



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

ANDERSON FELIPE JÁCOME DE FRANÇA

VICILINA DE SEMENTES DA LEGUMINOSA SELVAGEM *Anadenanthera macrocarpa*: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, EFEITO DELETÉRIO E MECANISMO DE AÇÃO PARA *Callosobruchus maculatus*

**NATAL
2013**

ANDERSON FELIPE JÁCOME DE FRANÇA

VICILINA DE SEMENTES DA LEGUMINOSA SELVAGEM *Anadenanthera macrocarpa*: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, EFEITO DELETÉRIO E MECANISMO DE AÇÃO PARA *Callosobruchus maculatus*

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Adriana Ferreira Uchôa

**NATAL
2013**

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Franca, Anderson Felipe Jácome de.

Vicilina de sementes da leguminosa selvagem *Anadenanthera macrocarpa*: purificação, caracterização, efeito deletério e mecanismo de ação para *Callosobruchus maculatus* / Anderson Felipe Jácome de Franca. - Natal, 2014.

89f: il.

Orientadora: Profa. Adriana Ferreira Uchôa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Gorgulho do feijão de corda - Dissertação. 2. Domínios de ligação à quitina - Dissertação. 3. Angico - Dissertação. I. Uchôa, Adriana Ferreira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE01

CDU 633.33

ANDERSON FELIPE JÁCOME DE FRANÇA

VICILINA DE SEMENTES DA LEGUMINOSA SELVAGEM *Anadenanthera macrocarpa* (AmV): PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, EFEITO DELETÉRIO E MECANISMO DE AÇÃO PARA BRUQUÍDEO *Callosobruchus maculatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 29/10/2013

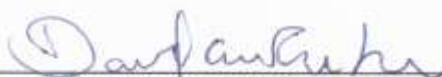
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchoa
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador



Prof. Dr. Ludovico Migliolo
Universidade Católica de Brasília
1º Examinador



Prof. Dr. Daniel Carlos Ferreira Lanza
Departamento de Bioquímica - UFRN
2º Examinador

Dedico esta obra

A todos que entraram na minha vida. À minha esposa, Isabelli, minha inseparável parceira nesta longa jornada.

À minha filha, Linda.

E aos meus pais e minha irmã, Elenilson, Helena e Andreilly, que sempre me apoiaram em tudo.

AGRADECIMENTOS

Apreendi que devemos sempre agradecer por tudo que acontece em nossas vidas, nunca sabemos o que Deus tem pra nos dar, mas Ele conhece nossos corações, nossos medos e nossas necessidades.

Considerando esta dissertação como resultado de uma caminhada que não começou na UFRN, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta e indireta na construção deste trabalho:

À professora Adriana Uchôa, pela discussão teórica nas disciplinas que subsidiaram novas reflexões e construções em minha prática pedagógica. Por ter sido companheira na orientação desta dissertação, nas recorrentes "discussões" que travávamos dentro e fora dos laboratórios e principalmente, por me mostrar na prática que os alunos se desenvolvem mais e melhor quando são valorizados.

Ao professor Elizeu Antunes, pela sensibilidade que o diferencia como educador e por sua disposição para ajudar sempre, no que é possível.

À professora Ana Heloneida, meu carinho, por seus comentários sempre pertinentes e esclarecedores.

Ao professor Hugo, por sua atenção, pelas contribuições teóricas nas disciplinas e por sempre deixar seu laboratório com as portas abertas, quando eu precisei.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Bioquímica, pelo estímulo acadêmico e pela valorização cultural que atribuem ao processo pedagógico. Pela convivência que se construiu para além dos espaços das salas de aula da universidade.

Agradeço aos professores da banca avaliadora da minha dissertação Daniel Lanza (Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN) e ao meu amigo e irmão Ludovico Migliolo (Universidade Católica de Brasília-UCB)

À amiga Luciana Rabêlo, pelo incentivo, força, amizade, carinho que partilhamos durante nosso caminhar... nas viagens,

nos estudos, nas viradas, nas "reuniões", no "celular" e na espera dos IF's...

À inestimável e inesquecível amiga Paula Ivani, pelo longo e prazeroso tempo de convivência e espontaneidade.

À amiga Nega (Vanessa Lima), por suas "aulas" de sinceridade, por me mostrar como a diferença pode ser importante em nossas vidas e por fazer parte das cotas do programa de pós, juntamente comigo.

À amiga Tici (Ticiano Amorim), com quem dividi as angústias e as alegrias dos resultados obtidos, por meio de sua ajuda, que foi de extrema importância.

Ao novo amigo Jonalson Araújo, pelo incentivo durante todo o trabalho e pelas conversas "sensatas", tanto nesta pesquisa quanto no nosso cotidiano (no sofá).

Ao novo amigo Raphael Russi, pelas noites em claro e companhia nas aulas e no laboratório, que tanto contribuíram para nossa formação.

