm. O procedimento foi repetido por 3 vezes. Os ovos presentes na peneira foram recuperados e colocados em uma solução fixadora contendo 3,8 mL de tampão PBST (fosfato de sódio 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,6), 1,2 mL de formaldeído 37% e 5 mL de heptano. A mistura foi agitada em uma plataforma rotatória com velocidade de 220 rpm durante o período de 1 h. Após a

agitação, a solução descansou por 5 min, formando duas diferentes fases. A fase inferior foi retirada com o auxílio de uma pipeta e a ela foi adicionado um volume de 8 mL de metanol resfriado a - 70 °C. A mistura foi agitada manualmente de forma vigorosa por 40 segundos. Após a formação de duas fases mediante repouso de 5 min, os ovos foram retirados, dispostos em microtubos de 1,5 mL, e lavados com 300 µL de metanol por três vezes seguidas. Os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido por 10 s, seguido de vigorosa agitação manual por 10 s. O procedimento foi repetido duas vezes para possibilitar a remoção da casca do ovo dos embriões fixados.

Os embriões foram reidratados pela substituição gradual do volume de metanol pelo tampão PBST (250, 500 e 750 µL). Os ovos foram lavados mais três vezes com 1000 µL de tampão PBST.

Uma solução de DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) foi preparada utilizando-se 5 mg/mL em PBST. Uma alíquota de 15 µL foi adicionada aos embriões e os microtubos foram agitados levemente por 15 min em uma plataforma rotatória para possibilitar a marcação, seguido de descanso em banho de gelo por 15 min. Os embriões corados foram lavados três vezes seguidas com 1000 µL de tampão PBST. Após a lavagem, retirou-se 500 µL de PBST e adicionou-se 500 µL de glicerol para o preparo das lâminas para análise dos embriões em microscopia de fluorescência (comprimento de onda do filtro de excitação de 405 nm).

3.6 Extração proteica dos cotilédones de *Canavalia rosea*

Sementes de *C. rosea* foram descascadas, os cotilédones foram macerados com auxílio de gral e pistilo, até a obtenção de uma fina farinha. As proteínas da farinha dos cotilédones foram extraídas na proporção de 1:10 em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 0,5 M, pH 7,6) por 1 h a 4 °C, sob agitação. O extrato foi centrifugado a 10.000 x *g* a 4 °C por 20 minutos, o sobrenadante foi filtrado e submetido a precipitação, com saturação de 0-70% com sulfato de amônio. Após repouso *overnight* a 4 °C, o extrato foi centrifugado por 20 min a 10.000 x *g* a 4 °C. O precipitado foi dissolvido em PBS, dialisado contra água destilada por 72 h e liofilizado, dando origem à fração denominada F0-70%, que foi armazenada à temperatura de - 20 °C e utilizada em experimentos posteriores. O sobrenadante foi submetido

a precipitação com sulfato de amônio, com saturação de 70-90% e após repouso *overnight* a 4 °C, o extrato foi centrifugado novamente por 20 min a 10.000 x g com temperatura de 4 °C. O precipitado foi dissolvido em PBS, dialisado contra água destilada por 72 h e liofilizado, dando origem à fração denominada F70-90% que foi armazenada à temperatura de -20 °C e utilizada em experimentos posteriores.

3.7 Isolamento das frações proteicas dos cotilédones de *Canavalia rosea*

3.7.1 Preparo da quitina para cromatografia de afinidade

A quitina utilizada para cromatografia de afinidade foi tratada segundo método descrito por Hackman e Goldberg (1964). Misturou-se 50 g de quitina (Sigma) a 1000 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, durante 24 h sob agitações manuais ocasionais a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 500 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e aquecido a 100 °C pelo período de 16 h utilizando-se um agitador magnético com aquecimento. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi acidificado com HCl 0,2 M e submetido à diálise contra água destilada durante 48 h com 3 trocas de água diárias e centrifugado a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (quitina) foi submetido à secagem por evaporação à temperatura ambiente, sendo utilizado posteriormente como matriz na montagem da coluna de afinidade à quitina.

3.7.2 Isolamento de proteínas por cromatografia de afinidade à quitina

Para obtenção da fração de proteínas que possuam afinidade à quitina, foi realizada uma cromatografia de afinidade à quitina conforme metodologia descrita por Uchoa *et al.* (2009). A solução de proteínas da fração F70-90% foi preparada utilizando-se 30 mg da fração em 15 mL de acetato de sódio (pH 6,0) e incubada com a resina (quitina acetilada) durante 30 minutos a 4 °C. A mistura foi colocada em uma coluna de cromatografia (2 x 30 cm). O empacotamento da coluna foi feito através da bomba de pressão, com fluxo de 1,20 mL/min e a eluição da fração não retida em quitina foi feita com lavagem com tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 6,0) até que o

eluído atingisse absorvância (280 nm) próxima de zero. A fração retida em quitina foi eluída com ácido acético (0,1 M) e coletada em tubos de ensaio em volumes de 5mL/tubo. As leituras da absorvância foram realizadas no espectrofotômetro *Belphotonics* a 280 nm. A fração retida em quitina (RET QUIT) foi dialisada contra água destilada por 72 h, liofilizada, armazenada a -20 ° C e utilizada em experimentos posteriores.

3.7.3. Isolamento de proteínas por cromatografia de troca iônica

As proteínas da fração F0-70% foram separadas por cromatografia de troca iônica DEAE-celulose (matriz aniônica de dietilaminoetil). Para a montagem da coluna, 20 g da resina foi inchada com água destilada, submetida a mudanças constantes de água, durante 24 h. A resina foi montada em uma coluna cromatográfica de vidro (3 x 28 cm) e ativada com lavagens sequenciais com 50 mL de cada uma das soluções: NaOH (0,1 M), água destilada, HCl (0,1 M) e água destilada. Após ativação a resina foi equilibrada com 50 mL de tampão Tris HCl (0,1M pH 8,0). A cromatografia foi submetida a um fluxo de 1,3 mL/min em todas as etapas de montagem, ativação e fracionamento das proteínas.

A fração F0-70% (50 mg) foi diluída em 10 mL de tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0 e aplicada na cromatografia. A fração não retida (N RET DEAE) foi eluída com tampão Tris HCl (0,1 M, pH 8,0) e as frações retidas foram eluídas com soluções de NaCl 0,1 M, 0,3 M, 0,7 M e 1,0 M, sequencialmente, até que os eluídos atingissem absorvância próxima de zero. As frações foram coletadas em tubos de ensaio, na proporção de 2,6 mL/tubo. As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro *Belphotonics* a 280 nm. As frações não retida e retida foram dialisadas contra água destilada por 72 h, liofilizadas, armazenadas a -20 °C e utilizadas em experimentos posteriores.

3.8 Visualização do perfil proteico das amostras através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico das diferentes frações foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) conforme metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970). O gel de corrida foi preparado utilizando-se água

destilada, acrilamida mix 30%, Tris (10 M, pH 6,8), SDS 10%, persulfato de amônio (APS) 10% e tetrametiletilenodiamina (TEMED) . A solução foi aplicada ao sistema de eletroforese BioRad, utilizando-se placas de vidro de 1,0 mm de espessura e se manteve em repouso até polimerização completa. O gel de empacotamento foi preparado utilizando-se água destilada, acrilamida mix 30%, Tris (10 M, pH 6,8), SDS 10%, persulfato de amônio (APS) 10% e tetrametiletilenodiamina (TEMED) e aplicado nas placas de vidro sobre o gel de corrida. Para modelagem dos poços, utilizou-se pentes moldes de 1,0 mm, e, após polimerização do gel de empacotamento, a placa contendo os géis foi colocada dentro da cuba do sistema eletroforese.

Para cada fração diluiu-se 1 mg de amostra em 100 µL de tampão (Tris HCl 0,1 M, pH 8,0). Uma alíquota de 7 µL da solução preparada foi diluída em 13 µL de tampão de amostra (Tris HCl 0,5 M, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%, pH 6,8). Um padrão de peso molecular (Thermo) foi usado como marcador.

A eletroforese ocorreu a temperatura ambiente, em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) por um período de aproximadamente 3 h, com uma voltagem de 60 V para a corrida no gel de empacotamento e 100 V no gel de separação. Após corrida, o gel foi lavado com água destilada e corado com solução corante azul de Coomassie (0,9 g de azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 mL de ácido acético) por 12 h. Descorou-se o gel por mais 12 h em uma solução descorante (40 % de metanol e 10 % de ácido acético). Após descorar, o gel foi lavado com água destilada e fotografado através de um fotodocumentador.

3.9 Sistema de sementes artificiais

Sementes artificiais foram preparadas para testar a toxicidade para *C. maculatus* dos tegumentos íntegros, das farinhas dos tegumentos e cotilédones e das frações proteicas isoladas dos cotilédones de *C. rosea*.

3.9.1 Sementes artificiais contendo tegumentos íntegros de *C. rosea*

Sementes artificiais contendo tegumentos naturais de *C. rosea* foram confeccionadas segundo metodologia de De Sá *et al.* (2014). Os cotilédones artificiais

foram confeccionados utilizando 400 mg de farinha de cotilédones de *V. unguiculata*. O pedaço de tegumento natural foi colocado na parte inferior de um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm), sendo recoberto pelos 400 mg da farinha. A semente foi prensada utilizando-se uma prensa manual de botão. Como controle foram utilizadas sementes artificiais confeccionadas exclusivamente com farinha de cotilédones de *V. unguiculata*. As partes das sementes que não continham tegumento foram envoltas com microfilme e as sementes foram infestadas por 24 h, com fêmeas de 48h de idade. Após o período de oviposição os ovos foram contados e o excesso retirado deixando-se apenas 3 ovos/sememente, todos sobre o tegumento. Os experimentos foram incubados à 28 °C, umidade relativa entre 60-80% em estufa do tipo B.O.D. A eclosão larval foi monitorada pelo período máximo de 7 DAO. No 20º DAO as sementes foram abertas e as larvas existentes foram retiradas para verificação do peso larval e da sobrevivência. As larvas coletadas foram acondicionadas a -70 °C e utilizadas para análises posteriores.

3.9.2 Sementes artificiais contendo tegumentos artificiais de *C. rosea*

Para avaliar a toxicidade da farinha do tegumento, foram confeccionadas sementes artificiais contendo tegumentos artificiais com diferentes concentrações da farinha de tegumentos de *C. rosea* (1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%) misturadas à farinha de cotilédones de *V. unguiculata* (DE SÁ *et al.*, 2014). A mistura de farinhas, para a composição dos tegumentos artificiais, foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e colocada na parte inferior de um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm). Foram feitos tegumentos artificiais com massas finais de 20, 40 e 60 mg da mistura de farinhas, para se obter tegumentos com espessuras diferentes. A mistura das farinhas foi colocada na parte inferior de um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm), sendo recoberta por 400 mg de farinha de cotilédones de *V. unguiculata*. As diferentes sementes (com tegumentos com espessuras diferentes) foram confeccionadas com massas totais de 420, 440 e 460 mg. A semente foi prensada utilizando-se uma prensa manual. Para o controle foram utilizadas sementes artificiais contendo exclusivamente farinha de cotilédones de *V. unguiculata* com massas 420, 440 ou 460 mg. Todos os demais procedimentos de infestação e acompanhamento do desenvolvimento foram executados conforme descrito no item 3.9.1.

3.9.3 Sementes artificiais sem tegumentos

Sementes artificiais foram confeccionadas de acordo com Macedo *et al.* (1993), utilizando-se diferentes concentrações da farinha de cotilédones de *C. rosea* (1%, 2%, 10%, 20% e 40%) ou 1% das frações proteicas misturadas à farinha de cotilédones de *V. unguiculata*, totalizando 400 mg. As farinhas e frações foram homogeneizadas, prensadas e infestadas de acordo com o item 3.9.1. Após infestação os ovos foram contados, retirou-se o excesso, deixando 3 ovos por semente, localizados em qualquer parte da semente. O desenvolvimento do inseto foi acompanhado conforme descrito no item 3.9.1.

3.10 Quantificação de glicose, proteínas, triacilgliceróis e colesterol nas larvas

As larvas retiradas de experimentos de sementes artificiais com 16 e 20 DAO foram maceradas e extraídas em solução salina (NaCl 0,15 M), na proporção de 50 µl de solução por larva. Durante 30 min, o material foi submetido à agitação constante a temperatura de 4 °C. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado -20 °C para posterior experimento de determinação de glicose, proteínas e atividade das enzimas. O precipitado obtido através da centrifugação foi utilizado para determinação de triacilgliceróis e colesterol. Adicionou-se ao precipitado um volume de 12,5 µL de Tween 20 0,1% por larva, mantendo agitação constante pelo período de 30 min a 4 °C. O material obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Para todos os ensaios utilizando-se kits, seguiram-se as instruções de uso informadas pelos fabricantes.

3.10.1 Determinação de glicose

Utilizou-se o kit Glicose Monoreagente do fabricante Bioclin para verificação da concentração de glicose presente nas larvas. O kit é composto por um reagente enzimático (reagente N° 1), composto por: ampão < 36 mmol/L, Fenol < 20 mmol/L, 4- aminoantipirina < 5 mmol/L, Glicose Oxidase > 10.000 U/L, Peroxidase > 700 U/L, estabilizante, surfactante e conservante; e por um reagente padrão (reagente N° 2)

composto por: Glicose (100,0 mg/dL) e conservante. Os procedimentos seguiram as instruções indicadas pelo fabricante.

O ensaio foi realizado em microtubos de 1,5 mL, utilizando-se 2 µl do extrato das larvas (extraído em solução salina) adicionados a 200 µl do reagente enzimático. O Branco foi preparado utilizando-se 2 µl de solução salina (NaCl 0,15 M) adicionados a 200 µl do reagente enzimático. O padrão do kit foi preparado utilizando-se 2 µl do reagente padrão adicionados a 200 µl do reagente enzimático e foi utilizado para o cálculo de determinação de glicose. O ensaio foi incubado por 10 min em banho- maria a 37 °C. Em seguida, 200 µl da amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 492 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções indicadas pelo kit do ensaio.

3.10.2 Determinação de proteínas totais

Os valores de proteínas totais foram determinados utilizando-se o método do ácido bicinconínico BCA (Sigma Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) para o cálculo da quantidade de proteínas totais presentes nas amostras foi preparada a partir de uma solução na proporção de 1 mg para 1 mL de água destilada. A curva foi determinada utilizando-se quantidades crescentes (2, 4, 6, 8 e 10 µL) do estoque de BSA adicionados a 200 µL da solução de BCA e água destilada até que se completasse o volume final de 210 µL. Para o preparo das amostras, adicionou-se 1 µL dos extratos das larvas (extraído em solução salina) a 10 µL de água destilada e 200 µL da solução de BCA em poços de microplacas de 96 poços.

O ensaio foi incubado durante 30 min em estufa a 37° C. A leitura foi feita em comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e os cálculos de quantidade de proteínas totais foram feitos de acordo com os dados da curva padrão.

3.10.3 Determinação de triacilglicerol

Utilizou-se o kit Triglicérides Monoreagente do fabricante Bioclin para determinação da concentração de triacilglicerois nas larvas. O kit é composto por dois reagentes: Reagente Nº 1 (Reagente enzimático) composto por tampão, 4-clorofenol < 5mmol/L, Lipase Lipoprotéica < 5000 U/L, Glicerol Kinase < 3000 U/L, Peroxidase < 5000 U/L, Glicerol-3-Fosfato Oxidase < 5000 U/L, 4-aminoantipirina < 1 mmol/L, ATP < 5 mmol/L, ativador, estabilizante, surfactante e conservante e Reagente Nº 2 (Padrão) composto por Triglicérides (100,0 mg/dL) e diluente.

O ensaio foi realizado em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se 1 µL de extrato (extraído do precipitado em Tween 20 0,1%) a 1 µL de Tween 20 0,1% e 200 µL do Reagente 1. Para o preparo do Branco, utilizou-se 2 µL de Tween 20 0,1% adicionados a 200 µL do reagente enzimático. Para o preparo do padrão adicionou-se 2 µL do reagente padrão a 200 µL do reagente enzimático. O padrão foi utilizado para o cálculo de determinação de triacilglicerois.

O ensaio foi incubado no tempo de 10 min em banho-maria a 37 °C. Após incubação, 200 µL da amostra foram transferidos para uma microplaca de Elisa de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda de 500 nm. O ensaio foi feito em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com método indicado pelo kit utilizado.

3.10.4 Determinação de colesterol

Utilizou-se o kit Colesterol Monoreagente do fabricante Bioclin para determinação de colesterol nas larvas. O kit é composto por dois reagentes: Reagente Nº 1 (reagente enzimático) composto por tampão (pH 7,0) 75 mmol/L, Fenol 4,5 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,3 mmol/L, Colesterol Oxidase > 200 U/L, Lipoproteína Lipase > 700 U/L, Peroxidase > 300 U/L, Azida Sódica 14,6 mmol/L, estabilizantes e surfactantes e Reagente Nº 2 (Padrão) composto por Colesterol 200,0 mg/dL, estabilizantes e surfactantes.

Os ensaios foram realizados em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se 2 µL de extrato (extraído do precipitado em Tween 20 0,1%) a 200 µL do reagente enzimático. Para preparo do branco utilizou-se 2 µL Tween 20 0,1% adicionados a 200 µL do reagente enzimático. O padrão do kit foi preparado adicionando-se 2 µL do

Reagente N° 2 a 200 µL do Reagente N° 1. O padrão foi utilizado para cálculo de determinação de colesterol. O ensaio foi incubado por 10 min em banho-maria a 37 °C. Após período de incubação, 200 µL da amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda de 500 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções indicadas pelo kit do ensaio.

3.11 Quantificação da atividade de enzimas digestivas das larvas

3.11.1 Determinação da atividade de lipases

Utilizou-se o kit Lipase Monoreagente do fabricante Bioclin para determinação da atividade de lipases nas larvas. O kit é composto por cinco diferentes reagentes: Reagente N° 1 (Tampão) composto por Tris (hidroximetilamino metano) pH 8,5; Reagente N° 2 (Inibidor Enzimático), composto por fenilmetil sulfonil fluoreto e solubilizante; Reagente N° 3 (Reagente de Cor), composto por ácido ditionitrobenzóico (DTNB), acetato de sódio e estabilizador; Reagente N° 4 (substrato) composto por tiobutirato ditiopropanol e surfactante; e Reagente N°5 constituído de acetona P.A.

O ensaio foi realizado em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se 5 µL do extrato de larvas (obtido através da extração em solução salina) a 100 µL do Reagente N° 1, 5 µL do Reagente N° 2 e 10 µL do Reagente N° 3. O Branco foi preparado utilizando-se 5 µL de NaCl 0,15 M adicionados a 100 µL do Reagente N° 1, 5 µL do Reagente N° 2 e 10 µL do Reagente N° 3. O controle foi preparado utilizando-se 5 µL do extrato larval adicionados a 100 µL do Reagente N° 1 e 10 µL do Reagente N° 3, sendo utilizado para o cálculo de determinação de lipase. Incubou-se o ensaio por 2 minutos em banho maria a 37 °C. Após incubação, adicionou-se 10 µL do Reagente N° 4 nos microtubos e 10 µL de salina no tubo referente ao controle. O material foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 30 min. Após incubação, adicionou-se a todos os tubos o volume 200 µL do Reagente N° 5 e, após adição, o material foi submetido a repouso durante 3 min e centrifugado a 3500 x g por 5 min a 4 °C. Após centrifugação, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 405 nm. O

ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções indicadas pelo kit do ensaio.

3.11.2 Determinação da atividade de α -amilase

Utilizou-se o kit Amilase Monoreagente do fabricante Bioclin para determinação da atividade de α -amilase nas larvas. O kit é composto por dois reagentes: Reagente Nº 1 (Substrato) composto por amido 0,4 g/L, tampão fosfato (pH 7,0) 100 mmol/L, estabilizante e conservante e Reagente Nº 2 (Reagente de Cor) que refere-se a uma solução estoque de Iodo (50 mmol/L e estabilizante). O Reagente Nº 2 foi utilizado no preparo do reagente de trabalho (5 mL do Reagente Nº 2 adicionados a 45 mL de água destilada).

Para o ensaio adicionou-se 100 μ L do Reagente Nº 1 em todos os tubos a serem utilizados. Os tubos foram submetidos a banho-maria (37 °C) por 2 min. Após esse período, adicionou-se 2 μ L do extrato larval (extraído em solução salina) nos tubos referentes as amostras e 2 μ L de solução salina (NaCl 0,15 M) no tubo referente à amostra padrão. Os tubos foram submetidos a banho-maria a 37 °C por 7,5 min e, em seguida, 100 μ L do reagente de trabalho preparados anteriormente foram adicionados a 800 μ L de água destilada. Uma alíquota de 100 μ L foi transferida para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada utilizando-se comprimento de onda de 630 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções indicadas pelo kit do ensaio.