Aos novos amigos de laboratório Antônio Moreira, Raphael Serquiz, Delano Anibal, Patrícia Batista, Alexandre Serquiz e Richele Janaina e Xatinanda Ginani (Fernanda) pelo carinho e força que me deram ou dão, por estarmos sempre juntos nos momentos mais importantes, já que, todos passamos o dia no laboratório.

Gostaria de agradecer aos amigos e irmãos Rodrigo Oliveira de Aquino, Breno Frias, Raphael Sawaki, Eduardo Henrique, Virginia Penélope, Cleysyvan e Kaline que foram e são grandes irmãos e companheiros em vários momentos, mesmo que um pouco distantes por motivos pessoais, andamos juntos por muito tempo.

Aos amigos do mestrado, Ana Karina, Daniel Chaves, Fernanda Barros, Helaine Cristiane, Heleni Aires, Hugo Wescley, Ivanice Bezerra, Larissa Muratori, Raphael Russi, Patricia Batista, Richele Janaina, Taffarel Melo, Thiago Barros e Thiago Gomes.

A todos que foram ou são do LQFPB, Guiliana (a espanhola), Iane, Iana, Vanessa (Branca), Isabela, Ana Glória, Thaynar (Igor), Cleysyvan, Norberto, Leonardo Pepino e a Adeliana por seus ensinamentos.

Aos meus tios, primos e avós e em especial minha avó Marieta que me deu o Lehninger, permitindo assim que eu estudasse para passar na prova do mestrado.

Às pessoas que de alguma maneira me auxiliaram de maneira acadêmica, profissional e afetivamente, meus pais e irmã, minha esposa e filha.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pela aquisição de sementes de *Anadenanthera macrocarpa*.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Banco do Nordeste (BNB) e Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECI) que contribuíram com recursos financeiros para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“ele foi o homem que pelo poder do seu intelecto, pelo grande poder de sua mente, pôde se erguer acima da pobreza, acima da guerra e da discórdia e se tornar uma das maiores figuras da história da humanidade, isso é inspirador por que não é preciso nascer bonito, não é preciso ter muitos músculos, não é preciso ter nascido especial. Podemos ter êxito usando o poder absoluto de nosso intelecto”

Muchio Kaku referindo-se a Albert Einstein

RESUMO

Sementes de leguminosas são alimentos que compõem a base das dietas de diversas culturas ao redor do mundo, tendo uma importante contribuição nas necessidades diárias de nutrientes dos seres humanos. As globulinas 7S (vicilinas) são proteínas de reserva encontradas em sementes de leguminosas, e podem apresentar uma função adicional de defesa constitutiva do embrião contra pragas e patógenos. Neste trabalho uma vicilina de *Anadenanthera macrocarpa* - AmV (Angico-vermelho), foi purificada e parcialmente caracterizada. Seu efeito sobre o desenvolvimento, sobrevivência larval e emergência dos adultos de *Callosobruchus maculatus* foram avaliados pela determinação das LD₅₀, WD₅₀ e ED₅₀ em sistema de bioensaio. A purificação da vicilina foi iniciada por cromatografia de afinidade à quitina e posteriormente em cromatografia de gel filtração Superdex 75 Tricorn 10x300 mm no sistema de FPLC, seguida por cromatografia de fase reversa C8 phenomenex em sistema HPLC. Por SDS-PAGE, AmV dissociou-se em quatro subunidades principais com aproximadamente 73, 70, 43 e 41 kDa, e quando submetida à eletroforese a 12% em condições nativas apresentou uma banda única de característica eletroforética ácida. Nos bioensaios, a WD₅₀ e a LD₅₀ para as larvas foram de 0,32% e 0,33% (p:p) respectivamente, já para os adultos a ED₅₀ foi de 0,096%. O provável mecanismo de ação foi avaliado por ensaios de digestibilidade da AmV *in vitro*, sendo observado o envolvimento de dois fragmentos de vicilinas imunorreativos contra anticorpo policlonal Anti-vicilinas de *Erythrina velutina* (Anti-EvV), de aproximadamente 22 e 13 kDa ligantes à quitina. A AmV na sua forma nativa foi reconhecida pelo anticorpo anti-EvV, indicando que existe uma provável região conservada nas vicilinas, que pode corresponder à domínios de ligação à quitina. Estes resultados apontam para uma nova vicilina que pode vir a ser utilizada como um possível bioinseticida de origem proteica, de maneira a controlar o inseto praga *C. maculatus*, bem como corroborar com achados da literatura que demonstram em vicilinas de diferentes espécies a existência de regiões conservadas ligantes à quitina ainda não caracterizados.

Palavras-chave: AmV, Domínios de ligação à quitina; Angico; gorgulho do feijão de corda.