3.11.3 Determinação da atividade de proteases cisteínicas

Para verificação da atividade de proteases cisteínicas nas larvas, realizou-se ensaio enzimático segundo metodologia descrita por Michaud *et al.* (1994). Utilizou-se azocaseína como substrato para a enzima, preparada na concentração de 1% em tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio monobásico 100 mM, Triton X-100 0,1%, DTT 1,5 mM, pH 5,6). O cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se uma curva padrão de papaína, na proporção de 1 mg para 2 mL de tampão citrato-fosfato. A curva foi feita em quantidades crescentes (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 μ L) de papaína adicionadas a 80 μ L da solução

de azocaseína + tampão citrato-fosfato até que se completasse 120 µL de volume final. Adicionaram-se 10 µL dos extratos das larvas (extraído em solução salina) a 30 µL de tampão citrato-fosfato e 80 µL de azocaseína em tubos de ensaio. A incubação do ensaio foi realizada por 1 h em banho-maria a 37° C. Após o período de incubação, foram adicionados 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para possibilitar a pausa da reação. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 min a 10.000 x g e 350 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos, adicionando-se 300 µL de NaOH 1 M. Uma alíquota de 300 µL foi transferida para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 440 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos de atividade de protease cisteínica foram feitos utilizando-se como parâmetro os valores de absorbância da curva padrão.

A atividade de proteases cisteínicas também foi avaliada em larvas de 12, 16 e 21 DAO desenvolvidas nas sementes naturais de *V. unguiculata* (larvas retiradas das sementes da colônia).

3.12 Análises estatísticas de dados

Os experimentos foram realizados com no mínimo duas repetições independentes. Todos os dados apresentados referem-se a média e ao desvio padrão calculados utilizando-se os dados de todas as repetições. Utilizou-se o programa Graph-Pad Prism 5.0 para o cálculo da média e desvio e tratamento estatísticos. A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do teste Tukey ou teste T e as diferenças significativas foram determinadas para $P < 0.05$. Médias com diferenças estatísticas significativas em relação ao controle ou a diferentes tratamentos estão indicadas nos gráficos.

4 - RESULTADOS

4.1 Análise da influência de sementes naturais de *C. rosea* sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*

A avaliação da toxicidade de sementes naturais de *C. rosea* para o inseto mostra que houve aproximadamente 49% de inibição da oviposição sobre os tegumentos de sementes de *C. rosea* (17,5 ovos/semente) quando comparado ao número de ovos contabilizados nos tegumentos das sementes controle (34,3 ovos/semente) (Figura 4).

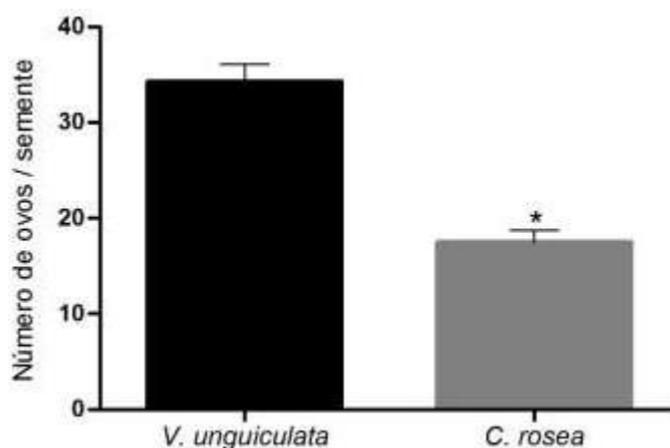


Figura 4: Interferência de semente natural de *Canavalia rosea* sobre a oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus*. Número de ovos colocados sobre as sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. rosea* após 24 h de infestação. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle, de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$).

A penetração larval foi avaliada nos primeiros 7 dias após a oviposição. Os resultados mostram que houve 100% de inibição na penetração de larvas de *C. maculatus* em tegumentos de sementes naturais de *C. rosea*, enquanto nas sementes controle aproximadamente 95,3% das larvas conseguiram penetrar o tegumento (Figura 5A).

Ao avaliar a sobrevivência das larvas sobre o tegumento de *C. rosea*, verificou-se que 92% das larvas encontravam-se vivas em 7 DAO (Figura 6C-c). A taxa de sobrevivência decresceu para 74% no tempo de 10 DAO, 56% no tempo de 13 DAO

e 0% no tempo de 16 DAO (Figura 5B), onde todas as larvas encontradas neste período encontravam-se mortas entre os ovos e os tegumentos das sementes (Figura 6C-d). Dada a inibição de 100% na penetração das sementes de *C. rosea*, conseqüentemente não houve emergência de adultos (Figura 6A).

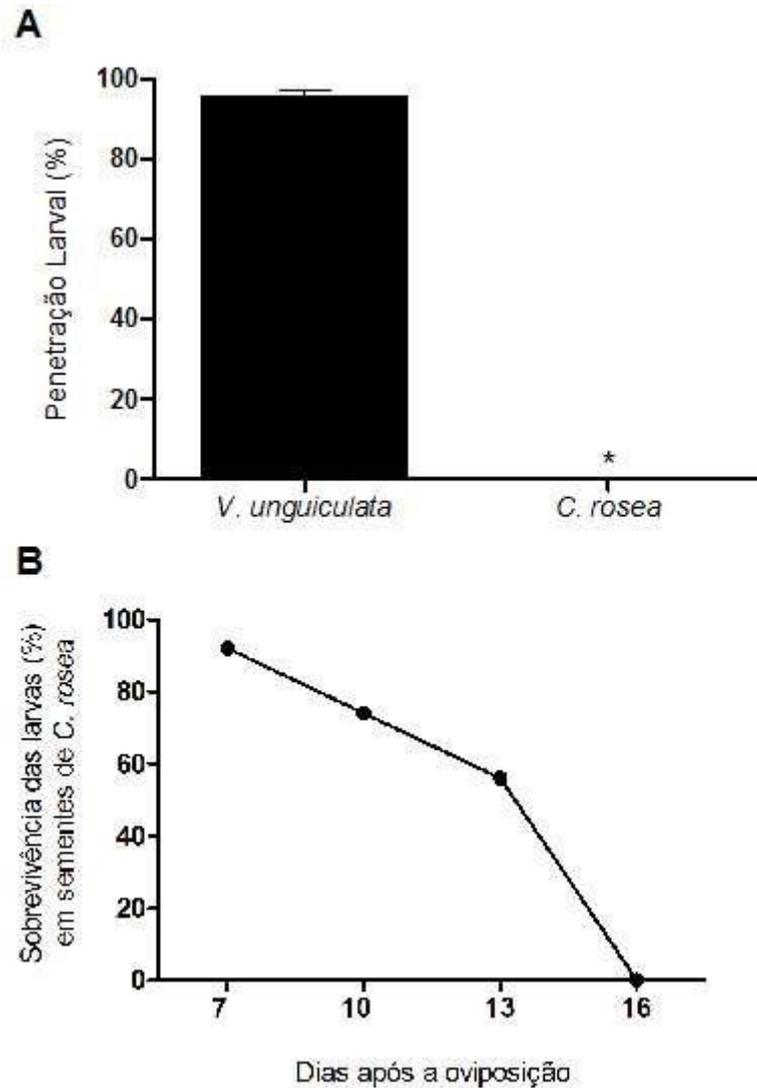


Figura 5: Interferência de semente natural de *Canavalia rosea* sobre a penetração larval e sobrevivência de *Callosobruchus maculatus*. **A:** Percentual de penetração de larvas de *C. maculatus* em tegumentos de sementes naturais de *V. unguiculata* e *C. rosea*. **B:** Sobrevivência das larvas de *C. maculatus* sobre o tegumento natural de *C. rosea*. 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 ($p < 0,05$).

No 7º DAO, é possível verificar a presença de farinha e a ausência da larva dentro do ovo ovipositado sobre as sementes controle, indicativo de que a larva penetrou completamente o tegumento (Figura 6B). Ao longo do mesmo período, em sementes de *C. rosea*, apesar de ser possível observar uma quantidade de farinha dentro do ovo (resultado da escavação da larva), verifica-se a presença da larva dentro do ovo (Figura 6C), confirmando que a larva não conseguiu penetrar. A sobrevivência de *C. maculatus* sobre sementes naturais de *V. unguiculata* foi avaliada através da emergência de adultos (Figura 6A).

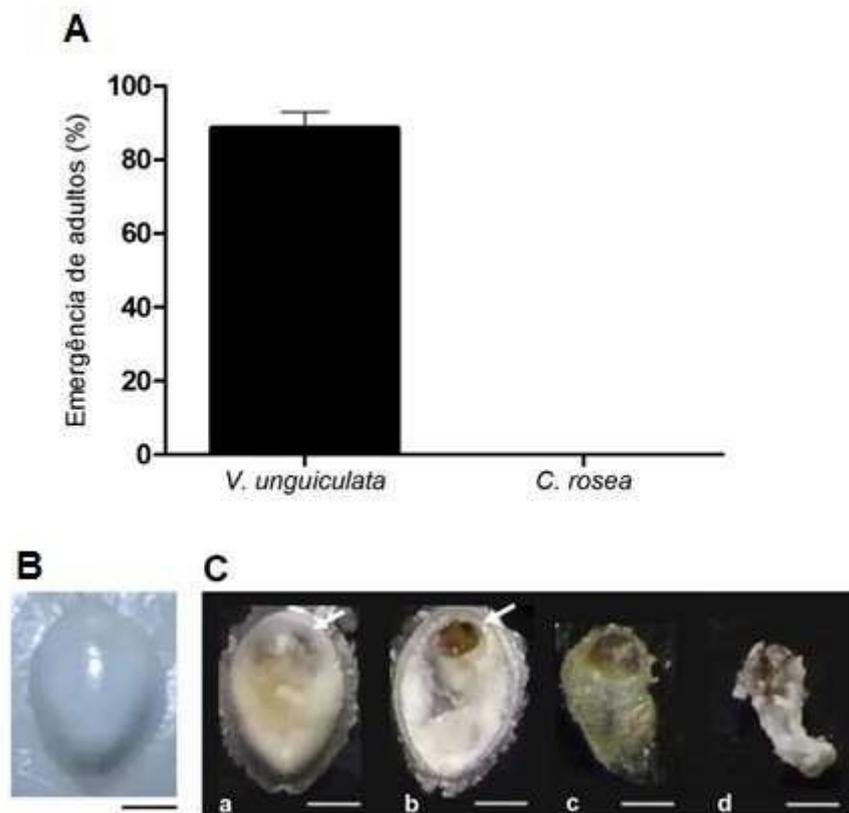


Figura 6: Interferência de semente natural de *Canavalia rosea* sobre o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*. A: Percentual de emergência de adultos sobre sementes naturais de *V. unguiculata* ou *C. rosea*. **B:** Ovo de *C. maculatus* sobre tegumento de *V. unguiculata* 7 DAO. **C:** Ovo de *C. maculatus* extraído de tegumento natural de *C. rosea* em 7 DAO **a:** Ovo na visão dorsal. **b:** Ovo na visão ventral. Setas brancas indicam a presença de larva dentro dos ovos. **c:** Larva retirada do ovo em 7 DAO. **d:** Larva retirada do ovo em 16 DAO. Barras brancas indicam escala de 0,1 mm. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

4.2 Análise da influência do tegumento natural de *C. rosea* sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*.

Quando avaliada especificamente a influência dos tegumentos sobre o desenvolvimento do inseto, observou-se uma diminuição de aproximadamente 49% na oviposição sobre as sementes artificiais contendo tegumentos naturais de *C. rosea* (5,67 ovos/semente) quando comparado ao controle (9,33 ovos/semente) (Figura 7A).

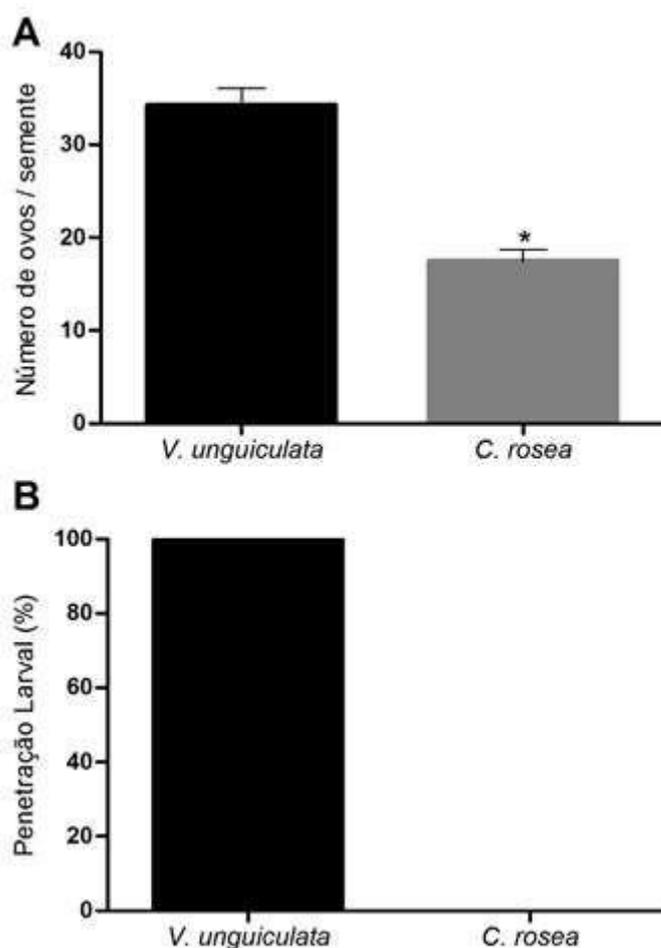


Figura 7: Interferência do tegumento natural de sementes de *C. rosea* sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de *C. maculatus*. **A:** Número de ovos postos em sementes artificiais contendo tegumento íntegro de *C. rosea* e em seu respectivo controle. **B:** Percentual de penetração larval de *C. maculatus* em sementes artificiais (controle e teste) ao final de 7 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 ($p < 0,05$).

A avaliação da penetração larval ao longo de 7 DAO mostrou que houve 100% de penetração das larvas nas sementes controle (Figura 7B), entretanto nenhuma larva foi capaz de penetrar o tegumento de *C. rosea* (Figura 7B).

A sobrevivência das larvas foi monitorada com auxílio de um estereoscópio até o 20° DAO. As sementes controle foram abertas no 20° DAO e as larvas foram retiradas com auxílio de um bisturi. Os resultados indicam uma taxa aproximada de 92,44% de sobrevivência das larvas eclodidas no 7° DAO (Figura 8A). Até o 20° DAO, nenhuma das larvas das sementes teste haviam eclodido, tendo sido observado 0% de sobrevivência (Figura 8A). A sobrevivência das larvas foi monitorada com auxílio de um estereoscópio até o 20° DAO. As sementes controle foram abertas no 20° DAO e as larvas foram retiradas com auxílio de um bisturi. No 20° DAO, ao levantar-se o ovo com o auxílio de uma agulha, foi possível observar uma cavidade de aproximadamente 0,1 mm de circunferência (Figura 8C-d), indicando que a larva iniciou a escavação sobre o tegumento, mas não conseguiu atravessá-lo completamente, ficando disposta entre o ovo e o tegumento escavado, não tendo contato com o cotilédone artificial da semente, indicando que neste caso, a toxicidade está relacionada diretamente ao tegumento da *C. rosea*. Ao se observarem os ovos com auxílio de um estereoscópio, verificou-se a presença de farinha dentro do ovo ovipositado sobre o controle (Figura 8B) e do ovo ovipositado sobre o tegumento de *C. rosea* (Figura 8C a-b), indicando que as larvas começaram a escavar o tegumento, jogando farinha dentro do ovo. Ao se retirar o ovo foi observado que a larva se encontrava entre o ovo e o tegumento.

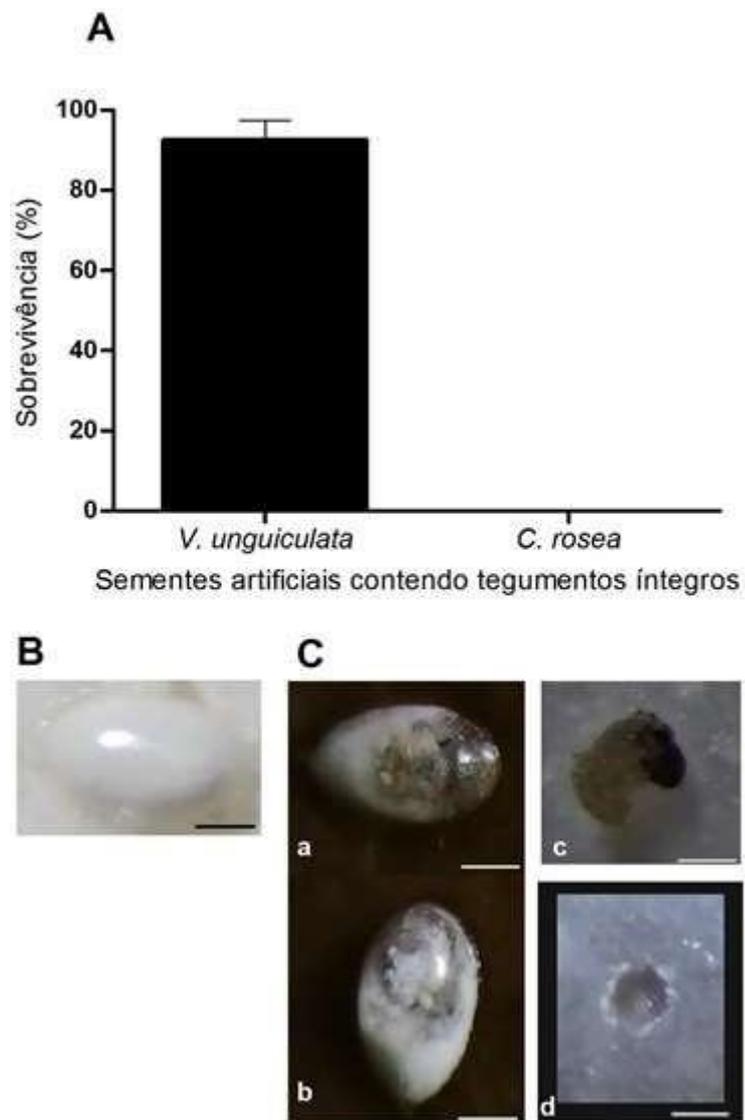


Figura 8: Análise da interferência do tegumento de *C. rosea* sobre os parâmetros de desenvolvimento e sobrevivência do *C. maculatus*. A: Percentual de sobrevivência de *C. maculatus* em sementes artificiais teste e seus respectivos controles. B: Ovo de *C. maculatus* de 7 DAO sobre semente artificial contendo exclusivamente *V. unguiculata* (controle). C: Ovo de *C. maculatus* de 7 DAO retirado de tegumento íntegro sobre semente artificial. **a**: Ovo na visão dorsal. **b**: Ovo na visão dorsal. **c**: Larva retirada do ovo em 7 DAO. **d**: Cavidade de aproximadamente 0,1 mm que indica a tentativa de perfuração da larva (20 DAO). Barras brancas indicam escala de 0,1mm.

4.3 Análise da morfologia dos embriões de *Callosobruchus maculatus* desenvolvidos sobre os tegumentos naturais de *Canavalia rosea*

Para verificação da possível interferência do tegumento sobre o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*, os embriões desenvolvidos em ovos ovipositados sobre tegumentos de *C. rosea* foram caracterizados morfologicamente e comparados com a caracterização da embriogênese do *C. maculatus* sobre o tegumento natural de *V. unguiculata* (De Sá, 2014). Nossos resultados mostraram não haver diferenças morfológicas entre os embriões desenvolvidos em ovos sobre os tegumentos de *C. rosea* (Figura 9) e *V. unguiculata* (Figura 2B). No tempo de 24 HAO, em ambos os embriões (Figura 9 e 2B) deu-se o início do processo de extensão da banda germinal. No período entre 24 a 28 HAO, os embriões encontram-se em transição entre as fases de extensão e retração da banda germinal. A retração da banda germinal foi concluída no período entre 36 e 52 HAO (dados não mostrados). O início do processo de fechamento dorsal ocorre quando as células do vitelo presentes na região dorsal são cobertas por células embrionárias, observado entre 60 e 76 HAO. É possível visualizar o início do processo do fechamento dorsal com 60 HAO e a finalização deste evento em 72 HAO em ambos os embriões (Figura 9 e Figura 2B). A definição dos segmentos torácicos, que ocorrem progressivamente após o tempo de 24 HAO está indicada por chaves brancas; a presença dos apêndices de patas em 60 HAO, visíveis em ambos os embriões, está indicada por setas brancas (Figura 9 e Figura 2B).

Comparando-se as morfologias dos embriões de *C. maculatus* sobre os tegumentos de *V. unguiculata* (semente hospedeira) e *C. rosea* (semente de estudo), observou-se que não houve alteração morfológica durante o desenvolvimento embrionário do inseto. Esses resultados indicam que o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre o tegumento de sementes de *C. rosea*, observado nesse trabalho está de acordo com os resultados previamente descritos por De Sá *et al.* (2014) e De Sá (2017) e, por este motivo, o tegumento de *C. rosea* não interferiu na morfologia do embrião de *C. maculatus*.