ABSTRACT

Grains and legume seeds are foods that form the basis of the diets of many cultures around the world, which contribute to the daily nutrient requirements of humans. Vicilins (7S globulin) are storage proteins found in legume seeds, and may have an additional function constitutive defense of the embryo against pests and pathogens. In this work the vicilin from *Anadenanthera macrocarpa* - AmV (red-angico), was purified and partially characterized, its effect on development and larval survival and adult emergence of *Callosobruchus maculatus* was evaluated by determination of LD₅₀, WD₅₀ and ED₅₀ in system bioassay. Purification of vicilin was initiated by the chitin affinity chromatography and then gel filtration (Superdex 75 Tricorn 10x300 mm) FPLC system followed by reverse phase chromatography (C8 phenomenex) on HPLC system. Bioassays WD₅₀ and LD₅₀ for larvae were 0.32% and 0.33% (w:w) respectively, since the ED₅₀ for adults was 0.096%. The probable mechanism of action was evaluated by testing digestibility of AmV *in vitro*, and observed for the involvement of two fragments vicilins immunoreactive against polyclonal Anti-vicilin from *Erythrina velutina* (Anti-EvV) about of 22 and 13 kDa chitin binding. The AmV in its native form has been recognized by the anti-EvV, indicating that there is a conserved region in the vicilin and is probably corresponding to the chitin binding domains. These results point to a new vicilin chitin binding that can subsequently be used as a possible biopesticide protein source, in order to control insect pest *C. maculatus* and confirm literature findings that demonstrate vicilin in the presence of different kinds of ligands to conserved regions chitin not yet characterized.

Keywords: AmV, Domains chitin-binding; Angico; Cowpea weevil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>C. maculatus</i>	21
Figura 2. Vista dorsal do <i>C. maculatus</i> masculino e feminino	22
Figura 3. Crescimento da população mundial	23
Figura 4. Estratégias de manejo de artrópodes-pragas.....	25
Figura 5. Diagrama do aparelho digestório de insetos	26
Figura 6. Modelagem das vicilinas de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Glycine max</i> respectivamente. Diagrama esquemático mostrando a origem das subunidades da vicilina <i>Pisum sativum</i> (ervilha).	32
Figura 7. Larva e adulto com a classificação taxonômica	35
Figura 8. Semente e classificação taxonômica da <i>A. macrocarpa</i>	36
Figura 9. Esquema de montagem do “sanduíche” para Imunoblotting.....	51
Figura 10. Perfil de eluição de AmV em cromatografia de afinidade a quitina..	52
Figura 11. Perfil de eluição proteica de AmV em cromatografia superdex 75 tricorñ 10x300 mm	53
Figura 12. Perfil de eluição proteica de AmV em cromatografia C8 phenomenex (5 µm, St 4.6/250, 100 Å)	54
Figura 13. Sds-page, page e massa da <i>A. macrocarpa</i>	55
Figura 14. Efeito de AmV sobre a massa e mortalidade nas larvas de <i>C. maculatus</i>	58
Figura 15. Efeito de AmV sobre a mortalidade nos adultos de <i>C. maculatus</i> ..	59
Figura 16. SDS-PAGE dos produtos de digestão in vitro da AmV por enzimas do homogenato intestinal de larvas de <i>C. maculatus</i> e Imunoblotting da AmV.	60
Figura 17. (A) Perfil de eluição dos fragmentos de AmV digeridos por 24 horas com homogenato intestinal de <i>C. maculatus</i> em cromatografia de afinidade a quitina e (B) eletroforese dos fragmentos adsorvidos da cromatografia.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição taxonômica dos Bruquídeos	20
TABELA 2. Classificação e origem de proteínas de defesa armazenadas em plantas e sementes.....	30
TABELA 3. Fatores conhecidos que provocam respostas defensivas nas plantas em diferentes ataque por artrópodes herbívoros	31
TABELA 4. Detecção de proteínas de defesa e atividades biológicas ao longo do processo de purificação da AmV	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Extrato Bruto de <i>Anadenanthera macrocarpa</i>
ED₅₀	Quantidade de Amv que reduz a emergência de adultos pela metade
AmV	Vicilina de <i>A. macrocarpa</i>
F1 (0-30%)	Fração proteica obtida do fracionamento com sulfato de amônia em 0-30% de saturação. Também denominada fração albumínica.
F2 (30-60%)	Fração protéica obtida do fracionamento com sulfato de amônia em 30-60% de saturação. Também denominada fração albumínica.
F3 (60-90%)	Fração protéica obtida do fracionamento com sulfato de amônia em 60-90% de saturação. Também denominada fração globulínica.
G	Gravidade
HI	Homogenato Intestinal de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>
HT	Homogenato Intestinal juntamente com AmV
kDa	Quilodalton
LD₅₀	Quantidade de AmV que reduzia a população das larvas pela metade
M	Molar
MP	Membrana peritrófica
nm	Nanômetro
p:p	Relação peso:peso
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida com SDS
TCA	Ácido tricloroacético
WD₅₀	Quantidade de AmV necessária para reduzir a massa das larvas pela metade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. PRODUÇÃO MUNDIAL E BRASILEIRA DE GRÃOS	18
1.2. BRUQUÍDEOS - <i>Callosobruchus maculatus</i>	19
1.3. CONTROLE DE PRAGAS.....	22
1.4. SISTEMA DIGESTÓRIO DOS INSETOS.....	26
1.5. MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS	28
1.6. VICILINAS.....	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. GERAL.....	34
2.2. ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAIS E METODOS	35
3.1. MATERIAIS.....	35
3.1.1. Inseto.....	35
3.1.2. Semente.....	35
3.1.3. Eritrócitos Humanos	36
3.1.4. Reagentes	36
3.1.5. Equipamentos	37
3.2. MÉTODOS	37
3.2.1. Manutenção dos Insetos.....	37
3.2.2. Purificação da Vicilina	38
3.2.2.1. Preparo da farinha de sementes de <i>A. macrocarpa</i>	38
3.2.2.2. Preparo do extrato bruto das sementes	38
3.2.2.3. Fracionamento com sulfato de amônio	38
3.2.2.4. Cromatografia de afinidade em matriz de quitina	39
3.2.2.5. Cromatografias em sistemas de FPLC e HPLC.....	39
3.2.3. Dosagem de Proteínas.....	40
3.2.3. Dosagem de Carboidratos	40
3.2.4. Detecção de Outras Proteínas de Defesa nas Frações de <i>A. macrocarpa</i>	40
3.2.5.1. Ensaio para avaliação da presença de atividade inibitória para enzimas digestivas.....	41
a. Preparo dos substratos	41

b. Determinação de atividade inibitória contra	42
3.2.5.2. Detecção de lectinas	44
3.2.5.3. Detecção de atividade hemolítica	45
3.2.5.4. Testes anticoagulantes <i>in vitro</i>	45
3.2.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE).....	47
3.2.7. Bioensaios	47
3.2.7.1. Avaliação do potencial larvicida para <i>C. maculatus</i>	47
3.2.7.2. Avaliação da ação de AmV na emergência e sobrevivência de adultos de <i>C. maculatus</i>	48
3.2.8. Determinação dos Mecanismos de Ação de Vicilinas	49
3.2.8.1. Digestibilidade <i>in vitro</i> da vicilina de <i>A. macrocarpa</i> por homogenato intestinal (HI) de <i>C. maculatus</i>	49
3.2.8.2. Produção de anticorpos contra vicilina de <i>E. velutina</i> , utilizados contra vicilina de <i>A. macrocarpa</i>	49
3.2.8.3. Imunodetecção de proteínas - “Imunoblotting”	50
3.2.9. Análise Estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VICILINA DE <i>Anadenanthera macrocarpa</i>	52
4.1.1 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina.....	52
4.1.2. Cromatografia de Exclusão Molecular em Superdex 75 em Sistema de FPLC AKTA Purifier.	53
4.1.3. Cromatografia de Fase Reversa em C8 Phenomenex no Sistema de HPLC Hitachi	53
4.1.4. Análise de AmV por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturante e não Desnaturante.	54
4.1.5. Quantificação de Carboidratos em AmV	55
4.1.6. Detecção de Proteínas de Defesa e Atividades Biológicas ao Longo do Processo de Purificação da AmV.	56
4.2. BIOENSAIOS	57
4.2.1. Efeito de AmV Sobre as Larvas de <i>C. maculatus</i>	57
4.2.2. Efeito de AmV Sobre a Emergência dos Adultos de <i>C. maculatus</i> ...	58
4.3. PROVAVEL MODELO DE AÇÃO DE VICILINAS DE <i>A. macrocarpa</i> PARA LARVAS DE <i>C. maculatus</i>	59
4.3.1. Digestibilidade <i>in vitro</i> de Vicilina de <i>A. macrocarpa</i> Pelas Enzimas Digestórias das Larvas de <i>C. maculatus</i>	59

4.3.2. Cromatografia de Afinidade em Quitina dos Peptídeos de AmV.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUÇÃO MUNDIAL E BRASILEIRA DE GRÃOS

As sementes são alimentos base nas dietas de diversas culturas ao redor do mundo, tendo uma importante contribuição nas necessidades diárias de nutrientes dos seres humanos, desde antes do início de seu cultivo, quando as populações existentes eram nômades caçadoras e coletoras, ao início da agricultura no período conhecido por Neolítico, por volta de 10.000 a.C. (ESHED *et al.*, 2004 e 2010). Seu consumo é incentivado em orientações dietéticas ao redor do mundo. A ingestão desses alimentos mostra uma contribuição significativa de macro e micronutrientes, principalmente para crianças e adolescentes, que estão numa fase crítica do desenvolvimento corpóreo (EISENSTEIN *et al.*, 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) (2005) é recomendado o consumo mínimo de 25 g de grãos íntegros por dia para a prevenção de doenças crônicas como cardiopatias, câncer, diabetes tipo 2 e obesidade.