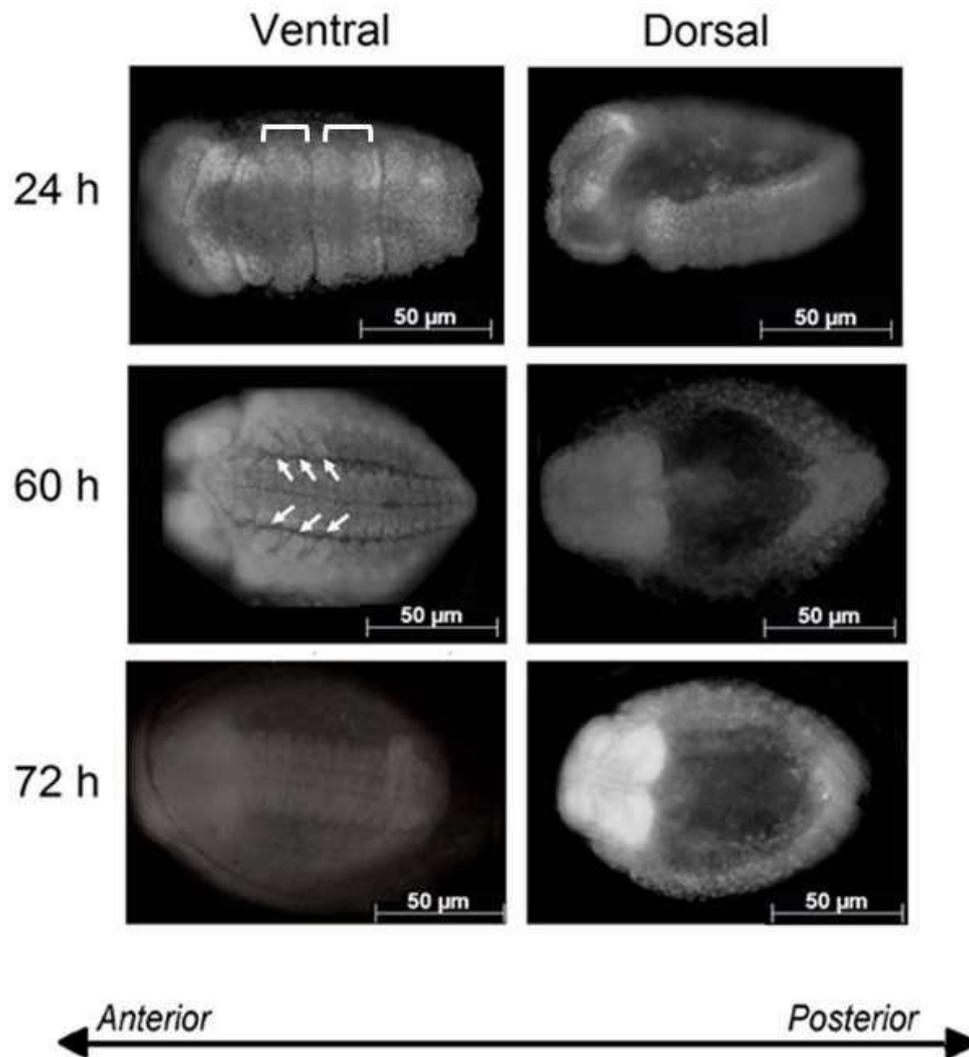


Figura 9: Desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre os tegumentos de sementes naturais de *Canavalia rosea*. Microscopia ótica de fluorescência, utilizando DAPI para marcação, para comparação do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* nos tempos de 24, 60 e 72 horas após a oviposição (HAO) nas posições ventral e dorsal, sobre tegumentos de sementes naturais de *C. rosea*. Chaves brancas indicam os segmentos torácicos. Setas brancas apontam os apêndices de patas. Barra de escala = 50 µm.

4.4 Análise da influência de sementes artificiais cobertas com tegumentos artificiais de *C. rosea* sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*

Para verificar se a interferência dos tegumentos de *C. rosea* sobre os parâmetros de penetração, desenvolvimento e sobrevivência das larvas estaria relacionada às características físicas desse tecido, como dureza e espessura, ou à presença de compostos tóxicos, foram realizados ensaios com sementes contendo tegumentos artificiais, com espessuras diferentes e com percentuais diferentes de farinha de tegumento de *C. rosea*.

Inicialmente foram confeccionados tegumentos artificiais, com massa final de 20 mg, contendo concentrações de 1 a 100% de farinha de *C. rosea*, seguindo metodologia de De Sá *et al.* (2014). Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa na oviposição quando comparada com oviposição em sementes controle (Figura 10A). A média de oviposição nas sementes controle foi de aproximadamente 7 ovos por semente, enquanto nas sementes experimentais variou entre 5,33 a 7,44 ovos/sementes (Figura 10A). Mesmo sementes confeccionadas com tegumentos artificiais contendo 100% de farinha de tegumentos de *C. rosea* não foram capazes de inibir a penetração das larvas (88,7% de penetração larval) quando comparadas às sementes controle (96,2%) no tempo de 7 DAO (Figura 10B).

No tempo de 20 DAO, as sementes artificiais foram abertas e as larvas foram retiradas com o auxílio de um bisturi para determinação da massa, comprimento e avaliação da sobrevivência.

Os resultados mostraram que as larvas retiradas das sementes controle apresentaram uma média de aproximadamente 8 mg/larva, assim como as larvas retiradas das sementes contendo 50% de farinha de tegumento. Valores similares foram encontrados para larvas presentes nas sementes contendo 1, 5, 10 e 100% de farinha de tegumento (aproximadamente 6,9; 6,8; 7,6 e 7,3 mg/larva respectivamente) (Figura 11A).

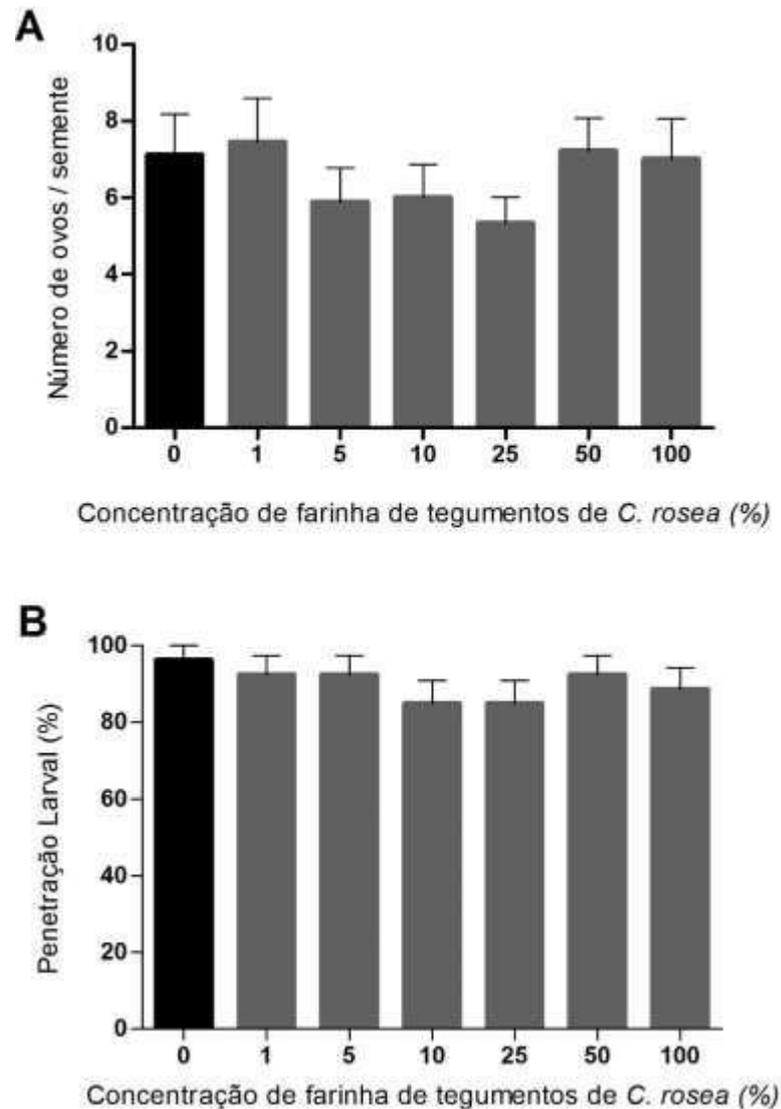


Figura 10: Interferência do tegumento artificial de *Canavalia rosea* sobre os parâmetros de oviposição e penetração de larvas de *C. maculatus*. A: Número de ovos postos em sementes artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumentos de *C. rosea* e seus respectivos controles. B: Percentual de penetração larval de *C. maculatus* em sementes artificiais (controles e testes) ao final de 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

Sementes contendo 25% de farinha de tegumento de *C. rosea* foram as que apresentaram maior média de massa por larva (aproximadamente 9 mg/larva). Os resultados mostram ainda que não houve diferença estatística significativa entre a média da massa larval de todas as sementes testes com relação ao controle (Figura 11A).

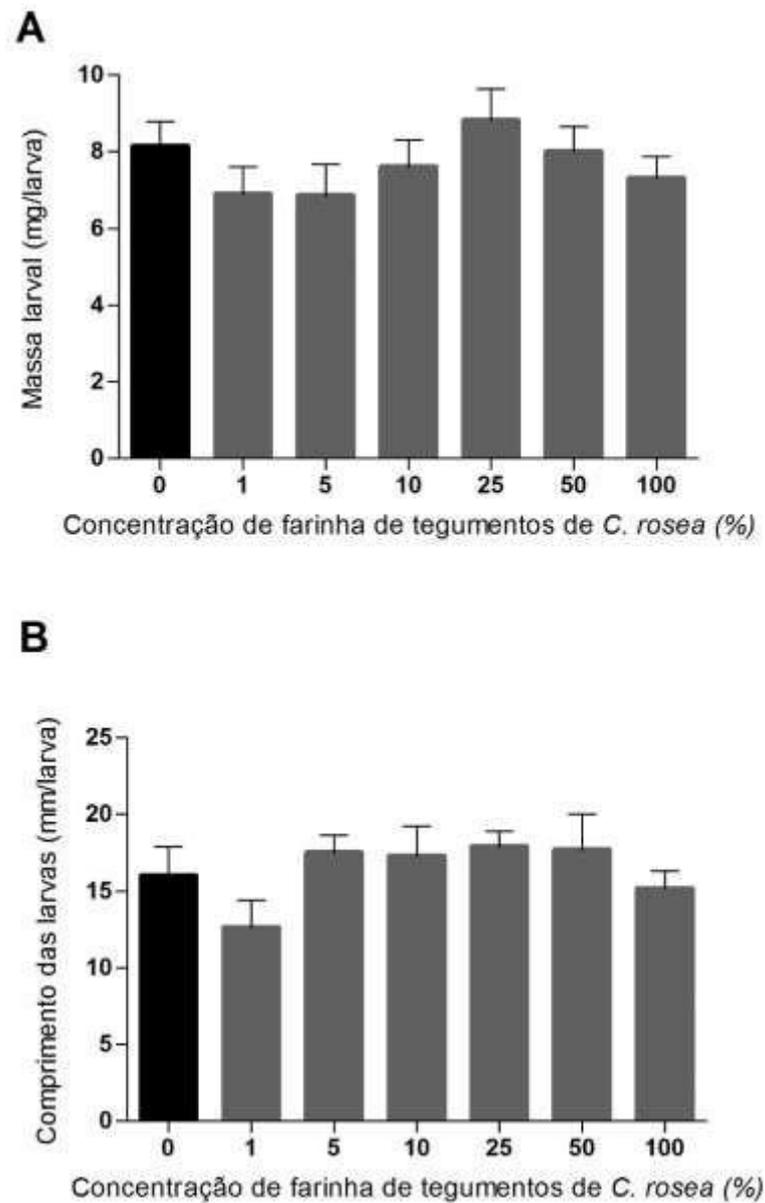


Figura 11: Avaliação da interferência de tegumentos artificiais nos valores de massa e comprimento das larvas de *C. maculatus*. Análise de larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo tegumentos artificiais preparados com diferentes concentrações de farinha de tegumentos de *C. rosea* e seus respectivos controles. **A:** Valores em mg da média da massa das larvas **B:** Valores em mm da média do comprimento das larvas. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores representados não foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

O comprimento das larvas foi medido utilizando-se o programa *Image J* e os resultados mostraram que as larvas retiradas da semente controle apresentaram uma média de aproximadamente 16 mm/larva. No comparativo de comprimento das larvas também não houve diferença estatística significativa entre as larvas provenientes das sementes controle e das sementes testes. Sementes contendo concentrações de 5, 10, 25 e 50% de farinha de tegumentos apresentaram valores similares entre si (aproximadamente 17,5; 17; 17,9 e 17,7 mg/larva respectivamente) (Figura 11B).

O comparativo morfológico entre as larvas retiradas em 20 DAO de sementes artificiais utilizadas como controle (Figura 12A) e de sementes artificiais contendo diferentes concentrações de tegumentos de *C. rosea* (Figura 12B) também não apresentou diferenças morfológicas entre as larvas.

Os resultados apresentados em todos os parâmetros analisados diferem dos resultados apresentados em sementes artificiais contendo tegumento íntegro de *C. rosea*, indicando que a toxicidade do tegumento possa estar relacionada a propriedades físicas do tegumento, como por exemplo, dureza e espessura.

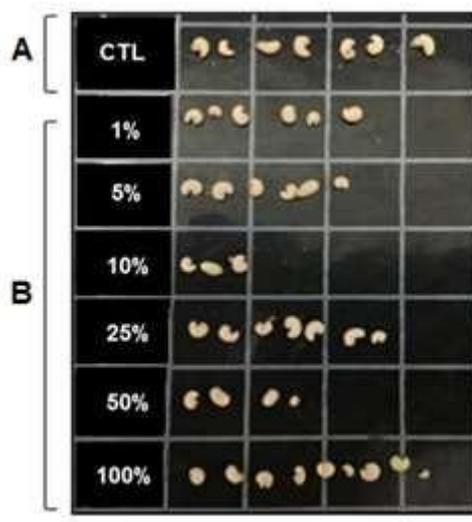


Figura 12: Interferência de tegumentos artificiais de *C. rosea* na morfologia de larvas de *C. maculatus* de 20 DAO. Comparativo da morfologia de larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo **A:** exclusivamente farinha de cotilédones de *V. unguiculata*. **B:** diferentes concentrações de farinha de tegumentos de *C. rosea*. A barra preta de escala equivale a 1 cm.

A medição da espessura dos tegumentos naturais de *C. rosea* e das sementes hospedeiras (*V. unguiculata*) mostrou que os tegumentos de *C. rosea* são aproximadamente 8,2 vezes mais espessos que os das sementes hospedeiras. Uma média de aproximadamente 0,11 mm de espessura foi verificada em tegumentos de *V. unguiculata*, enquanto tegumentos de *C. rosea* apresentaram uma média de aproximadamente 0,908 mm, de espessura (Figura 13).

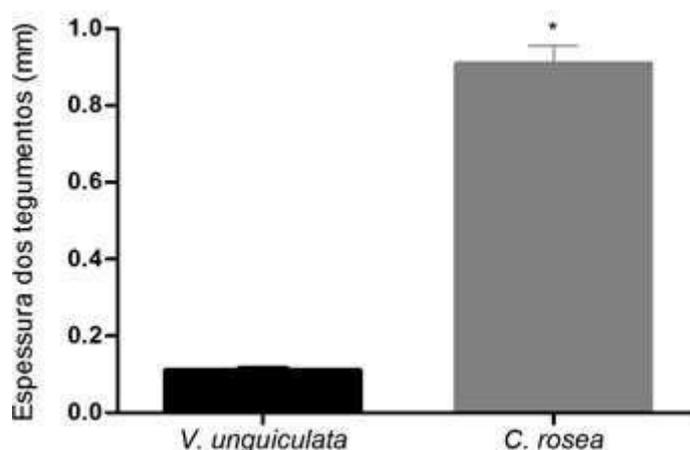


Figura 13: Espessura dos tegumentos de *V. unguiculata* e *C. rosea*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por * foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Para avaliar se a espessura dos tegumentos artificiais poderia interferir nos parâmetros de desenvolvimento do inseto, tegumentos mais espessos foram confeccionados. Os resultados mostraram não haver diferença estatística significativa entre os valores de oviposição (Figura 14A) e de penetração larval (Figura 14B).

No período de 20 DAO, as sementes artificiais foram abertas para avaliação da sobrevivência das larvas e medição dos valores de suas massas e comprimentos. Os resultados mostraram 100% de sobrevivência das larvas controle e desenvolvidas nas sementes artificiais contendo tegumentos artificiais com espessura de 20 mg. Em sementes artificiais contendo tegumentos artificiais com espessuras de 40 e 60 mg, observou-se uma taxa aproximada de 91,67% de sobrevivência das larvas, não havendo diferença estatística significativa entre os valores apresentados (Figura 15).

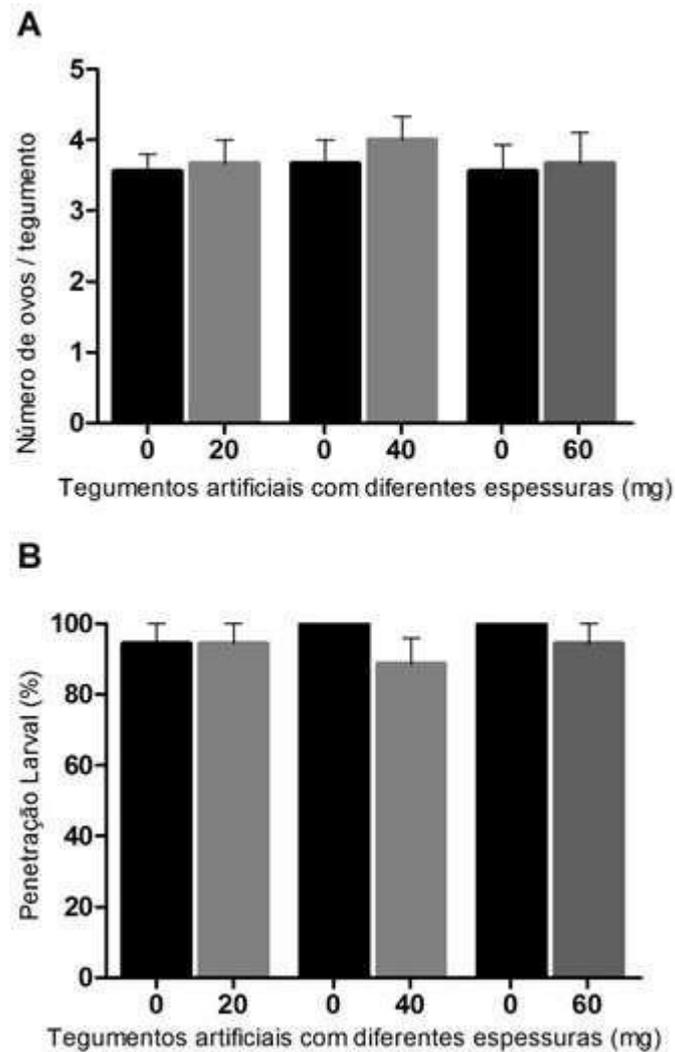


Figura 14: Análise da interferência de tegumentos artificiais de *Canavalia rosea* na performance de *C. maculatus*. Para cada espessura de tegumento artificial (20, 40 e 60 mg) foi utilizado um controle com respectiva massa total da semente artificial (420, 440 e 460 mg) A: Análise de oviposição de *C. maculatus* em sementes artificiais contendo diferentes espessuras de tegumentos artificiais no tempo de 24 HAO. B: Percentual de penetração larval em sistema de sementes artificiais no tempo de 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

Apesar das larvas estarem vivas no tempo de 20 DAO, observou-se uma diferença na média dos valores das massas e comprimentos dessas larvas. As massas das larvas controle variaram próximas a 8 mg, enquanto nas larvas obtidas dos experimentos com tegumentos menos espessos (20 mg), a média foi de 7,8 mg. Nas sementes artificiais com tegumentos mais espessos foram observadas reduções de 39,7% e 58%, nas massas das larvas desenvolvidas nos experimentos com tegumentos de 40 e 60 mg respectivamente (Figura 16A). Os comprimentos das larvas controle variaram próximos a 18mm, enquanto as larvas obtidas dos experimentos com tegumentos menos espessos (20 mg), a média foi de 16,3 mm. Nas sementes artificiais com tegumentos mais espessos observou-se reduções de 36,92% e 58,51%, nos comprimentos das larvas desenvolvidas nos experimentos com tegumentos de 40 e 60 mg respectivamente (Figura 16B-E) Os resultados mostram que a espessura interfere na toxicidade e sugerem que o mecanismo de toxicidade de tegumento de *C. rosea* pode estar relacionado à junção de diferentes fatores, como presença de compostos químicos aliados a características físicas, como a grande espessura do tegumento.