De acordo com a FAO o mercado mundial de grãos esteve em plena ascensão na última década (FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION, 2011). A produção mundial de grãos cresceu 24,5% na última década, alcançando um volume de 22.288,75 milhões de toneladas em 2011 contra 17.907,22 milhões de toneladas em 2000 (FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION, 2013). Fica evidente que esta elevação na produção está associada ao maior conhecimento da população sobre os efeitos benéficos do consumo de alimentos de origem vegetal para saúde humana, juntamente com as melhorias na logística de produção e comercialização desses produtos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O comércio internacional de produtos alimentares é fortemente condicionado por vários mecanismos de regulação fitossanitária. Preocupados com possíveis efeitos sobre consumidores e, especialmente, sobre suas regiões produtoras, quase todos os países impõem restrições ao trânsito de alimentos (FAVERET FILHO *et al.*, 1999). No caso de produtos naturais a preocupação é elevada a níveis bastante altos, pois um lote infectado pode eliminar todos os esforços de erradicação de pragas ou doenças que levaram anos e custaram milhões de dólares. Veja que os

países e blocos econômicos com regras e instituições de controle de qualidade mais rigorosas são justamente os grandes importadores: Estados Unidos, União Europeia e Japão, o que torna extremamente seletivo o acesso de novos exportadores aos fluxos de comércio internacional (FAVERET FILHO *et al.*, 1999).

Dentre as diversas espécies de grãos comercializados as leguminosas como os feijões, são considerados produto básico na alimentação humana, sendo uma das mais importantes fontes de proteínas, calorias, vitaminas do complexo B e minerais na América Latina (MALDONADO *et al.*, 1996; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996; TEIXEIRA, 2006). As leguminosas estão distribuídas em 3 subfamílias: Caesalpinaceae e Mimosaceae cada uma 9 gêneros e Fabaceae com 67 gêneros. Os Bruquídeos, ocupam uma posição de destaque entre as maiores pragas primárias de leguminosas. A infestação por bruquídeos pode causar redução na germinação e deterioração do valor nutritivo dos grãos, incluindo alterações bioquímicas, como aumento dos ácido graxos livres, açúcares redutores e teor de ácido úrico e redução teor de lisina e tiamina, isso pode provocar uma gama de barreiras fitossanitárias para países produtores de leguminosas comerciais no mundo (GATEHOUSE *et al.*, 1995; LE BERRE-ANTON *et al.*, 2000; SHARMA, 1984 apud: BHALL *et al.*, 2006).

1.2. BRUQUÍDEOS - *Callosobruchus maculatus*

Os besouros da subfamília Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae) são insetos especializados em alimentar-se do interior de diversas sementes da família do feijão (Fabaceae) (LINGAFELTER *et al.*, 1997; FARRELL *et al.*, 1998; TUDA *et al.*, 2007). Já foram descritos cerca de 1.700 espécies organizadas em 6 tribos e 64 gêneros (tabela 1) (TUDA, 2007). Apesar de não apresentar uma taxa de crescimento elevada, alguns dos besouros dos feijões são pragas notórias de grãos armazenados com uma taxa intrínseca de crescimento elevada, dentre as pragas dos produtos estocados (IMURA, 1990). Eles incluem várias espécies dos gêneros *Callosobruchus*, *Acanthoscelides* e *Zabrotes* que infestam feijões (Tribo Phaseoleae: *Vigna*, *Phaseolus*, *Glicine*, etc) e Caryedon que se alimenta de amendoim (*Arachis hypogaea*) (SOUTHGATE, 1979). Espécies de *Bruchus* que infestam favas e

ervilhas (Fabaceae: *Vicia* e *Pisum*) de importância econômica que também podem ser categorizados como pragas de feijão armazenado (tabela 1) (TUDA, 2007).

Tabela 1

Composição taxonômica dos Bruquídeos. Gêneros em negrito são de espécimes pragas. (1) possui 3 gêneros; (2) possui 46 gêneros; (3) possuem 1 gênero; (4) possui 12 gêneros.

FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	TRIBO	GÊNEROS
Chrysomelidae	Bruchinae	Amblicerini ¹	<i>Spermophagus</i>
			<i>Zabrotes</i>
		Bruchini ²	<i>Acanthoscelides</i>
			<i>Bruchidius</i>
			<i>Bruchus</i>
			<i>Callosobruchus</i>
			<i>Mimosestes</i>
			<i>Eubaptus</i>
			<i>Kytorhinus</i>
			<i>Caryedon</i>
<i>Rhaebus</i>			

Fonte: FARRELL *et al.*, 1998; TUDA, 2007. Adaptado.

Dentre os gêneros citados acima os besouros do feijão, *Callosobruchus* e em especial à espécie *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), são insetos pragas agrícolas, oriundos da África e da Ásia, que atualmente estão distribuídos por todo mundo tropical e subtropical. Ele pertence a um grupo monofilético com *C. analis*, *C. rhodesianus* e *C. subinnotatus*, todas essas espécies, são pragas dos feijões do gênero *Vigna* e conseqüentemente são seus hospedeiros naturais (TUDA *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2011).

Acontecendo a cópula e conseqüentemente a fertilização, as fêmeas adultas depositam seus ovos (oviposição), um por vez, na superfície externa da semente do feijão. O ovo apresenta 0,75 milímetros de comprimento, com forma oval, de aparência clara e brilhante e firmemente aderido a superfície do feijão (Figura 1A). A larva de primeiro instar, recém-eclodida, se mantém no interior do ovo, em segurança, e só entrando em contato com o tegumento e em seguida com o endosperma do feijão. Uma vez que a larva penetra no feijão, a estrutura restante do ovo se torna opaca e branca (Figura 1A), cheia de excrementos da larva. A larva

(Figura 1B), que encontra-se no interior do feijão vai se alimentar do endosperma e do embrião da semente, passar por uma série de mudas, e posicionar-se abaixo do tegumento antes de iniciar a mudança para o estágio de pupa. Embora o tegumento da semente ainda encontre-se intacto, uma “janela” de 1-2 mm é formada na região onde o besouro está empupando (Figura 1C). Ao final do estágio de pupa (Figuras 1D) a metamorfose está completa e a pupa passa para forma de um adulto alado, e por essa razão é classificado como inseto holometabólico. O adulto rompe a pupa e emerge do feijão pela “janela pupal” no tegumento (Figura 1E e 1F). Os adultos ficam totalmente maduros entre 24 e 36 horas após a emergência. Os machos procuram fêmeas para inseminá-las e fêmeas por sua vez, armazenam esperma viável em sua espermateca. Ambos os adultos (machos e fêmeas) não necessitam de alimento ou água durante a sua vida adulta (10-14 dias) (BECK *et al.*, 2011).

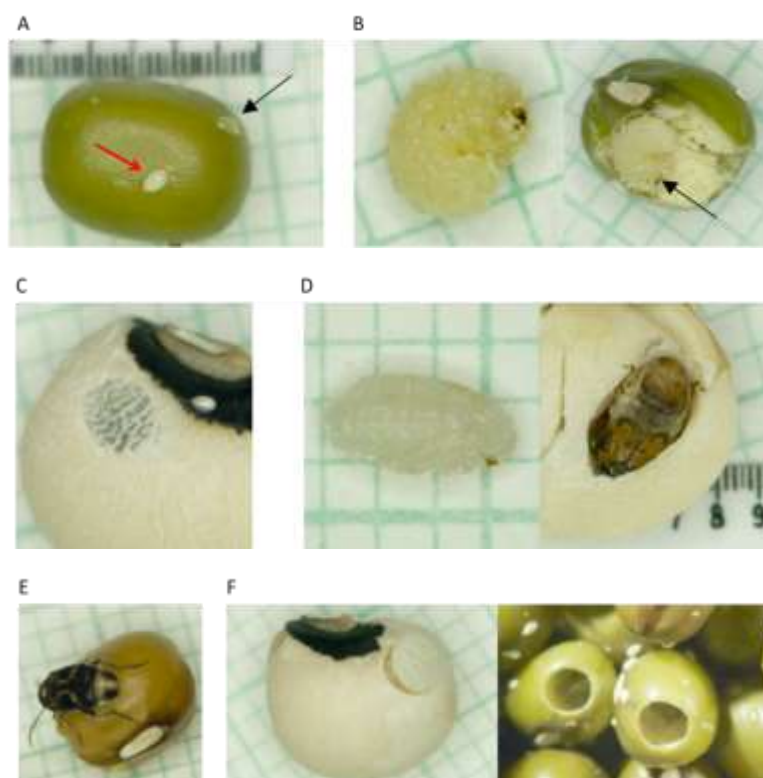


Figura 1. (A) Ovo recém-oviposto (seta preta). Ovo eclodido (seta vermelha) (B) larva do besouro do feijão (*Callosobruchus maculatus*). A área escura no canto superior direito da larva é o aparelho bucal. Larva no feijão-mungo ou feijão da china (*vigna radiata*), indicada pela seta. (C) "janela" no tegumento da semente de feijão-caupi, feijão-fradinho ou feijão-de-corda (*V. unguiculata*) com besouro no local em estágio de pupa. (D) pupa do besouro do feijão (*C. maculatus*). Uma pupa jovem (esquerda) e uma pupa mais velha (à direita) com a cabeça voltada para baixo. (E) adulto do besouro do feijão. Uma fêmea adulta, investigando o feijão para uma possível ovoposição. (F) orifícios de emergência dos adultos. Estas aberturas são o resultado da emergência de um besouro do feijão adulto. Os quadrados visualizados sob os feijões correspondem a papel gráfico, com todos possuindo 1 mm². Fonte: BECK *et al.*, 2011. Adaptado.