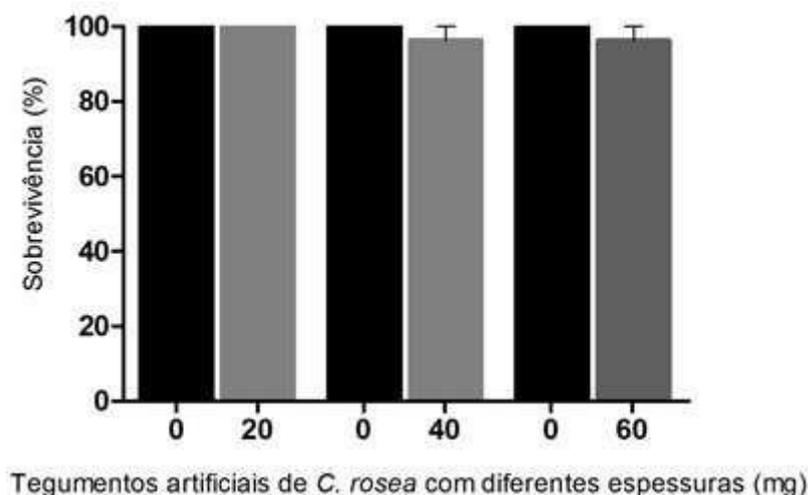


Figura 15: Avaliação da interferência da espessura de tegumentos artificiais na sobrevivência de *C. maculatus*. Percentual de sobrevivência das larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo tegumentos artificiais de diferentes espessuras e seus respectivos controles. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

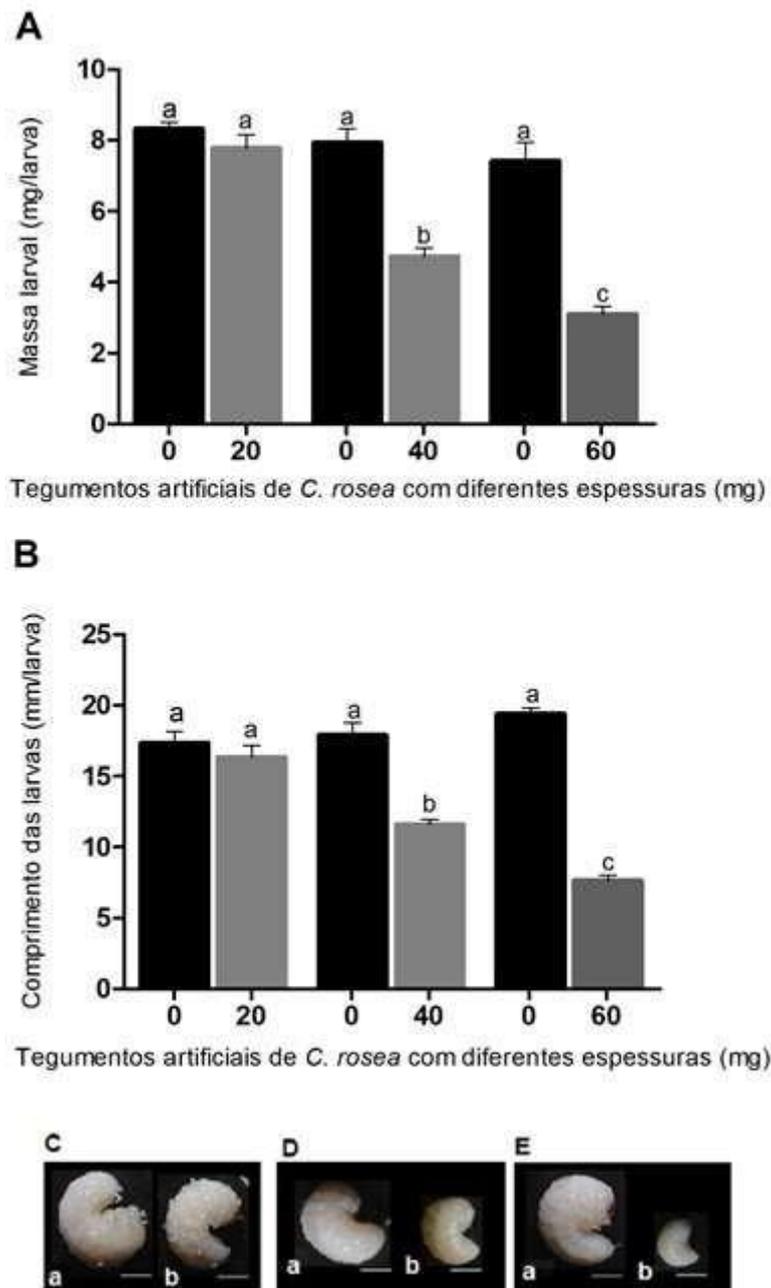


Figura 16: Avaliação da interferência da espessura de tegmentos artificiais na massa e tamanho das larvas de *C. maculatus*. Avaliação das larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo tegmentos artificiais de diferentes espessuras e seus respectivos controles. **A:** Comparativo entre a média das massas das larvas (mg/larva). **B:** Comparativo do comprimento das larvas (mm/larva). **C:** Larvas retiradas de sementes artificiais de 420 mg. a: Larva da semente controle b: Larva da semente tratada. **D:** Comparativo do tamanho das larvas retiradas de sementes artificiais de 440 mg. a: Larva da semente controle. b: Larva da semente tratada. **E:** Comparativo do tamanho das larvas retiradas de sementes artificiais de 460 mg. a: Larva da semente controle de 460 mg. b: Larva da semente tratada. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$). Barras brancas indicam escala de 1 mm.

4.5 Avaliação da influência de compostos de cotilédones de *C. rosea* sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*

Analisando a influência da farinha de cotilédones sobre a oviposição e eclosão larval, observou-se que não houve diferença significativa nesses parâmetros comparando-se às sementes controle (Figura 17A-B). Ao avaliarmos as sementes no tempo de 7 DAO, verificamos que a média de penetração das larvas nas sementes controle foi de aproximadamente 83%, resultados similares aos das sementes contendo 10 e 20% de farinha de cotilédones de *C. rosea* (Figura 17B). Já nas sementes contendo concentrações de 1, 2 e 40% de farinha de cotilédones de *C. rosea* a eclosão foi de 100% (Figura 17B).

As sementes foram abertas no tempo de 20 DAO para análise de massa, comprimento e sobrevivência das larvas. Nas sementes contendo concentrações de 20 e 40% de farinha de cotilédones de *C. rosea* não foi possível encontrar nenhuma larva, apesar da penetração larval ter sido de 88,7 e 100%, respectivamente. As larvas encontradas nas sementes controle apresentaram massa média de aproximadamente 8,5 mg/larva, enquanto as larvas encontradas nas sementes contendo concentrações de 1 e 2% de *C. rosea* apresentaram, respectivamente, massas de 4,6 e 2,2 mg/larva (Figura 18A). Estes resultados indicam que a farinha de cotilédones de *C. rosea* possui componentes tóxicos que inibem o ganho de massa das larvas. A análise de comprimento mostrou que as larvas controle apresentaram uma média de comprimento de aproximadamente 42,1 mm/larva, enquanto as larvas das sementes contendo 1 e 2% da farinha teste apresentaram, respectivamente 24,8 e 15,5 mm/larva (Figura 18B).

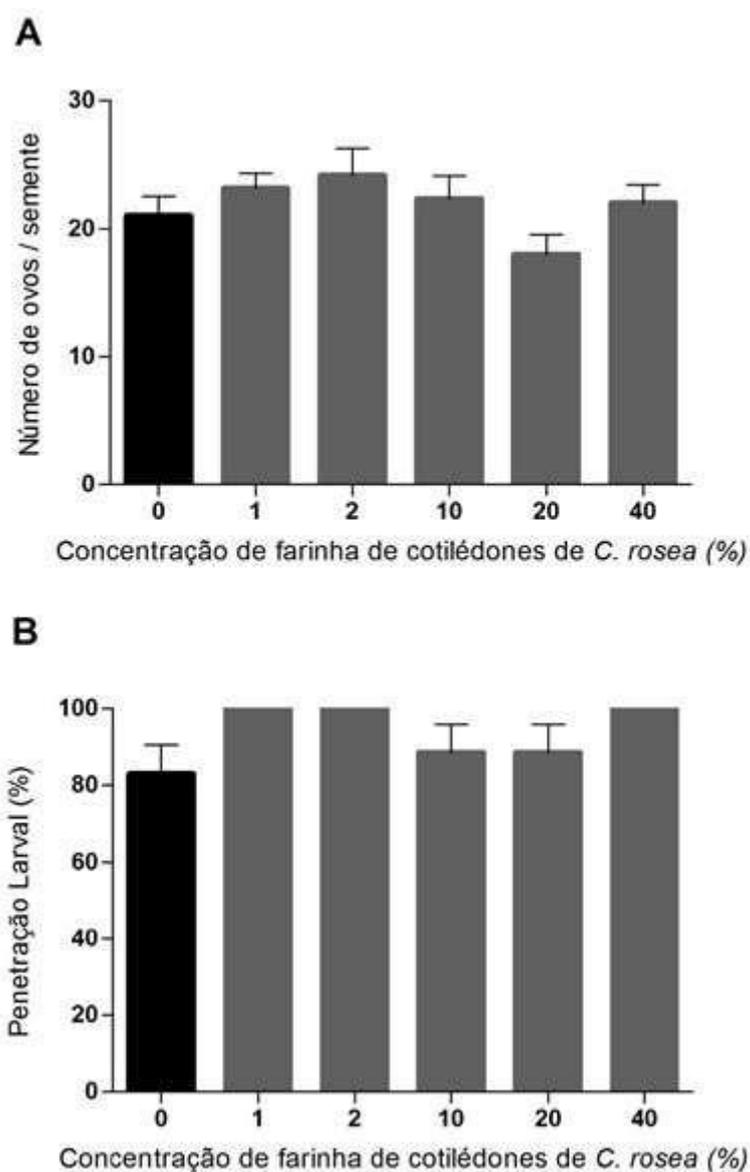


Figura 17: Avaliação da toxicidade de cotilédones de *Canavalia rosea* sobre os parâmetros de oviposição e penetração de *C. maculatus*. A: Número de ovos postos em sementes artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de cotilédones de *C. rosea* e em sementes artificiais utilizadas como controle. B: Percentual de penetração larval de *C. maculatus* em sementes artificiais (controles e testes) ao final de 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

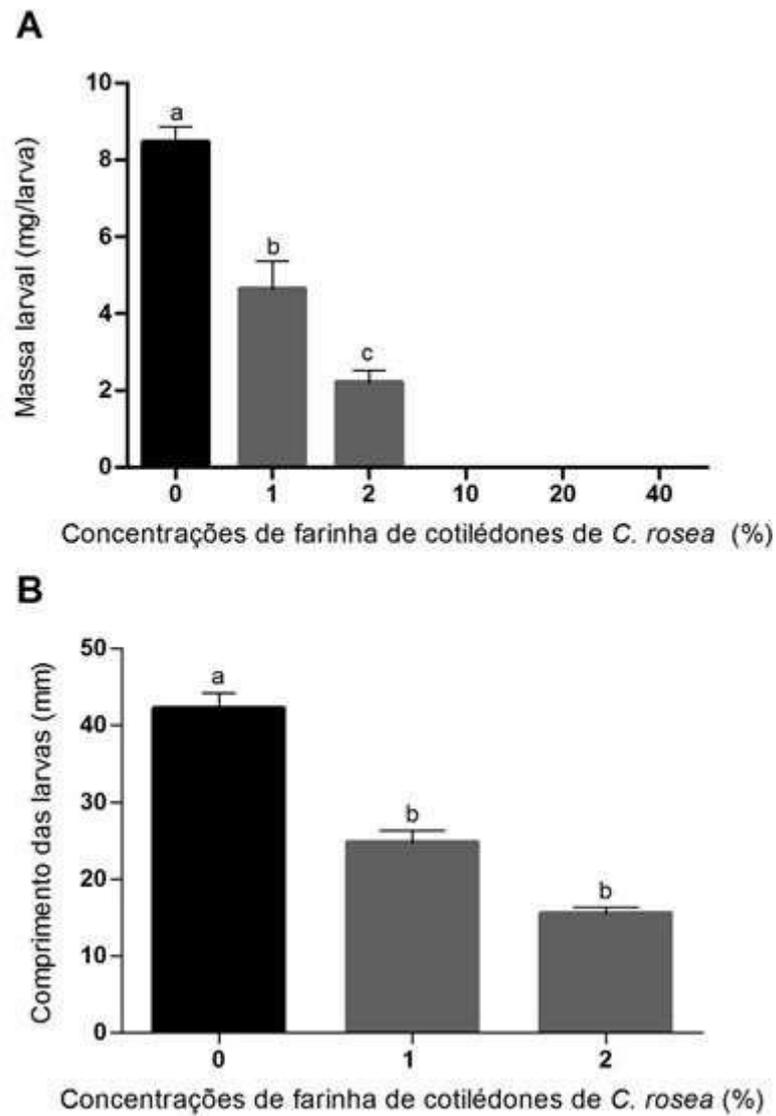


Figura 18: Interferência da ingestão de diferentes concentrações de cotilédones de *C. rosea* nos valores de massa e comprimento de larvas de *C. maculatus*. Análise de larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de cotilédones de *C. rosea* e com sementes artificiais utilizadas como controle. A: Valores em mg da média da massa das larvas B: Valores em mm da média do comprimento das larvas. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores representados por diferentes letras foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste com teste Tukey ($p < 0,05$).

A sobrevivência das larvas aos 20 DAO foi de aproximadamente 91,7% para as larvas controle e de 58,3 e 35,4%, respectivamente para as larvas desenvolvidas em sementes contendo 1 e 2% da farinha (Figura 19A). Na figura 19B é possível observar a diferença entre os tamanhos das larvas alimentadas exclusivamente com farinha de cotilédones de *V. unguiculata* (Figura 19B-a) e o tamanho das larvas alimentadas com sementes artificiais contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* (Figura 19B-b) e com sementes artificiais contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* (Figura 19B-c).

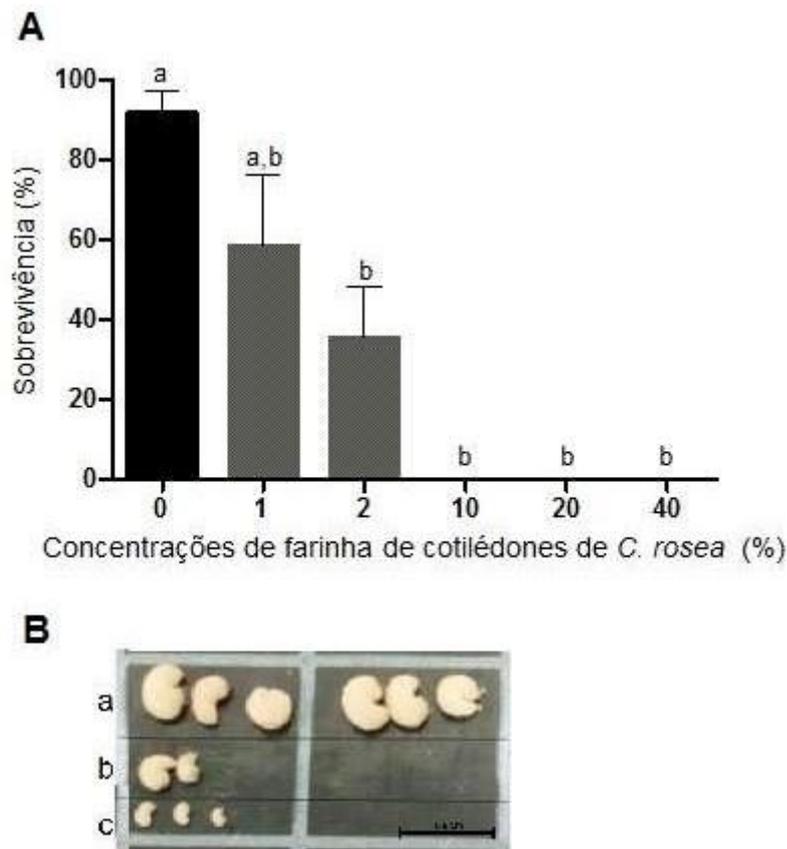


Figura 19: Interferência da ingestão de diferentes concentrações de cotilédones de *C. rosea* na sobrevivência e no tamanho de larvas de *C. maculatus*. A: Análise de sobrevivência das larvas de 20 DAO alimentadas com sementes artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de cotilédones de *C. rosea* e com sementes artificiais utilizadas como controle. B: Comparativo de tamanho das larvas de 20 DAO alimentadas com (a) sementes artificiais utilizadas como controle, (b) sementes artificiais contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e (c) sementes artificiais contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores representados por diferentes letras foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste com teste Tukey ($p < 0,05$).

4.5.1 Isolamento de frações proteicas de cotilédones de *C. rosea* e avaliação da toxicidade para *C. maculatus*

As frações F0-70% e F70-90% foram incorporadas em sementes artificiais na concentração de 1% e após o período de infestação observou-se que as frações não foram capazes de influenciar nos valores de oviposição. A média do número de ovos colocados nas sementes controle foi de aproximadamente 18 ovos/sementes, enquanto nas sementes incorporadas com 1% das frações F0-70% e F70-90%, de aproximadamente 17 ovos/sementes (Figura 20A). A penetração larval 7DAO também não foi alterada nas sementes experimentais (Figura 20B).

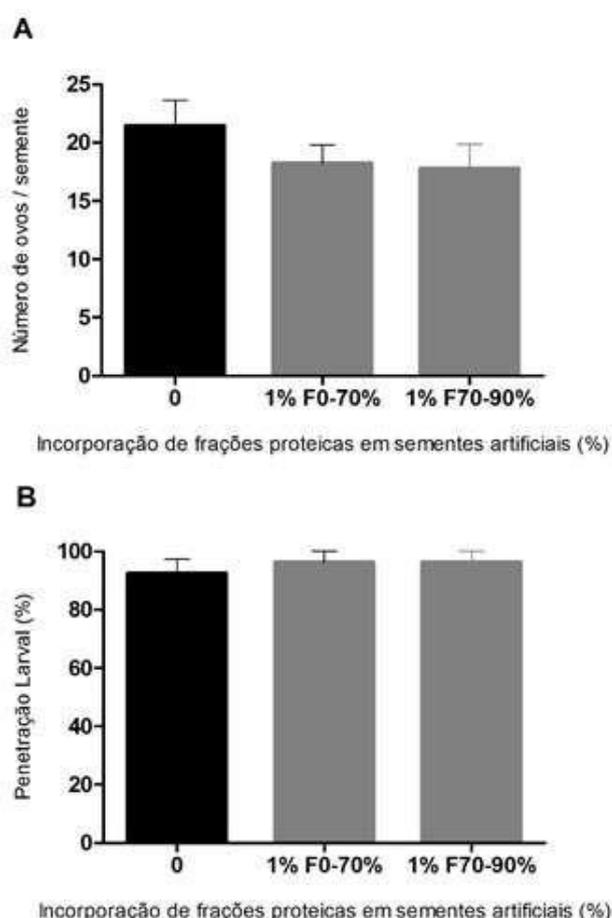


Figura 20: Interferência das frações F0-70% e F70-90% sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de *C. maculatus*. A: Número de ovos postos em sementes artificiais contendo frações proteicas incorporadas e em sementes artificiais utilizadas como controle após período de infestação. B: Percentual de penetração larval de *C. maculatus* em sementes artificiais (controles e testes) ao final de 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

Ao final de 20 DAO, as sementes artificiais foram abertas, as larvas encontradas foram retiradas, suas massas foram medidas e sua sobrevivência foi avaliada. As análises de sobrevivência mostraram que as frações F0-70% e F70-90% influenciaram negativamente na sobrevivência. Enquanto 100% das larvas das sementes controle sobreviveram, a sobrevivência nas sementes contendo 1% das frações F0-70% e F70-90% foi de 70 e 62,5%, respectivamente (Figura 21).

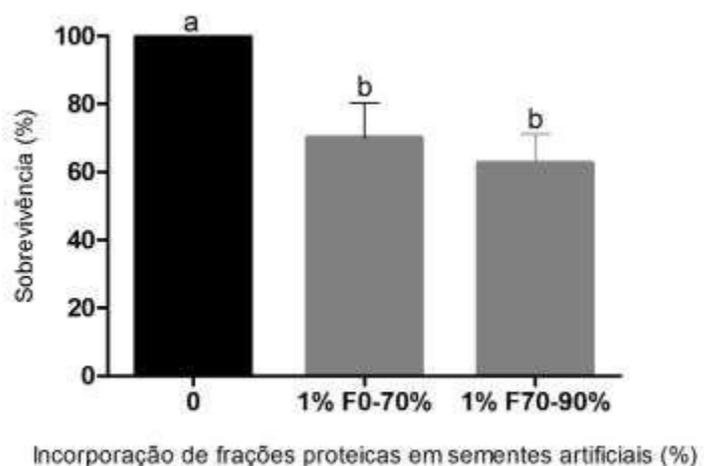


Figura 21: Análise da interferência das frações F0-70% e F70-90% na sobrevivência de larvas do *C. maculatus*. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$). Barras brancas indicam escala de 1 mm.

As análises de massa larval realizadas nas larvas 20 DAO mostraram que, nas sementes controle, a média de massa foi de 8,2 mg/larva. Já nas sementes artificiais contendo 1% da F0-70%, as larvas apresentavam massas de 2,74 mg/larva. Os valores de massas das larvas alimentadas com 1% da F70-90% foram ainda menores, com médias de 1,9 mg/larva (Figura 22A). Imagens obtidas através de um estereoscópio acoplado a uma câmera mostram a diferença de tamanho entre larvas do controle (Figura 22B-a e 22C-a) e as larvas alimentadas com 1% das frações (Figura 22 B-b e Figura 22C-b).

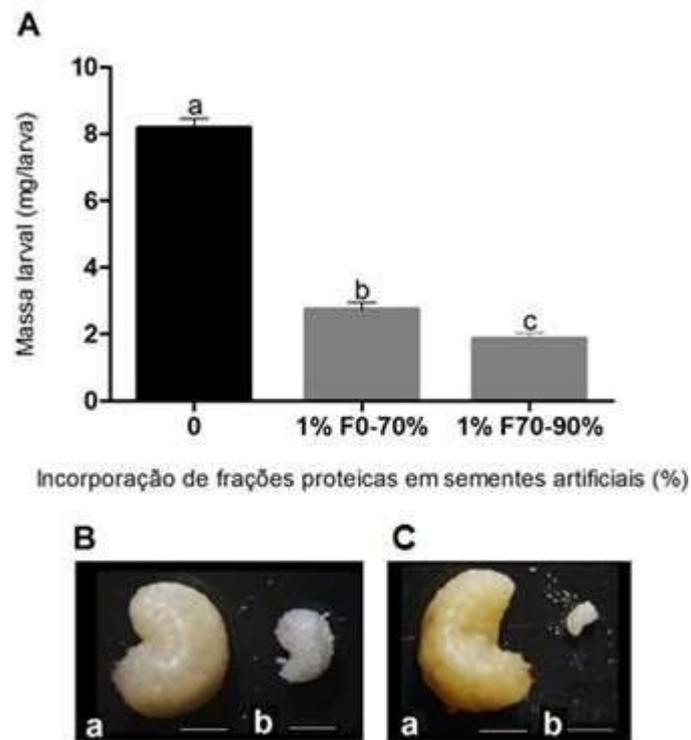


Figura 22: Análise da interferência das frações F0-70% e F70-90% sobre os valores médios de massa das larvas do *C. maculatus*. A: Valor médio das massas (mg/larva) das larvas de *C. maculatus* com 20 DAO retiradas de sementes artificiais contendo frações proteicas incorporadas e de sementes controle. B: Comparativo de tamanho entre larvas. a: larva do controle e b: larva de semente artificial contendo 1% da F0-70%. C: B: Comparativo de tamanho entre larvas. a: larva do controle e b: larva de semente artificial contendo 1% da F70-90%. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$). Barras brancas indicam escala de 1 mm.

4.6 Fracionamento das proteínas de cotilédones de *C. rosea* através de cromatografias

4.6.1 Fracionamento das proteínas da fração F0-70% por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

A fração F0-70% quando fracionada em cromatografia de troca iônica em matriz aniônica DEAE-Celulose apresentou uma predominância de proteínas na fração não retida (N RET DEAE), onde concentram-se as proteínas carregadas positivamente ou neutras. As frações retidas foram eluídas com soluções de NaCl 0,1 M, 0,3 M, 0,7 M e 1,0 M. Todas as proteínas retidas foram eluídas na concentração de NaCl 0,3M (Figura 23).

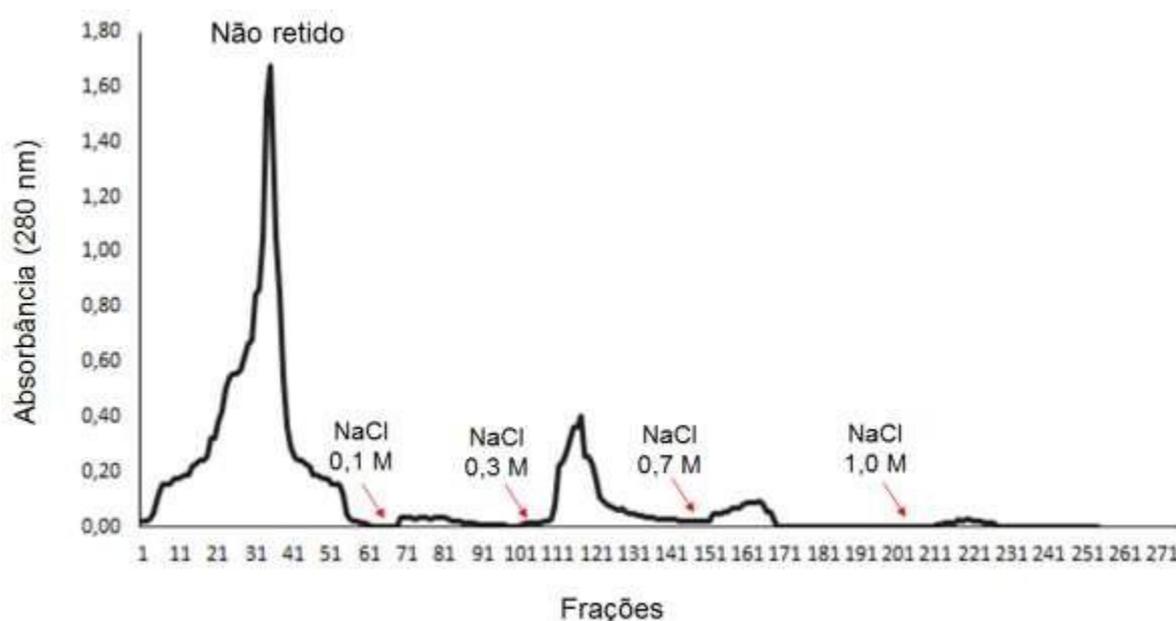


Figura 23: Perfil de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose das proteínas presentes na fração F0-70%. A fração não retida apresenta as proteínas eluídas com tampão Tris HCl. As frações retidas foram eluídas com concentrações de NaCl de 0,1, 0,3, 0,7 e 1,0M. A cromatografia se processou em fluxo de 1,33 mL/min e foram coletadas frações na proporção de 2,66 mL/tubo. As absorbâncias foram lidas a 280 nm.

4.6.2 Fracionamento das proteínas da fração F70-90% por cromatografia de afinidade em quitina

O fracionamento das proteínas da fração F70-90% por cromatografia de afinidade em quitina mostrou o perfil de dois picos, um não retido, onde se concentraram as proteínas que não apresentam afinidade a quitina e outro retido, eluído com HCl 0,1M (Figura 24), onde estão as proteínas que apresentam afinidade a quitina.

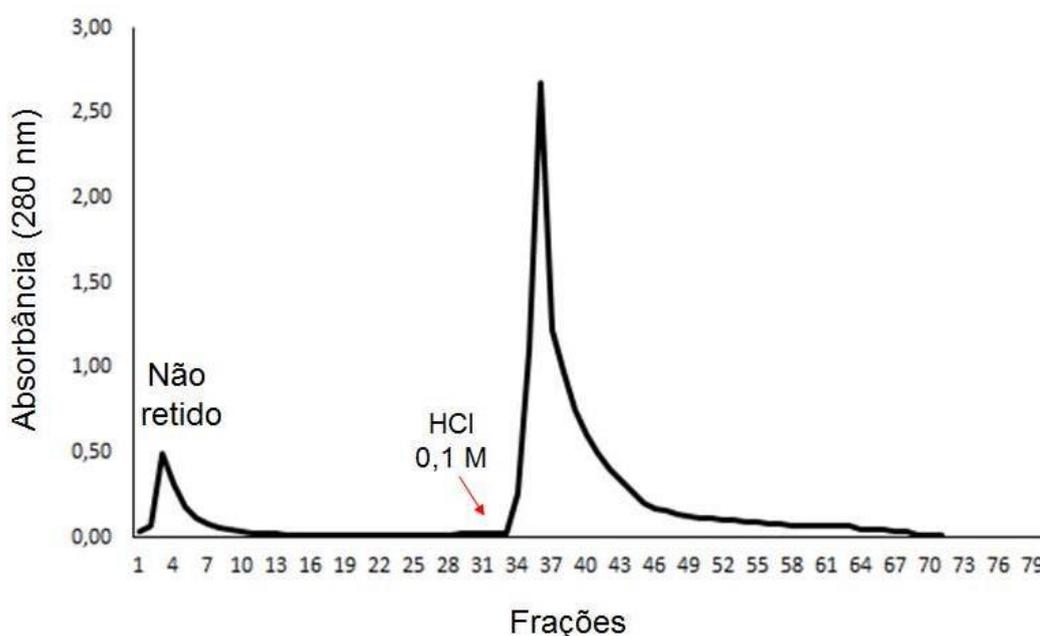


Figura 24: Perfil de cromatografia de afinidade à quitina das proteínas presentes na fração F70-90%. A fração não retida em quitina foi eluída com tampão acetato de sódio. As frações retidas em quitina foram eluídas com ácido clorídrico 0,1 M. A cromatografia foi processada em fluxo de 1,20 mL/min e foram coletadas frações de 2,66 mL/tubo. As absorbâncias foram lidas a 280 nm.

O perfil proteico das frações obtidas nas cromatografias foi visualizado em SDS-PAGE 12% (Figura 25). A fração RET QUIT apresentou proteínas majoritárias com massas moleculares entre aproximadamente 130 kDa e 48 kDa, com algumas bandas menos concentradas com massas abaixo de 30 kDa (Figura 25A).

A fração N RET DEAE apresentou bandas majoritárias, com massas moleculares de aproximadamente 130, 48, 30 e algumas abaixo de 28 kDa (Figura 25B).

A fração 0,3 M DEAE foi a que apresentou bandas proteicas menos concentradas, podendo serem destacadas algumas acima de 100 kDa, e algumas poucas abaixo de 63kDa (Figura 25C).

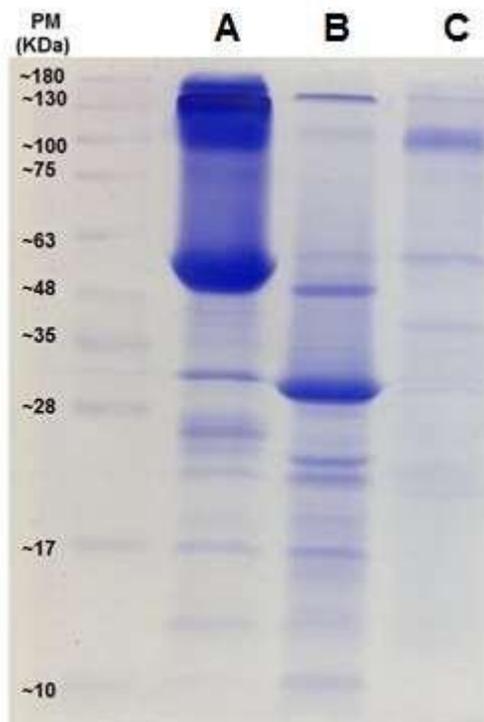


Figura 25: Visualização do perfil proteico em gel de eletroforese 12% das proteínas isoladas através de cromatografia. A: Proteínas obtidas em cromatografia de afinidade à quitina (fração retida). B: Proteínas obtidas através de troca iônica em DEAE-celulose (fração não retida). C: Proteínas obtidas através de troca iônica em DEAE-celulose (fração retida eluída em NaCl 0,3 M). PM indica os marcadores de massa molecular expressos em kDa.

4.6.4 Avaliação da toxicidade das frações proteicas sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*.

As frações cromatográficas (RET QUIT, N RET DEAE e 0,3 M DEAE) foram testadas na concentração de 1% e os resultados mostram que nenhuma das frações afetou a oviposição das fêmeas (24 HAO), com valores de ovos/semente de 19,3, 14,7, 19,7 e 17,7 nas sementes artificiais controle e contendo as frações RET QUIT, N RET DEAE e 0,3 M DEAE, respectivamente (Figura 26A).

Avaliando o parâmetro de penetração das larvas também não foram observadas diferenças entre os experimentos. Uma média próxima a 94% de eclosão foi observada nas sementes controle e nas sementes contendo a fração N RET DEAE. Nas sementes contendo as frações 0,3 M DEAE e RET QUIT a eclosão larval foi de 88,7 e 77,3%, respectivamente (Figura 26B).

Todas as frações mostraram alta toxicidade para as larvas quando avaliada a sobrevivência no tempo de 20 DAO. Enquanto aproximadamente 94,3% das larvas alimentadas com sementes controle sobreviveram, nenhuma das larvas alimentadas com as frações encontravam-se vivas (Figura 27A). Apesar das larvas terem eclodido, todas foram encontradas mortas logo no início dos túneis cavados (Figura 27B-D). Não foi possível estabelecer a massa das larvas encontradas devido a seu tamanho ser igual ou inferior a 0,1 mm (Figura 27B-D). A Figura 27-E mostra, a título de comparação de tamanho, uma larva de 20 DAO retirada de uma semente artificial controle (Figura 27E-a), um ovo retirado de uma semente artificial contendo 1% da fração RET QUIT após a eclosão (Figura 27E-b) e uma larva encontrada morta em uma semente artificial contendo 1% da fração RET QUIT (Figura 27E-c).

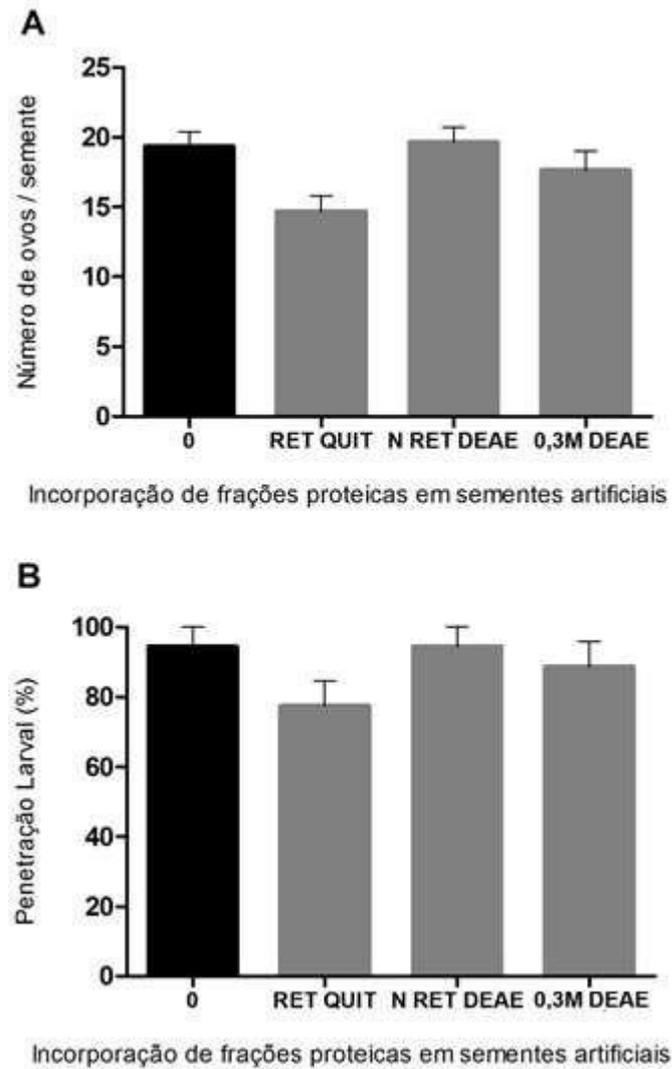


Figura 26: Interferência das frações proteicas isoladas por cromatografia sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de *C. maculatus*. A: Número de ovos postos após período de infestação em sementes artificiais contendo 1% frações proteicas incorporadas e em sementes artificiais utilizadas como controle. B: Percentual de penetração larval de *C. maculatus* em sementes artificiais (controles e testes) ao final de 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os valores apresentados de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$).

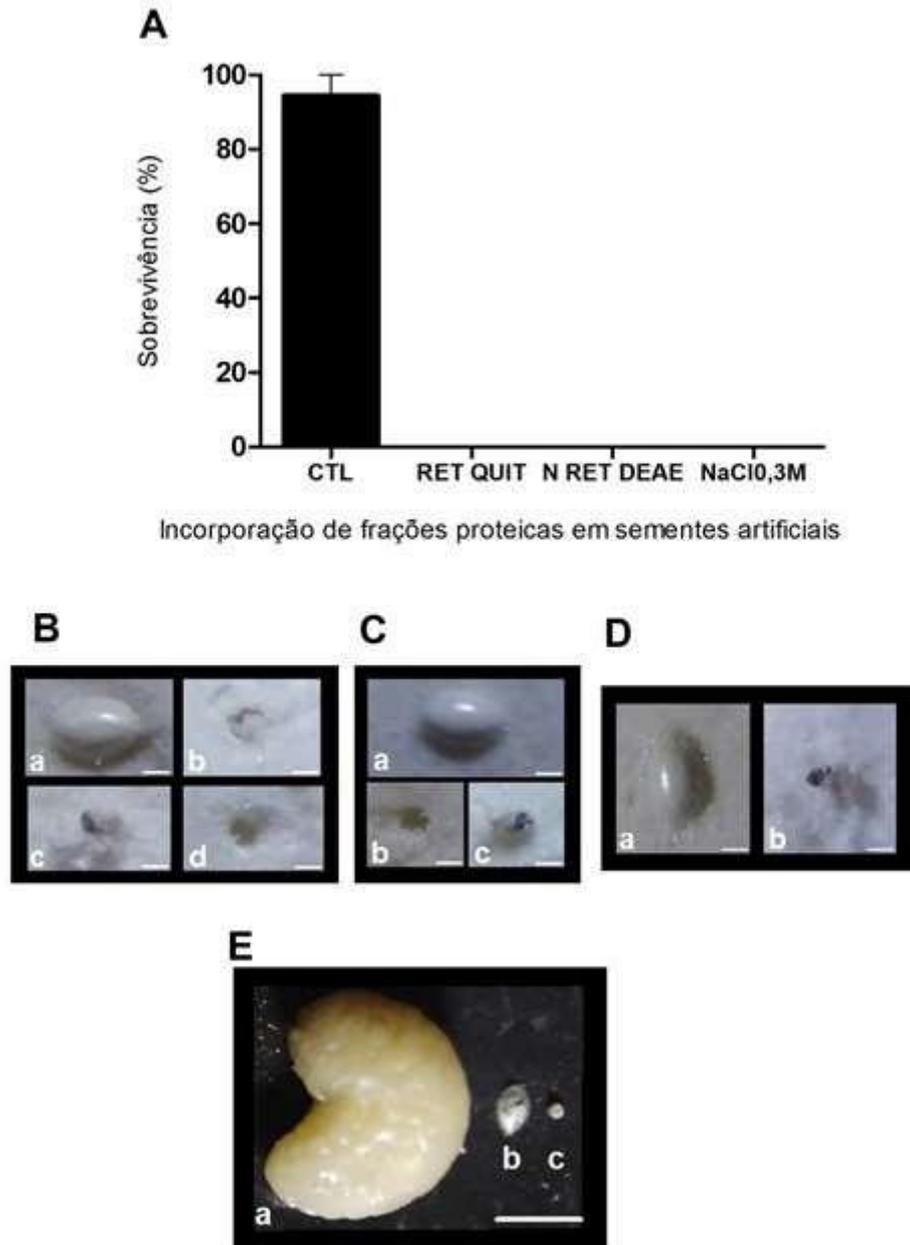


Figura 27: Análise da interferência das frações obtidas por cromatografia na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *C. maculatus*. **A:** Sobrevivência de larvas alimentadas com sementes controle e sementes contendo 1% de diferentes frações obtidas através de cromatografias. **B:** Ovo e larva retirados com 20 DAO de sementes artificiais contendo 1% da fração RET QUIT. a: ovo eclodido com 7 DAO. b: larva encontrada morta em túnel por ela escavado. c: larva morta. d: túnel escavado por larva. **C:** Ovo e larva retirados com 20 DAO de sementes artificiais contendo 1% da fração N RET DEAE incorporada a: ovo eclodido com 7 DAO. b: túnel escavado por larva c: larva morta. **D:** Ovo e larva retirados com 20 DAO de sementes artificiais contendo 1% da fração 0,3 M DEAE. a: ovo eclodido com 7 DAO. b: larva morta. Barras brancas indicam escala de 0,1 mm. **E:** Comparativo tamanho das larvas a: Larvas alimentadas com semente controle após 20 DAO. b: Ovo eclodido com 7 DAO retirado de semente artificial contendo 1% de fração RET QUIT. c: larva encontrada morta em semente artificial contendo 1% de fração RET QUIT. Barras brancas correspondem à escala de 1mm.

4.7 Quantificação de glicose, proteínas, triacilgliceróis e colesterol nas larvas

A quantificação de glicose, proteínas, triacilgliceróis e colesterol foi realizada com larvas retiradas 20 DAO de sementes artificiais contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea*, 1% das frações F0-70% e F70-90% e de sementes artificiais contendo 60 mg de tegumento artificial (TEG E60). Para as dosagens controle (CTL) foram utilizadas larvas de 20 DAO, desenvolvidas em sementes artificiais compostas por 400 mg de farinha de *V. unguiculata*. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata experimental utilizando larvas de ensaios biológicos independentes. Os dados foram expressos em quantidades por mg de larva e também em quantidades totais detectadas por larva.

4.7.1 Quantificação de proteínas

Para os valores de proteínas expressos por mg de larva (Figura 28A) é observada uma quantidade menor de proteínas em larvas controle e alimentadas com 1% da fração F0-70%. As larvas desenvolvidas em 1 e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* apresentaram maiores valores de proteínas/mg (aproximadamente 101,5 e 124,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de larva respectivamente). As larvas retiradas das sementes contendo 1% da fração F70-90% e das sementes com 60 mg tegumento artificial apresentaram valores similares estatisticamente (Figura 28A).

Ao se expressarem as quantidades das proteínas por larva, verificou-se que as larvas controle apresentam os maiores valores, enquanto as larvas alimentadas com 1% da fração F0-70% apresentaram os níveis mais baixos (Figura 28B).