Adultos de *C. maculatus* apresentam dimorfismo sexual e são facilmente distinguidos, pela aparência corpórea. A característica mais marcante é a coloração na placa que cobre a extremidade do abdômen. Na fêmea, a placa é alargada e é de cor escura de ambos os lados (Figura 2). No macho, a placa é menor e não tem listras. Em alguns grupos populacionais, as fêmeas são maiores em tamanho do que machos. Além disso, as fêmeas são de coloração preta e os machos são de coloração marrom (BECK *et al.*, 2011).



Figura 2. Vista dorsal do *Callosobruchus maculatus* macho e fêmea respectivamente. A coloração da placa abdominal posterior (pigídio) que é mostrado acima especifica o sexo feminino. Fonte: BECK *et al.*, 2011. Adaptado.

1.3. CONTROLE DE PRAGAS

As plantas alimentícias são atacadas por mais de 10.000 espécies de insetos, 30 mil espécies de plantas daninhas, 100.000 doenças (causadas por fungos, vírus, bactérias e outros microrganismos) e 1.000 espécies de nematóides (DHALIWAL *et al.*, 2010). No entanto, menos de 10% do total dessas espécies pragas são identificadas e consideradas como as principais pragas para as diversas lavouras (DHALIWAL *et al.*, 2010). A gravidade nos problemas provocados pelas pragas vem mudando com a evolução tecnologia associada à agricultura e as modificações de práticas agrícolas (revolução verde), isso propiciou aumento na produção de alimentos (duplicou nos últimos 50 anos), que mesmo assim não supre a demanda crescente da população mundial (estimativa de 9,2 bilhões de pessoas em 2050) (Figura 3). Intensificando o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações (para prevenir ou combater pragas), chegando a um aumento de 15-20 vezes a quantidade de pesticidas aplicados em todo o mundo, visando assegurar uma maior produtividade (CALDAS & SOUZA, 2000 e 2004; OERKE *et al.*, 2005; FAO, 2009; DHALIWAL *et al.*, 2010; POPP *et al.*, 2013). Segundo OERKE *et al.* (2005) o ataque de insetos pragas consome cerca de 35% da produção agrícola mundial. Isso representou um aumento de aproximadamente de 250%, no período

entre 1994 e 2005, já que, o mesmo OERKE *et al.*, em 1994 estimou perdas de 14%. Atualmente a proteção da lavoura está baseada na utilização de agroquímicos, que em 2011 movimentou um mercado mundial de aproximadamente 40 bilhões de dólares, segundo McDougall (2012). Já em 1999, Hilder *et al.*, enfatizava que a ausência desse meio de combate às pragas, poderiam gerar perdas muito mais sérias. Krattiger *et al.*, dois anos antes, concluíram que os danos causados na agricultura mundial sem o uso de pesticidas e outras estratégias de controle estariam estimados em 70% da produção agrícola, totalizando cerca de 400 bilhões de dólares por ano.

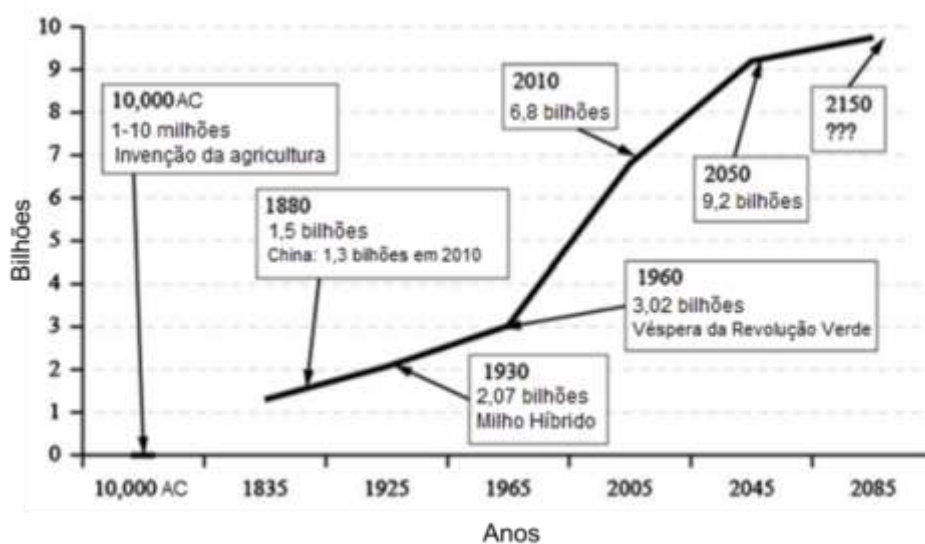


Figura 3. Crescimento da população mundial. De 1960 até a presente data, a população humana mais que duplicou, atingindo 7 bilhões de pessoas, em 2050, a população está estimada para aumentar 30% chegando a cerca de 9,2 bilhões. Fonte: FAO (2009) apud POPP *et al.*, 2013. Adaptado.