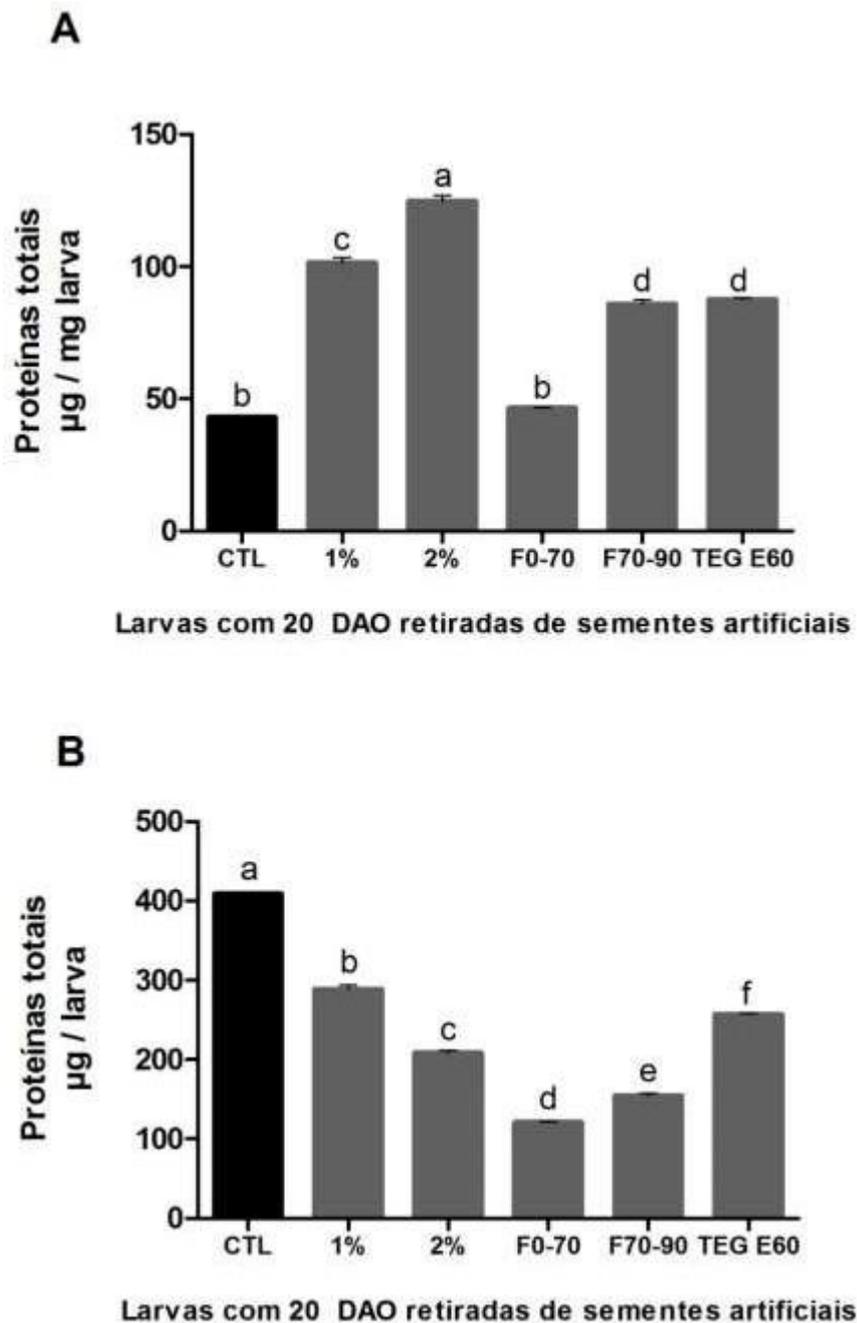


Figura 28: Quantificação de proteínas totais em larvas com 20 DAO. A: Quantidade de proteína (μg) por mg de larva. B: Quantidade de proteína (μg) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

4.7.2 Quantificação de glicose

Ao se analisarem os níveis de glicose/mg de larva, verificou-se que as larvas retiradas das sementes controle mostraram valores significativamente menores que as larvas das sementes contendo 1 e 2% de farinha de cotilédones. Esses valores se mostraram significativamente maiores com relação às demais sementes testes. Os menores valores de glicose foram encontrados nas larvas das sementes contendo 1% das frações F0-70% e F70- 90% e nas sementes com 60 mg tegumento artificial de *C. rosea*: aproximadamente 12,9; 7,9 e 3,0 μg de glicose por mg de larva (Figura 29A).

Quando os valores foram expressos por larva, observou-se que todas as larvas desenvolvidas nas sementes experimentais apresentaram valores inferiores aos das larvas controle. Os menores valores foram obtidos nos experimentos com 1% da fração F70-90% e tegumentos artificiais de 60 mg (Figura 29B).

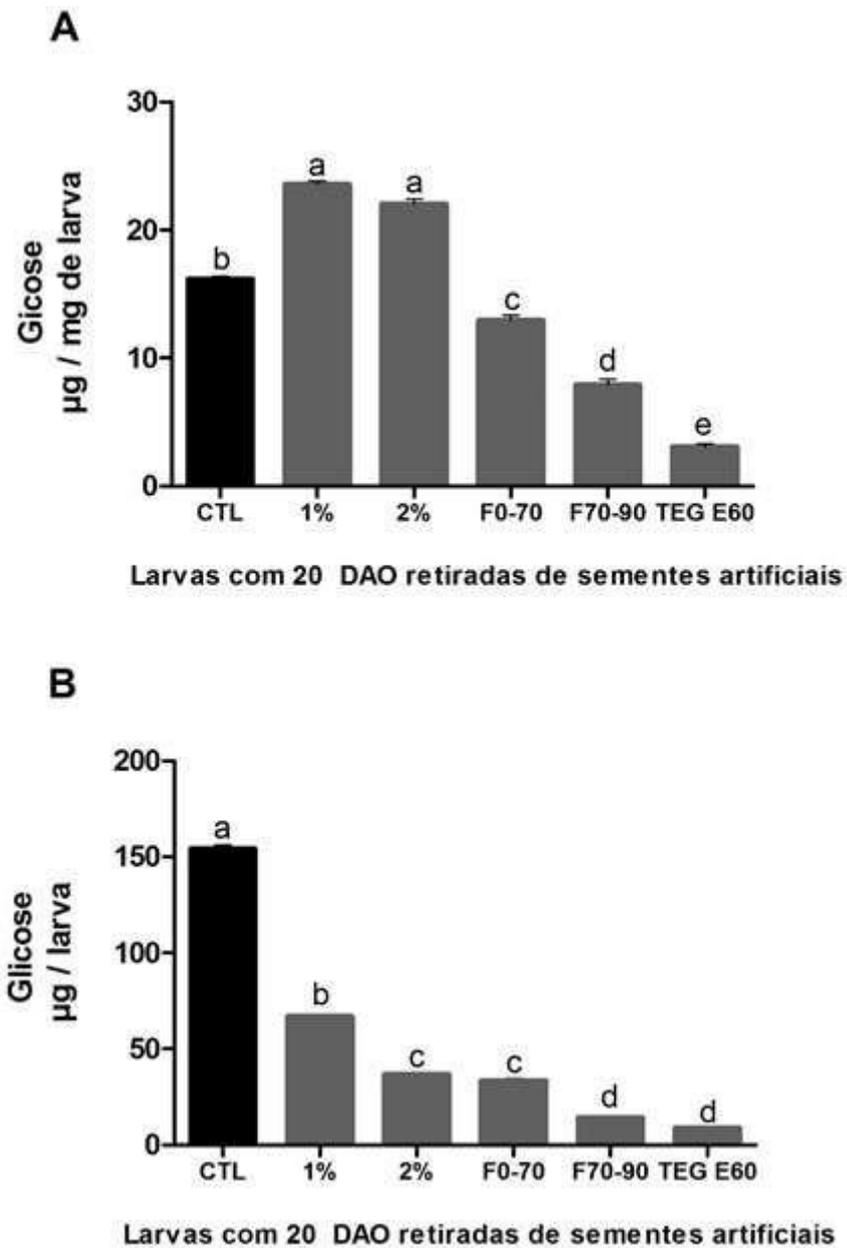


Figura 29: Quantificação de glicose em larvas com 20 DAO. A: Quantidade de glicose (μg) por mg de larva. B: Quantidade de glicose (μg) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

4.7.3 Quantificação de triacilgliceróis

Os resultados mostraram que os maiores valores de triacilgliceróis /mg de larva foram encontrados em larvas retiradas da semente controle e das sementes contendo 1% da fração F0-70% (aproximadamente 9,6 e 10,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de larva respectivamente), não apresentando diferença estatística significativa entre si. Os valores encontrados nas larvas das sementes contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e 1% da fração F70-90% não possuem diferença estatística significativa quando comparados entre si, porém são significativamente diferentes das larvas encontradas nas sementes controle e nas sementes com 1% da fração F0-70% (Figura 30A).

Ao se analisarem os níveis de triacilgliceróis por larva, verificou-se que as larvas retiradas das sementes controle são as que apresentam maiores valores (aproximadamente 91,2 $\mu\text{g}/\text{larva}$). Estes valores possuem diferença estatística significativa quando comparados a todos os outros dados. Os valores encontrados nas larvas das sementes contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e 1% da fração F70-90% foram os menores valores (Figura 30B).

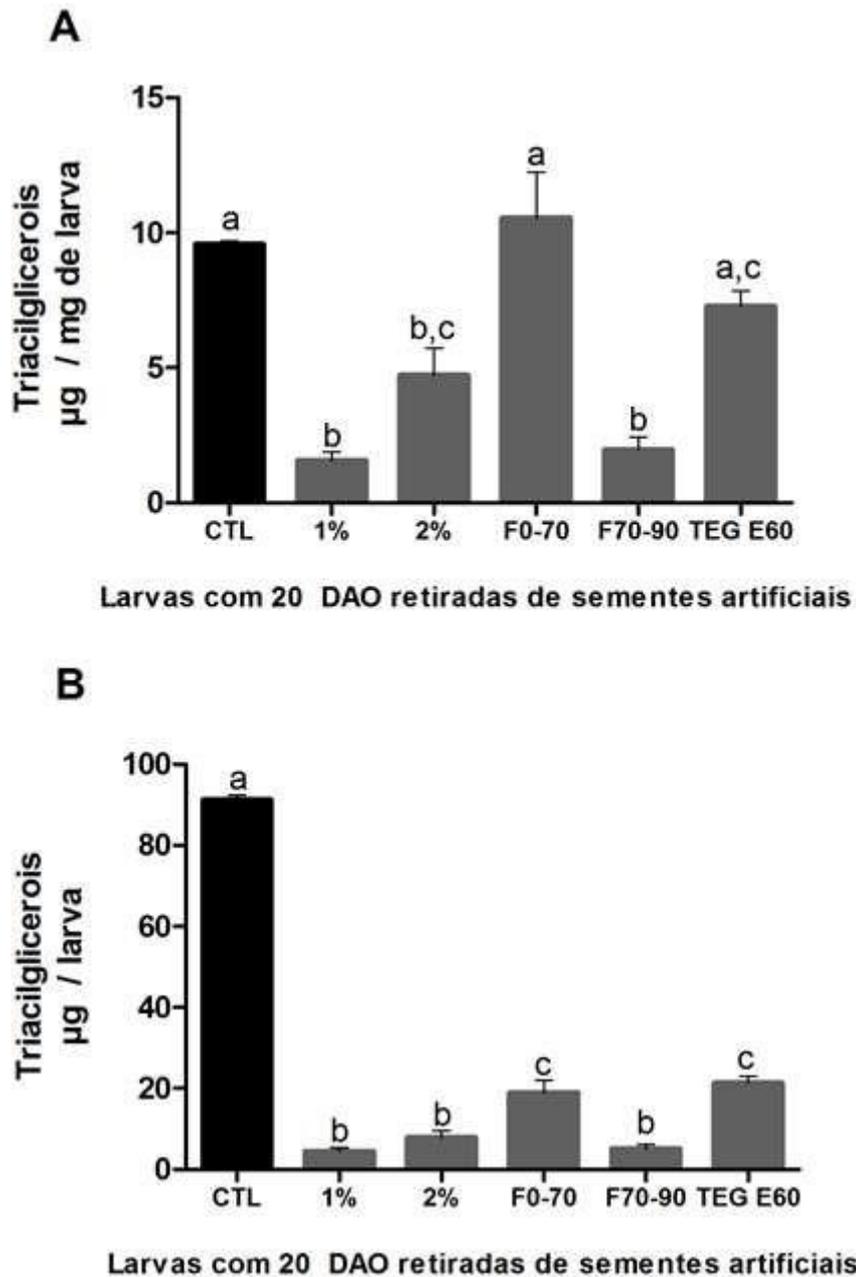


Figura 30: Quantificação de triacilglicerois em larvas com 20 DAO. A: Quantidade de triacilglicerois (μg) por mg de larva. B: Quantidade de triacilglicerois (μg) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

4.7.4 Quantificação de colesterol

Os menores valores de colesterol encontrados por mg de larva foram encontrados em larvas retiradas das sementes controle (aproximadamente 0,99 µg/mg de larva), não apresentando diferença estatística significativa entre os valores encontrados em larvas de sementes artificiais contendo 1% das frações F0-70% e F70-90% e de sementes artificiais contendo 60 mg de tegumento artificial (aproximadamente 1,94; 2,7 e 1,4 µg/mg de larva, respectivamente). Os maiores valores foram expressos por larvas de sementes contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* (aproximadamente 4,3 e 3,3 µg/mg de larva), apresentando diferença estatística significativa quando comparados entre si e quando comparados com larvas retiradas de outras sementes testes (Figura 31A).

Ao se analisarem os valores de colesterol por larva, observa-se que os valores são similares entre si. Assim como os resultados mostrados na Figura 30A (µg/mg de larva), as larvas retiradas de sementes contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* foram as que obtiveram maiores valores de colesterol em µg por unidade de larva, apresentando diferença estatística significativa quando comparados com os demais valores, exceto os valores das larvas das sementes controle e das larvas das sementes contendo 1% da fração F70-90% (Figura 31B).

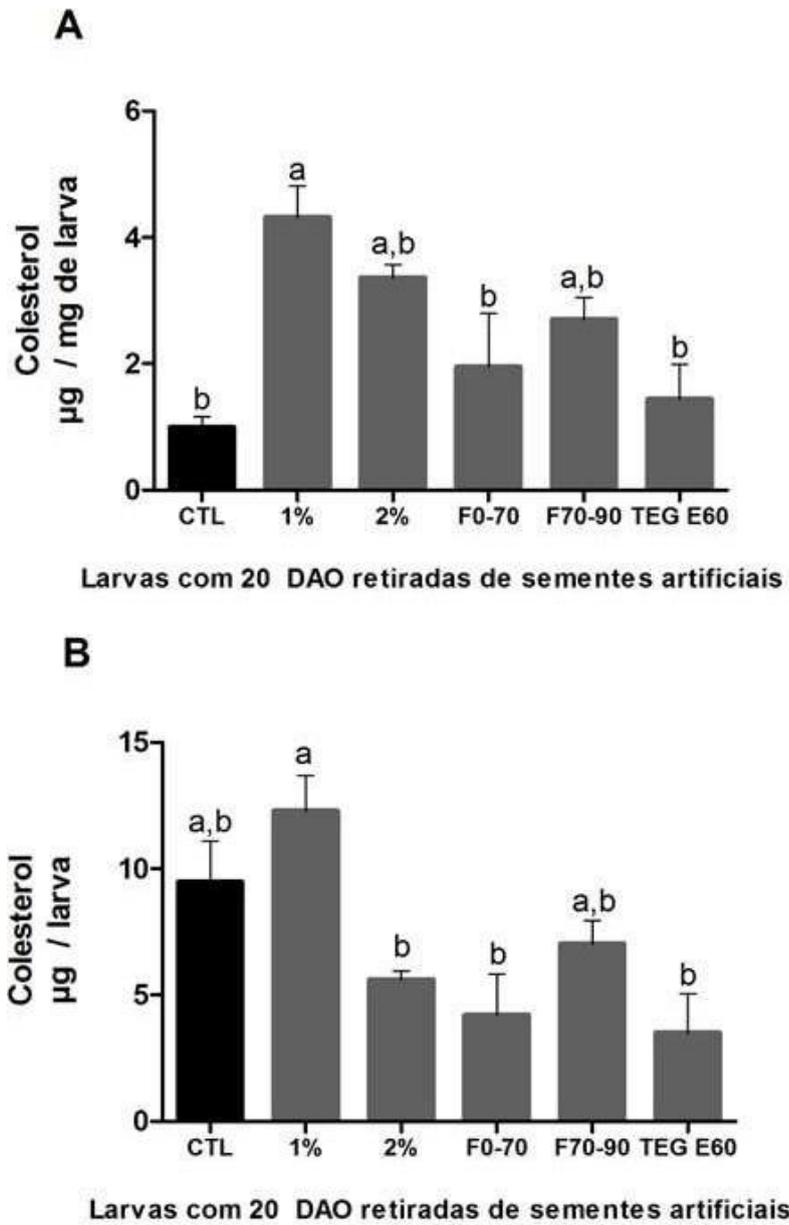


Figura 31: Quantificação de colesterol em larvas com 20 DAO. A: Quantidade de colesterol (μg) por mg de larva. B: Quantidade de colesterol (μg) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes

4.8 Quantificação da atividade de enzimas digestivas das larvas

A quantificação da atividade de enzimas importantes (protease cisteínica, lipase e α -amilase) em larvas de *C. maculatus* foi realizada com larvas 20 DAO obtidas de sementes artificiais contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea*, 1% das frações F0-70% e F70-90%, de sementes artificiais contendo 60 mg de tegumento artificial de *C. rosea* e seus respectivos controles. Para as dosagens controle (CTL) foram usadas larvas de 20 DAO, desenvolvidas em sementes artificiais compostas por 400 mg de farinha de *V. unguiculata*. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata experimental utilizando larvas de ensaios biológicos independentes. Os dados foram expressos em atividade por mg de larva e também em quantidades totais detectadas por larva.

4.8.1 Quantificação da atividade de proteases cisteínicas

Os resultados mostraram que a atividade de proteases cisteínicas das larvas retiradas do controle e de sementes artificiais contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* são menores que os demais dados. Em larvas retiradas das sementes artificiais contendo 2% de farinha de cotilédones e 1% da fração de F70-90% a atividade/mg de larva foi aproximadamente o dobro da atividade das larvas controle (Figura 32A).

Os resultados de atividade apresentados por larva mostraram que as larvas obtidas das sementes testes apresentaram atividades inferiores a larva controle (Figura 32B).

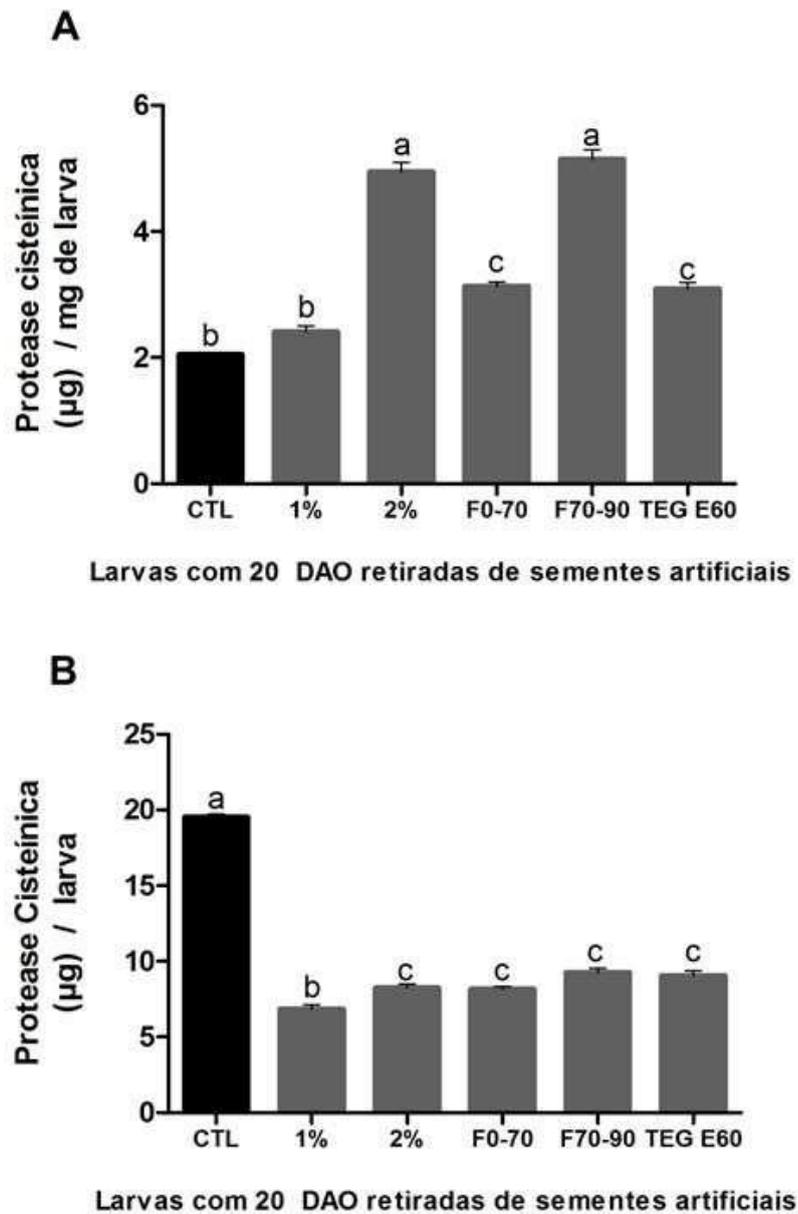


Figura 32: Quantificação da atividade de proteases cisteínicas em larvas com 20 DAO. A: Atividade da enzima (µg) por mg de larva. B: Atividade da enzima (µg) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

4.8.2 Quantificação da atividade de lipases

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre as atividades de lipases em mU/mg de larva encontradas nas larvas retiradas das sementes artificiais utilizadas como controle e das sementes artificiais contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e contendo 1% da F0-70%. O único decréscimo significativo na atividade da enzima com relação ao controle foi referente às larvas retiradas das sementes contendo 60 mg de tegumento artificial de *C. rosea*. Foi possível observar um aumento nos valores de atividade da enzima das larvas retiradas das sementes artificiais contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e 1% da F0-70% quando comparados aos das larvas controle (Figura 33A).

Houve um decréscimo significativo nos valores de atividades por larva em todas as concentrações testadas. Os resultados mostraram ainda um decréscimo maior entre as larvas retiradas das sementes contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea*, 1% da fração F70-90% e em sementes artificiais contendo 60 mg de tegumento artificial de *C. rosea* (Figura 33B).

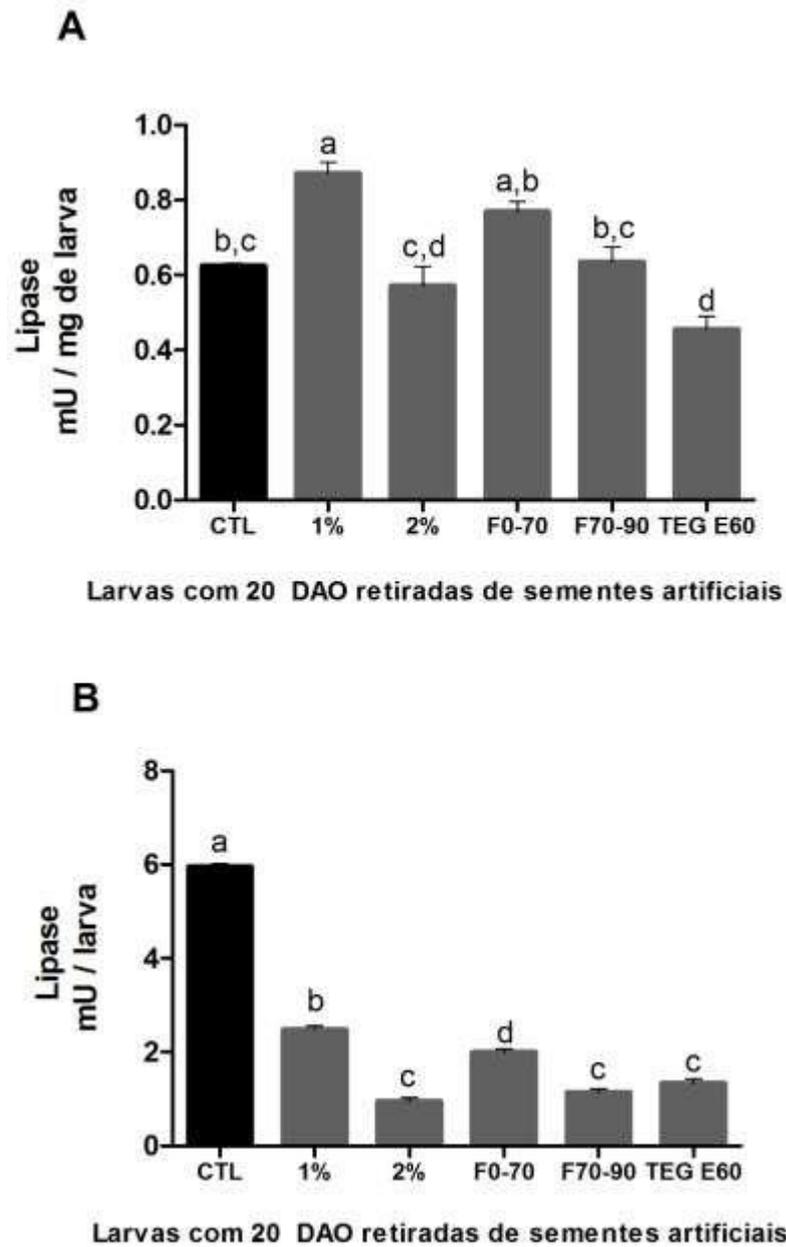


Figura 33: Quantificação da atividade de lipases em larvas com 20 DAO. A: Atividade da enzima (mU) por mg de larva. B: Atividade da enzima (mU) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

4.8.3 Quantificação da atividade de α -amilases

As análises da atividade de α -amilases em mU por mg de larva mostraram que as larvas controle apresentaram valores inferiores as demais larvas. A atividade foi significativamente maior em larvas retiradas das sementes artificiais contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea*. Não houve diferença estatística significativa entre as larvas das sementes contendo 1% da fração F0-70% e das sementes com 60 mg de tegumento artificial (Figura 34A). Mesmo quando a análise da atividade enzimática é realizada por larva, as atividades das larvas do controle são significativamente menores quando comparadas às demais, exceto pelo valor encontrado nas larvas de sementes contendo 1% da F0-70% (Figura 34B). Assim como indicado nos resultados da Figura 33A, a atividade enzimática foi significativamente mais alta em larvas de sementes contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* (Figura 34B).

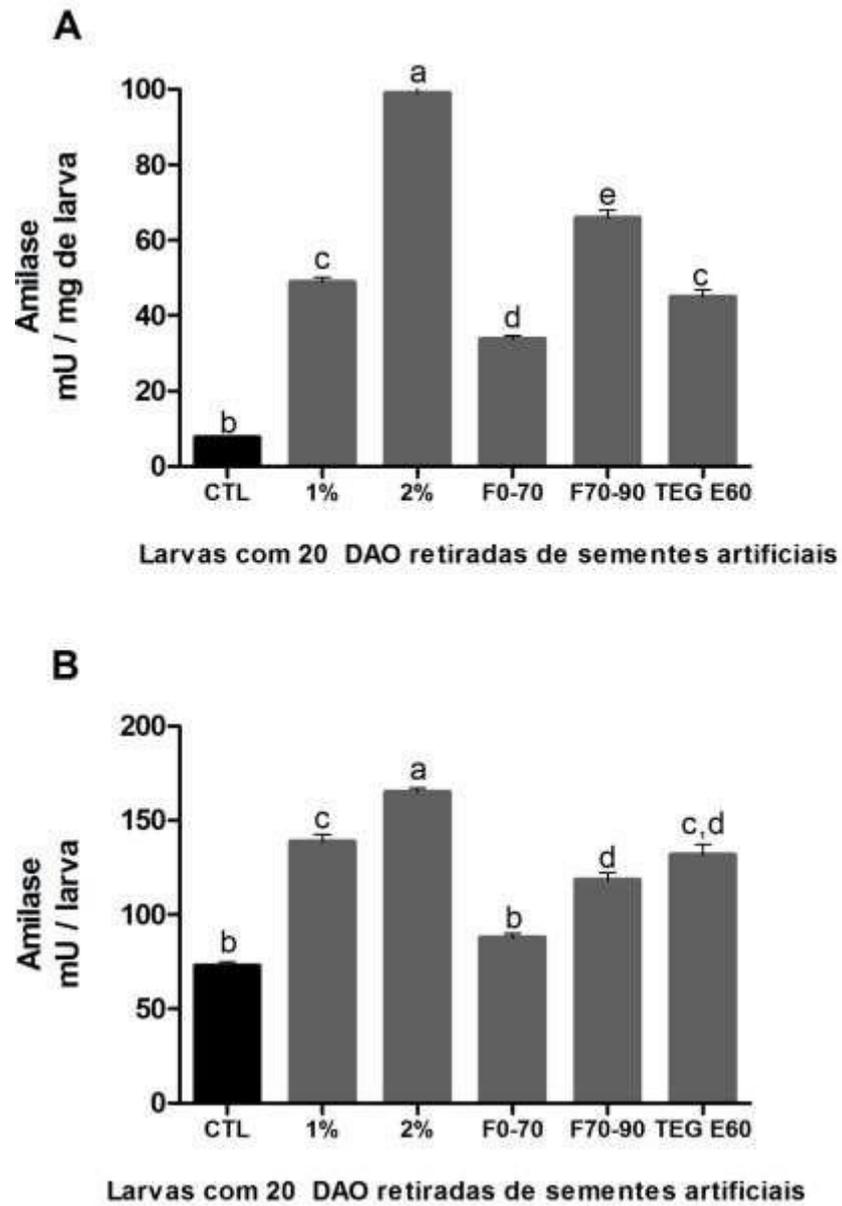


Figura 34: Quantificação da atividade de α -amilases em larvas com 20 DAO. A: Atividade da enzima (mU) por mg de larva. B: Atividade da enzima (mU) por unidade de larva. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores que apresentam diferença estatística significativa de acordo com teste Tukey ($p < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

5. DISCUSSÃO

Estima-se que a população mundial alcance a marca de 7,79 bilhões até o final de 2020. Para suprir a demanda alimentícia atualmente, estima-se que sejam necessárias aproximadamente 300 milhões de toneladas de proteínas ao ano. Como a expectativa de crescimento populacional anual é de aproximadamente 1,5% (FAO, 2019; ONU, 2020), faz-se necessário o aumento proporcional da produção de alimentos de forma a suprir as novas demandas.

As sementes representam uma importante fonte de nutrientes para a alimentação humana, principalmente de proteína, oferecendo uma maior relação entre custo e benefício com relação às proteínas animais. As leguminosas são consideradas as principais fontes de proteína no mundo em desenvolvimento principalmente para as populações de baixa renda em regiões subtropicais e tropicais (ASIF *et al.*, 2013). Algumas espécies de feijão, como *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e a *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) são fontes de proteínas (20-25%), além de carboidratos (50-60%) e lipídios (1-2%) (MOURA *et al.*, 2007).

Por estes motivos, o mercado nesta área tem crescido exponencialmente em todo o mundo, inclusive no Brasil. O Brasil é o terceiro maior produtor na indústria de grãos, movimentando aproximadamente 10 bilhões de reais por ano (ABRATES, 2019). A produção de sementes, porém, muitas vezes é prejudicada, depois da colheita, durante o período de estocagem, devido principalmente aos ataques de insetos, como os bruquídeos. Representantes da ordem Coleóptera, família Chrysomelidae e subfamília Bruchidae, os bruquídeos representam mais de 1700 espécies de 62 gêneros em todo o mundo e aproximadamente 20 espécies de bruquídeos são conhecidas como pragas de sementes armazenadas em diversas culturas pelo mundo (ROMERO & JOHNSON, 2004), sendo os responsáveis pelas perdas mais severas na produção de grãos (TSIALTAS; IRAKLI; LAZARIDOU, 2018). Estes ataques acarretam no decréscimo do valor comercial e nutricional destas sementes, por reduzirem seus pesos e seu poder germinativo e produtivo, tornando-as impróprias para comercialização e, conseqüentemente, causando prejuízos econômicos (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002; BECK; BLUMER, 2007; DE SÁ *et al.*, 2014).

Dentre as espécies mais estudadas de bruquídeos, destacam-se o *Callosobruchus chinensis* e o *Callosobruchus maculatus*, ambos responsáveis por perdas nas culturas de feijão mungo (*Vigna radiata*) e *Vigna unguiculata*. Em épocas de grandes infestações, o prejuízo no armazenamento de *V. unguiculata* pode atingir até 100% do estoque (SOMTA *et al.*, 2007; TRIPATHY, 2016).

Para minimizar os danos causados pelos ataques de pragas, faz-se necessário o aumento da utilização de componentes químicos, como por exemplo, a utilização de pesticidas do tipo fumegantes para combate a pragas de grãos armazenados. Porém, o uso indiscriminado destes componentes pode causar graves impactos sobre a saúde humana e o meio ambiente (PERES MOREIRA, 2003; WAR *et al.*, 2017). Alguns estudos relatam que a eficácia de agrotóxicos não ultrapassa o percentual de 7%, sendo, portanto, pouco eficientes no controle de pragas. Além disso, algumas espécies de pragas já se apresentam resistentes a estes produtos químicos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

As sementes, por serem alvos frequentes de ataque de pragas e patógenos, devido a sua grande reserva energética e, por representarem o meio de propagação das espécies, desenvolveram mecanismos de defesa constitutivos como forma de se defenderem destes ataques. Sendo assim, já apresentam em seus tecidos uma extensa diversidade de compostos químicos que atuam como defensivos e que, ao concentrar-se constitutivamente nestes tecidos, conferem resistência contra diversos tipos de predadores (HARUTA *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002).

Estes fatos justificam a necessidade de aprofundamento em pesquisas na área dos mecanismos de defesa naturais das plantas, visando a projeção de técnicas que combatam as pragas e reduzam os prejuízos, minimizando os riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Para isto, é importante que se compreenda as características bioquímicas e os mecanismos de ação destes compostos vegetais. Diversas publicações apontam o estudo do envolvimento de proteínas vegetais como mecanismos de defesa das plantas, como arcelinas, quitinases, canatoxinas, vicilinas, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) dos tipos 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas e glicohidrolases (OLIVEIRA *et al.*, 1999; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2008; BLAIR *et al.*, 2010; ALEXANDRE *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018).

O estudo do mecanismo de toxicidade em sementes não-hospedeiras visa caracterizar qualquer resistência que não esteja presente em sementes suscetíveis ao ataque de *C. maculatus* (DE SÁ *et al.*, 2018). O método de produção de sementes artificiais desenvolvido por Macedo *et al.* (1933) se mostrou eficaz para o processo de investigação de compostos tóxicos em sementes não-hospedeiras por permitir a incorporação destes compostos na alimentação dos insetos (UCHOA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2012). Conhecer o mecanismo de toxicidade tem se mostrado útil no desenvolvimento de estratégias eficientes para proteger culturas, como a utilização de tegumentos artificiais e uso de quitosana (derivado da quitina) em formulações que incluem um fungicida como revestimento artificial de sementes para evitar a colonização por fungos (GOOSEN MATTHEUS, 1996; ZIANI; URSÚA; MATÉ, 2010). Sementes do gênero *Canavalia* tem se mostrado bastante tóxicas para insetos (CARLINI *et al.*, 2002; STANISÇUASKI *et al.*, 2009; DEFFERRARI, *et al.*, 2011; CARRAZONI *et al.*, 2018), inclusive *C. maculatus* (OLIVEIRA *et al.*, 1999; DE SÁ *et al.*, 2018). A presença de uma variedade de compostos tóxicos, como o aminoácido não proteico canavanina e diversas proteínas como vicilinas, canavalina, lectina, concanavalina A, inibidores de proteases, canatoxina, ureases, dentre outros foi descrita para sementes dessa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 1999; CARLINI *et al.*, 2002). Foi observado também que larvas de *C. maculatus* não foram capazes de atravessar o tegumento de sementes naturais de *C. ensiformis* logo após o período de embriogênese (SOUZA *et al.*, 2011). Os efeitos tóxicos do tegumento de *Canavalia ensiformis* para o *C. maculatus* foram descritos por De Sá *et al.* (2018).

Apesar dos estudos com *C. ensiformis* mostrarem que essas sementes são ricas em compostos inseticidas, poucas sementes desse gênero são estudadas. Alguns estudos apontaram que *Canavalia rosea* apresenta atividade citotóxica para vírus, bactérias e fungos (MENDOZA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Janzen (1977) apontaram *Canavalia rosea* como uma das sementes não-hospedeiras que tinham efeitos na diminuição de oviposição de *C. maculatus*, entretanto os compostos tóxicos e o mecanismo de toxicidade para o inseto ainda não foram relatados.

Neste trabalho a toxicidade de sementes de *Canavalia rosea* para o desenvolvimento do *Callosobruchus maculatus* foi investigada. Nossos resultados mostraram que as sementes naturais de *C. rosea* são resistentes a infestação de *C. maculatus*. Os tegumentos naturais de sementes de *C. rosea* causaram uma inibição

na oviposição, na eclosão larval e na sobrevivência das larvas após o período de embriogênese.

O tegumento é o revestimento externo, sendo a primeira parte da semente a ser atacada durante a predação por bruquídeos e, por este motivo, atua como uma barreira protetora da semente. Alguns estudos mostraram que tegumentos de sementes não-hospedeiras podem bloquear a penetração de insetos e possuem compostos tóxicos que comprometeram a eclosão e sobrevivência de larvas de *C. maculatus* (SOUZA *et al.*, 2011; DE SÁ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016; DE SÁ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

Apesar dos tegumentos naturais de *C. rosea* terem influenciado nos fatores de oviposição, eclosão e sobrevivência das larvas, nenhuma anormalidade foi observada quando avaliado o desenvolvimento embrionário do inseto em ovos ovipositados sobre sementes naturais de *C. rosea*. Foi possível observar que todos os principais eventos do desenvolvimento embrionário, como o início da retração da banda germinal, o processo de fechamento dorsal, a definição dos segmentos torácicos e a presença dos apêndices de patas, previamente descritos por De Sá *et al.* (2014) aconteceram normalmente, independente se os ovos estavam sobre os tegumentos de *C. rosea* ou *V. unguiculata*. Trabalhos realizados por De Sá *et al.* (2014; 2018) mostraram que apesar das sementes não-hospedeiras (*Phaseolus vulgaris* e *Canavalia ensiformis*, respectivamente) afetarem a sobrevivência e a penetração de larvas, não houve influência sobre a morfologia embrionária de *C. maculatus*. Esses dados indicam que a fase do ciclo de vida do inseto afetada pelas toxinas dos tegumentos é o desenvolvimento pós embrionário.

Para analisar se os efeitos observados estavam relacionados com as características físicas do tegumento ou com a presença de compostos tóxicos, farinhas de tegumentos foram usadas para a produção de tegumentos artificiais contendo diferentes concentrações de farinha de tegumentos de *C. rosea*. Nossos resultados mostraram que não houve alteração na oviposição, eclosão, desenvolvimento e sobrevivência das larvas de *C. maculatus*, mesmo em sementes com o tegumento artificial contendo 100% da farinha de tegumentos. Os nossos resultados divergem dos apresentados por De Sá *et al.* (2018) com relação à oviposição, sobrevivência e massa das larvas, que mostraram uma diminuição

progressiva desses parâmetros à medida que as concentrações da farinha de tegumentos de *C. ensiformis* foram elevadas.

A espessura de tegumentos naturais de *C. rosea* foi medida e os resultados mostraram que esses tegumentos apresentam espessura oito vezes maior do que os tegumentos das sementes hospedeiras (*V. unguiculata*). Assim, fomos avaliar os efeitos do aumento da espessura dos tegumentos artificiais no desenvolvimento do inseto. Nossos resultados mostraram que o aumento da espessura não afetou parâmetros como oviposição e a penetração larval, mas foi eficiente na diminuição da massa das larvas 20 DAO. A diminuição dos valores das massas das larvas foi diretamente proporcional ao aumento da espessura dos tegumentos artificiais. Em tegumentos artificiais mais espessos (com massa final de 60 mg), a diminuição da massa das larvas foi de aproximadamente 58%. Esses resultados indicam que pode haver associação entre as características físicas e químicas dos tegumentos para a toxicidade observada para o inseto. Conforme relatado por Souza *et al.* (2011) e Oliveira *et al.* (1999; 2001), a toxicidade do tegumento pode estar relacionada à combinação de fatores físicos e químicos deste tecido. Outros trabalhos relataram um atraso na travessia de larvas de *C. maculatus* pelos tegumentos de sementes não-hospedeiras, aumentando o tempo de travessia até chegaram aos cotilédones (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011). Nossos resultados sugerem que a espessura do tegumento natural de *C. rosea* influenciou no desenvolvimento das larvas por aumentar o tempo de contato das larvas, durante a escavação, com os compostos tóxicos presentes nesse tecido.

Apesar dos tegumentos serem a primeira parte da semente a ser atacada pelas pragas, funcionando assim como a primeira linha de defesa (SILVA *et al.*, 2016; DE SÁ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018), uma vez que as larvas conseguem atravessá-lo, mesmo que com atraso, elas alcançam os cotilédones, se alojam e se alimentam das reservas nutritivas das sementes, causando danos irreversíveis (DE SÁ *et al.*, 2014). Dessa forma, é de fundamental importância a presença de compostos de defesas nos cotilédones das sementes.

Em 1999, Oliveira *et al.* avaliaram a toxicidade de proteínas extraídas de cotilédones de *Canavalia ensiformis* para o *C. maculatus*. Tais proteínas mostraram-se altamente tóxicas para o desenvolvimento de larvas deste inseto. Assim avaliamos a toxicidade dos cotilédones de *C. rosea*, incorporando diferentes concentrações de

suas farinhas em sistema de sementes artificiais. Nossos resultados mostraram que, assim como os tegumentos da *C. rosea*, seus cotilédones também são tóxicos para o inseto. Sementes artificiais contendo 1 e 2% da farinha diminuíram a sobrevivência de *C. maculatus* em aproximadamente 58 e 35%, respectivamente, e reduziram em aproximadamente 46 e 74% (respectivamente) a massa das larvas de 20 DAO. Houve também diminuição do comprimento das larvas em aproximadamente 41 e 63%, respectivamente. Concentrações superiores mostraram-se altamente letais às larvas de *C. maculatus*, sendo responsáveis por 100% de mortalidade.

A presença de compostos tóxicos em cotilédones de sementes é bastante estudada, dentre as principais proteínas caracterizadas como tóxicas, estão inibidores de enzimas proteolíticas, lectinas, vicilinas e quitinases (SALES *et al.*, 2000; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2008; ALEXANDRE *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2015). Vicilinas e quitinases de sementes tem sido estudadas pelo nosso grupo, como proteínas de defesa presentes tanto em tegumentos como em cotilédones (OLIVEIRA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018). Trabalhos anteriores demonstraram que frações proteicas precipitadas de 70-90% com sulfato de amônia são altamente ricas em vicilinas (MACEDO *et al.*, 1993). Vicilinas tem tido sua toxicidade a insetos relacionada a capacidade de ligação a quitina constituinte da membrana peritrófica/gel peritrófico de insetos, estruturas acelulares que revestem o intestino médio de insetos (TERRA *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2013), como visto nas larvas de *C. maculatus* (SALES *et al.*, 2001).

Assim realizamos uma extração proteica da farinha de cotilédones concentrando as proteínas na faixa de saturação de F0-70% e F70-90% em sulfato de amônio e avaliamos a toxicidade para o inseto. Nossos resultados mostraram que ambas as frações foram tóxicas para *C. maculatus*. A incorporação de 1% da fração F70-90% em sementes artificiais foi capaz de diminuir significativamente a massa e a sobrevivência das larvas. Houve diminuição das massas das larvas em aproximadamente 77% e a sobrevivência foi afetada em aproximadamente 70%. Em estudo anterior, De Sá (2017) avaliou a toxicidade da fração F70-90% extraída de tegumentos de *C. ensiformis* e mostrou que a incorporação a 2% também reduziu as massas das larvas e sua sobrevivência em 65 e 55%, respectivamente. Esse trabalho mostrou ainda uma diminuição significativa (50%) na oviposição do inseto em sementes com 2% da fração F70-90%. Nossos

resultados não mostraram diminuições na oviposição e nem na penetração larval relacionadas a presença de outras frações.

Para a verificação da presença de proteínas com afinidade a quitina na fração F70-90%, a fração foi submetida à cromatografia de afinidade à quitina onde se observou a presença de proteínas retidas na matriz. A análise da toxicidade da fração retida a 1% apresentou 100% de mortalidade. Apesar de não haver diferença significativa nos parâmetros de oviposição e eclosão larval com relação ao controle, as larvas alimentadas com 1% dessa fração foram encontradas mortas logo no início dos túneis cavados para penetrarem as sementes, mostrando que houve embriogênese, mas o desenvolvimento larval foi bloqueado ainda no início.

O perfil proteico da fração retida em quitina, mostrou a presença de proteínas majoritárias com massas moleculares entre aproximadamente 130 kDa e 48 kDa e com algumas bandas menos concentradas com massas abaixo de 30 kDa. Essa faixa de massas moleculares pode englobar várias proteínas incluindo vicilinas e quitinases, que já foram previamente detectadas nessa faixa de peso. As vicilinas consistem em combinações de múltiplas unidades com massas moleculares entre 20,1 e 94 kDa, com um alto grau de polimorfismo (MACEDO *et al.*, 2008) e são majoritárias nos cotilédones de leguminosas (FREITAS; TEIXEIRA; FERREIRA, 2004). Em estudos anteriores, vicilinas foram isoladas de variedades de *V. unguiculata* com massas moleculares entre 36 e 66 kDa (MACEDO *et al.*, 1993). Alguns outros estudos isolaram quitinases de tegumentos de sementes de soja, com massas moleculares entre 26 e 30 kDa (SILVA *et al.*, 2018). Bandas de frações retidas em quitina de sementes de cultivares de *V. unguiculata*, que reagiram com o anticorpo anti quitinase, apresentaram massas moleculares abaixo de 40 kDa (FERREIRA, 2018).

A fração 0-70% apesar de não influenciar nos parâmetros de oviposição e eclosão larval, reduziu significativamente as massas e a sobrevivência das larvas em aproximadamente 66,6% e 62,5%, respectivamente. Devido à sua toxicidade, a fração foi submetida à cromatografia de troca iônica com matriz aniônica de DEAE-celulose e observamos a fração não retida, rica em proteínas carregadas positivamente e neutras e uma única fração retida, eluída com NaCl 0,3 M. Essa fração reúne as proteínas carregadas negativamente. O teste de toxicidade dessa fração mostrou que apesar das frações não interferirem na oviposição e na eclosão das larvas, foram altamente letais. O perfil proteico, mostrou a presença de bandas majoritárias com

massas moleculares de aproximadamente 130, 48, 30 e algumas abaixo de 28 kDa na fração não retida e na fração 0,3 M DEAE apresentou bandas proteicas menos concentradas, acima de 100 kDa, e algumas poucas abaixo de 63 kDa no mesmo intervalo de saturação. Leite *et al.* (2005) isolaram uma lectina de *Gracilaria ornata* com peso molecular de 17 kDa, através da precipitação de 0-70% e cromatografia de troca iônica, seguida de cromatografia de afinidade.

Avaliando as possíveis alterações presentes nas larvas foram observadas alterações na atividade das proteases cisteínicas, lipases e α -amilases de larvas 20 DAO obtidas de sementes artificiais contendo 1% e 2% de farinha de cotilédones, 1% das frações F0-70% e F70-90% e de sementes artificiais com tegumentos artificiais espessos.

Quando analisamos a atividade de proteases cisteínicas observamos um aumento significativo nas larvas obtidas nos experimentos teste com relação às larvas do controle. Larvas retiradas de sementes contendo 2% de farinha de cotilédones de *C. rosea* e 1% da fração F70-90% foram as que mais apresentaram atividade de protease cisteínica e também foram as que tiveram menor massa dentre todos os testes. Larvas retiradas de sementes contendo 1% de farinha de cotilédones de *C. rosea* não apresentaram diferença estatística significativa com relação ao controle. Já as larvas retiradas de sementes contendo tegumento artificial com massa final de 60 mg e 1% da fração F0-70% indicaram atividades similares, porém, mais elevadas que as das larvas das sementes controle.

Ao analisarmos as atividades de α -amilase verificamos que, assim como ocorreu com a atividade de protease cisteínica, as larvas retiradas das sementes controle foram as que apresentaram menor atividade enzimática. Larvas retiradas das sementes contendo 2% de cotilédones de *C. rosea* apresentaram valores 13 vezes mais altos que larvas retiradas do controle, enquanto as larvas oriundas de sementes contendo 1% da fração F70-90 apresentaram valores aproximadamente 9 vezes mais altos que as larvas das sementes controle. Diferente dos resultados apresentados por nós, estudos anteriores demonstraram uma diminuição significativa nas atividades de proteases cisteínicas e α -amilase em larvas 15 DAO (DE SÁ *et al.*, 2014), de 5 a 17 DAO (DE SÁ *et al.*, 2018) e 20 DAO (CRUZ *et al.*, 2016). Resultados similares ao nosso, onde as larvas retiradas das sementes controle apresentaram menor atividade para algumas enzimas digestivas foram apresentados por Silva (2019). Nesse

trabalho, Silva (2019) quantificou a atividade de proteases cisteínicas em larvas 12, 16 e 21 DAO, retiradas de sementes hospedeiras (*V. unguiculata*) e os resultados mostraram que a atividade de protease cisteínica aumenta entre 12 e 16 DAO, mas decresce com 21 DAO, período que compreende o fim do desenvolvimento larval e início da fase de pupa. Na fase de pupa o inseto já não mais se alimenta, diminuindo seus níveis de atividade de enzimas digestivas. Esses dados, juntamente com os nossos resultados, sugerem que as larvas submetidas às dietas teste, por terem um retardo no desenvolvimento, apresentam uma idade fisiológica inferior aos 20 DAO, o que justifica algumas atividades digestivas mais altas que as larvas controle.

Nossos resultados também mostraram uma alteração na quantificação de compostos bioquímicos essenciais para o metabolismo. Os níveis de colesterol foram menores em larvas retiradas das sementes controle. Não houve diferença estatística significativa entre os níveis de glicose nas larvas das sementes controle e nas larvas das sementes contendo 1% da fração F0-70% e das sementes com tegumento artificial de 60 mg. Maiores níveis de glicose foram observados nas larvas retiradas das sementes contendo 1% da farinha de cotilédones. Larvas das sementes contendo 2% da farinha de cotilédones e 1% da fração F70-90% não indicaram diferença estatística significativa com relação a nenhum resultado apresentado. Os níveis de glicose foram maiores em larvas das sementes contendo 1 e 2% da farinha de cotilédones. Os níveis de glicose nas larvas das sementes controle foram menores que os apresentados nas larvas das sementes de 1 e 2% de farinha de cotilédones, porém foram estatisticamente maiores que os níveis de glicose encontrados nas larvas de sementes contendo 1% das frações F0-70% e F70-90% e das sementes com tegumento artificial de 60 mg. Os níveis de triacilglicerois foram maiores em sementes contendo 1% da fração F0-70%, não indicando diferença estatística significativa com relação às larvas das sementes controle. Os menores níveis de triacilglicerois foram encontrados em larvas de sementes contendo 1% da F70-90 e 1% da farinha de cotilédones.

Em síntese, nossos resultados indicam que as sementes de *C. rosea* são resistentes à infestação por *C. maculatus* e são fontes de compostos inseticidas. Tanto os cotilédones quanto os tegumentos de *C. rosea* influenciaram negativamente no desenvolvimento do inseto. Parte da toxicidade dos cotilédones de *C. rosea* e de suas frações pode estar relacionada à presença de proteínas com afinidade quitina, que

podem se ligar à membrana peritrófica interferindo no desenvolvimento das larvas. Nossos resultados sugerem ainda que a toxicidade dos tegumentos de *C. rosea* esteja relacionada à associação de fatores físicos (como espessura e dureza) à presença de compostos tóxicos. Investigações futuras deverão ser realizadas para que seja possível isolar e identificar as proteínas presentes nas frações que apresentaram toxicidade ao inseto, contribuindo para melhor compreensão do mecanismo de toxicidade de proteínas isoladas dessas sementes para *C. maculatus*.

6. CONCLUSÕES

- Sementes naturais de *C. rosea* foram resistentes a infestação pelo inseto *C. maculatus*;
- Os tegumentos naturais de *C. rosea* inibiram a oviposição, a penetração e a sobrevivência das larvas de *C. maculatus*;
- Embriões de *C. maculatus* desenvolvidos em ovos ovipositados sobre os tegumentos naturais de *C. rosea* não apresentaram alterações morfológicas durante a embriogênese;
- Os tegumentos naturais de *C. rosea* apresentaram espessura 8 vezes maior que os tegumentos das sementes de *V. unguiculata*, hospedeiras naturais do inseto;
- Experimentos de sementes artificiais, contendo tegumentos artificiais de *C. rosea*, mostraram uma relação direta entre espessura e toxicidade, sendo os tegumentos finos incapazes de alterar o desenvolvimento do inseto;
- Farinhas e frações proteicas dos cotilédones de *C. rosea* apresentaram toxicidade para *C. maculatus*, diminuindo a massa das larvas em concentrações de 1 e 2%. A farinha foi 100% letal em concentrações superiores;
- Frações isoladas através de métodos cromatográficos de troca iônica e afinidade a quitina foram altamente tóxicas para *C. maculatus*, matando as larvas no início do desenvolvimento larval;
- Larvas de 20 DAO alimentadas com as farinhas de cotilédones de *C. rosea* e com as frações F0-70% e F70-90% (provenientes de sementes artificiais contendo tegumentos artificiais com diferentes espessuras) mostraram alterações na atividade de enzimas digestivas e nos níveis de glicose, triacilglicerois, proteínas totais e colesterol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRATES: **Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes**. Brasil. Disponível em: <<https://www.abrates.org.br>>. Acesso em 30 de Janeiro de 2020.

AGRAWAL, A. A. Specificity of induced resistance in wild radish: causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. **Oikos**, v. 89, n. 3, p. 493-500, 2000.

ALEXANDRE, D. *et al.* Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 6, p. 801-808, 2011.

ASIF, M. *et al.* 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.

AUSTIN, D. F. **Florida Ethnobotany**. CRC Press, 2004.

BADII, Benjamin K. *et al.* Efficacy of diatomaceous earth formulations against *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) in Kersting's groundnut (*Macrotyloma geocarpum* Harms): influence of dosage rate and relative humidity. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 2, p. 285-294, 2014.

BÄUMLEIN, H. *et al.* Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 6, p. 1070-1075, 1995.

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

BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. **National Science Foundation**. 2011.

BEWLEY, J. D. Breaking down the walls—a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy?. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 12, p. 464-469, 1997.

BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012.

BFG (The Brazil Flora Group). **Growing Knowledge: an Overview of Seed Plant Diversity in Brazil**. Rodriguésia, Rio de Janeiro, Brasil. v.66, n.4, p.1085-1113, 2015.

BLAIR, M. W. *et al.* Genetic mapping of microsatellite markers around the arcelin bruchid resistance locus in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 2, p. 393-402, 2010.

BRAUN, H. *et al.* A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 35-44, 1996.

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

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARRAZONI, T. *et al.* Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 63-70, 2018.

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

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

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.

COELHO, M. B. *et al.* Purification of legumin-like proteins from *Coffea arabica* and *Coffea racemosa* seeds and their insecticidal properties toward cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3050-3055, 2010.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 30 de Janeiro de 2020.

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

D'CUNHA, M.; SRIDHAR, K. Micropropagation of the wild legume *Canavalia rosea* (Sw.) DC. from coastal sand dunes. **Biological Letters**, v. 48, n. 1, p. 85-96, 2011.

DEFFERRARI, M. S. *et al.* Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 388-399, 2011.

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

DE SÁ, L. F. R. **Efeitos tóxicos do tegumento de *Canavalia ensiformis* sobre o desenvolvimento embrionário e larval do inseto *Callosobruchus maculatus***. 2017. 110 f. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

DE SÁ, L. F. R. *et al.* 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.

DOW, J. A. T. Insect midgut function. *Advances in insect physiology*. Academic Press, p. 187-328, 1987.

EADY, P. E. Sperm competition in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): a comparison of two methods used to estimate paternity. **Ecological Entomology**, v. 16, n. 1, p. 45-53, 1991.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Brasil. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em 30 de Janeiro de 2020.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 30 de Janeiro de 2020.

FERREIRA, S. R. **Toxicidade de proteínas com afinidade a quitina de cultivares de *Vigna unguiculata* para o inseto *Callosobruchus maculatus***. 2018. 49 f. Monografia – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

FOLLMER, C. *et al.* Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5. 1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 217-224, 2001.

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.

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

GALLEGO-FERNÁNDEZ, J. B.; MARTÍNEZ, M. L. Environmental filtering and plant functional types on Mexican foredunes along the Gulf of Mexico. **Ecoscience**, v. 18, n. 1, p. 52-62, 2011.

GBAYE, O. A.; MILLARD, J. C.; HOLLOWAY, G. J. Legume type and temperature effects on the toxicity of insecticide to the genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 1, p. 8-12, 2011.

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

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

GOMES, V. M.; OLIVEIRA, A. E. A.; XAVIER-FILHO, J. A. Chitinase and a β -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.

GOMES, V. M. *et al.* 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.

GOOSEN, M. F. A. (Ed.) **Applications of Chitan and Chitosan**. CRC Press, 1996.

HACKMAN, R. H.; GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 397-401, 1964.

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

HARUTA, M. *et al.* 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. *et al.* New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285-302, 2009.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 41-66, 2008.

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

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

KIRADOO, M.; SRIVASTAVA, M. A comparative study on the efficacy of two lamiaceae plants on egg-laying performance by the pulse beetle *Callosobruchus chinensis* Linn.(Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 3, p. 590, 2010.

KEDIA, A. *et al.* Botanicals as eco friendly biorational alternatives of synthetic pesticides against *Callosobruchus* spp.(Coleoptera: Bruchidae)—a review. **Journal of Food Science And Technology**, v. 52, n. 3, p. 1239-1257, 2015.

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

LAFON-PLACETTE, C.; KÖHLER, C. Embryo and endosperm, partners in seed development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 17, p. 64-69, 2014.

LEITE, Y. F. M. M. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1724, n. 1-2, p. 137-145, 2005.

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

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

MACEDO, L. L. P. *et al.* 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.

MAINA Y.T., MBAYA A.M., MAILAFIYA D.M. Susceptibility of six local and four improved cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation in north eastern Nigeria. **Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries**, v. 4, p. 31–37, 2012.

MANNERS, J. M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 225, 2007.

MARCUS, J. P.; GOULTER, K. C.; MANNERS, J. M. Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity in vitro. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 26, n. 2, p. 75-87, 2008.

MATOS, A. B. *et al.* Revisión taxonómica del género *Canavalia* DC.(Leguminosae–Papilionoideae) en Cuba. **Revista de la Academia Colombiana de Ciências Exactas, Físicas y Naturales**, v. 107, n. 28, p. 157-175, 2004.

MENDOZA-GONZÁLEZ, G.; MARTÍNEZ, M. L.; LITHGOW, D. Biological flora of coastal dunes and wetlands: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. **Journal of Coastal Research**, v. 30, n. 4, p. 697-713, 2014.

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

MIRTH, C. K.; RIDDIFORD, L. M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **Bioessays: News And Reviews In Molecular, Cellular And Developmental Biology**, v. 29, n. 4, p. 344–355, 2007.

MISHRA, S. K. *et al.* 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, n. 1, p. 4-19, 2018.

MOHAJER, S. *et al.* Baybean (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.); organogenesis, morphological and anatomical studies. **Gayana Botanica**, v. 74, p. 1, 2017.

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

MORAES, R. A. *et al.* Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**. v. 33, n. 2, p. 191–198, fev. 2000.

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

MOURA, F. T. *et al.* Effects of a chitin-binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*)

and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 260- 266, 2007.

MULINARI, F. *et al.* Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1758-1768, 2011.

NUNES, N. N. S. *et al.* Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larva development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 63, N. 48, P. 10431-10436, 2015.

OERKE, E.C. *et al.* Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. **Elsevier**, Amsterdam, 1994.

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

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

OLIVEIRA, A. E. A. *et al.* Influence of the soybean seed coat upon seed infestation and development of *Callosobruchus maculatus* larvae (in press). **Soybean and Wheat Crops: Growth, Fertilization, and Yield**. Nova Science Publishers, New York, p. 335-372, 2009.

OLIVEIRA, G. B. *et al.* Variant vicilins from a resistant *Vigna unguiculata* lineage (IT81D-1053) accumulate inside *Callosobruchus maculatus* larval midgut epithelium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 168, p. 45-52, 2014.

ONU. **Organização das Nações Unidas**. Disponível em:

<<https://nacoesunidas.org/>>. Acesso em 30 de Janeiro de 2020.

PAES, E. V. *et al.* 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. *et al.* Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and alpha-amylases associated with food breakdown. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 405–412, ago. 2003.

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

RADCHUK, V.; BORISJUK, L. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 510, 2014.

ROMERO, J.; JOHNSON, C. D. Checklist of the Bruchidae (Insecta: Coleoptera) of Mexico. **The Coleopterists Bulletin**, v. 58, n. 4, p. 613-635, 2004.

ROSZAK, P.; KÖHLER, C. Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 51, p. 20826-20831, 2011.

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

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

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R. Nutritional and microbiological features of little known legumes, *Canavalia cathartica* Thouars and *C. maritima* Thouars of the southwest coast of India. **Current Science**, p. 1638-1650, 2006.

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R.; RAMESH, S. R. Nutritional and protein quality evaluation of thermally treated seeds of *Canavalia maritima* in the rat. **Nutrition Research**, v. 25, n. 6, p. 587-596, 2005.

SHUTOV, A. D. *et al.* 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, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.)(Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 529-533, 1991.

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

SILVA, N. C. M. *et al.* *Albizia lebbek* seed coat proteins bind to chitin and act as a defense against cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3514-3522, 2016.

SILVA, N. C. M. *et al.* 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.

SILVA, R. B. **Caracterização de resistência em sementes de genótipos de feijão comum *Phaseolus vulgaris* (L) a infestação pelo inseto *Callosobruchus***

maculatus (F). 2019. 70 f. Monografia – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

SNAK, C. **Canavalia in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2020.

SOMTA, P. *et al.* Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). **Euphytica**, v. 155, n. 1-2, p. 47-55, 2007.

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

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

STANISÇUASKI, F. *et al.* In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 3, p. 255-263, 2009.

TAKAYAMA, K. *et al.* Gene flow and population subdivision in a pantropical plant with sea-drifted seeds *Hibiscus tiliaceus* and its allied species: Evidence from microsatellite analyses. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 11, p. 2730-2742, 2008.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47–61, jun. 2001.

THIEL, M.; GUTOW, L. The ecology of rafting in the marine environment. I. The floating substrata. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 42, p. 181-264, 2005.

TRIPATHY, S. K. Bruchid resistance in food legumes-an overview. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7, 2016.

TSIALTAS, I. T.; IRAKLI, M.; LAZARIDOU, A. Traits related to bruchid resistance and its parasitoid in vetch seeds. **Euphytica**, v. 214, n. 12, p. 238, 2018.

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

UCHOA, A. F. *et al.* Toxicity of hydrolyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 8056-8061, 2009.

VALLET-GELY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 302-313, 2008.

VATANPARAST, M. **Phylogeography of a pantropical plant with sea-drifted seeds; *Canavalia rosea* (Sw.) DC., (Fabaceae)**. Graduate School of Science, Chiba University. 89 pp, 2010.

VATANPARAST, M. *et al.* Origin of Hawaiian endemic species of *Canavalia* (Fabaceae) from sea-dispersed species revealed by chloroplast and nuclear DNA sequences. **Journal of Japanese Botany**. v. 86, p. 15-25, 2011.

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

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

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 47, n. 2, p. 110-118, 2001.

WANG, X. *et al.* Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1224-1228, 2001.

WAR, A. R. *et al.* Mechanism of resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek var. *radiata*] to bruchids, *Callosobruchus spp.*(Coleoptera: Bruchidae). **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1031, 2017.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review Of Plant Biology**, v. 56, p. 253–279, 2005.

WORLD BANK GROUP. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/>>. Acesso em: 30 de Janeiro de 2020.

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

ZIANI, K.; URSÚA, B.; MATÉ, J. I. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. **Crop Protection**, v. 29, n. 8, p. 853-859, 2010.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 264–272, 2006.