Os primeiros inseticidas realmente eficientes foram introduzidos no combate de pragas na metade do século 20. Antes, o controle de pragas era baseado na utilização de compostos inorgânicos como enxofre, arsênio, cianetos e boratos (CASIDA & QUISTAD, 1998), os quais apresentavam alta toxicidade e baixa especificidade, sendo tóxicos para vertebrados (LOPEZ *et al.*, 2005). A introdução dos inseticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos, todos químicos neurotóxicos, significou uma grande revolução na agricultura (ISHAAYA, 2003). Contudo, a utilização dos pesticidas constitui-se num dos mais importantes fatores de risco para o homem e para o meio ambiente (TILMAN *et al.*, 2001; HAPEMAN *et al.*, 2003). Apesar dos benefícios destes compostos na produtividade agrícola, em

2003 a Organização mundial de Saúde estimava que anualmente, 355 mil pessoas morreram em decorrência de envenenamento em todo o mundo, sendo 75% destes casos em países em desenvolvimento como o Brasil. Os pesticidas dependendo da sua persistência e volatilidade podem dispersar globalmente (WILKENING, 2001; GODDUHN & DUFFY, 2003), permanecendo no ambiente por muito tempo. Cada vez mais, grandes quantidades de pesticida e seus metabólitos são detectados contaminando águas superficiais e subterrâneas (KOLPIN *et al.*, 2004; FAVA *et al.*, 2005; WORRALL & BESIEN, 2005), solos (SIVANESAN *et al.*, 2004; CRAVEN & HOY, 2005) e a atmosfera (DUBUS *et al.*, 2000; DUYZER, 2003). Estes pesticidas podem bioacumular em cadeias alimentares (KIDD *et al.*, 1995), provocar impactos sobre a saúde humana e de outras espécies longe de seu local de liberação até muitos anos depois de utilizados (WOLKERS *et al.*, 2006; SAGIV *et al.*, 2007).

Em muitos países, como no Brasil, há ocorrências de casos concretos de fracassos no controle de pragas através do uso exclusivo de pesticidas químicos, principalmente devido a problemas decorrentes da eliminação de inimigos naturais das pragas, desenvolvimento ou aumento de resistência e ressurgência de pragas secundárias. O potencial acúmulo de resíduos de pesticidas no agrossistema e nos produtos vegetais causa uma crescente preocupação mundial. Além das exigências impostas por leis que não permitem a presença ou aceitação de resíduos tóxicos nos alimentos, a sociedade está, a cada dia, exigindo por produtos que estejam seguramente livres de agrotóxicos (SALLES, 2000b). Considerando os aspectos ambientais negativos e a fim de superar a resistência de populações de insetos aos inseticidas neurotóxicos convencionais, a tendência nas pesquisas é a procura por pesticidas com diferentes mecanismos de ação e com baixa toxicidade para a saúde humana e ambiental (DHADIALLA *et al.*, 1998; GRAPOV, 1999; DESNEAUX *et al.*, 2007).

Em meados de 1960 pesquisadores começaram a questionar o modelo de agricultura exclusivamente agroquímico que com o passar do tempo provocam problemas ecologicamente e economicamente insustentáveis (GEIER, 1966; KOGAN, 1998). Como consequência surgiu um novo conceito de controle de pragas visando à minimização de todos esses problemas. Este novo conceito recebeu inicialmente a denominação de Controle Integrado, evoluindo para o termo "Manejo Integrado de Pragas" (MIP) para designar o controle de insetos com bases

ecológicas e envolvendo qualquer tipo de problema que limitasse a produção agrícola decorrente da competição interespecífica (patógenos, insetos, nematoides, plantas daninhas, etc) (KOGAN, 1998). A prática do MIP foi descrita por Geier (1966) e baseia-se nos seguintes pontos:

1. Como se deve modificar o sistema de vida de uma praga para reduzir a sua população a níveis toleráveis, ou seja, inferior ao nível de dano econômico;
2. Aplicação do conhecimento biológico e da tecnologia disponível para obter a modificação desejada (ecologia aplicada);
3. Uso de táticas no controle de pragas adequado à tecnologia existente, compatível com os aspectos qualitativos, econômicos e ambientais, ou seja, de aceitação econômica e social.

Dentro das práticas propostas pelo MIP, Wyss *et al.* (2005) criaram um modelo conceitual para o desenvolvimento de um programa de manejo de artrópodes praga da produção agrícola orgânica. Neste modelo, medidas preventivas indiretas são consideradas de alta prioridade para o início do processo, seguido por medidas mais diretas e curativas, somente aplicadas quando necessário (Figura 4) (ZEHNDER *et al.*, 2007).

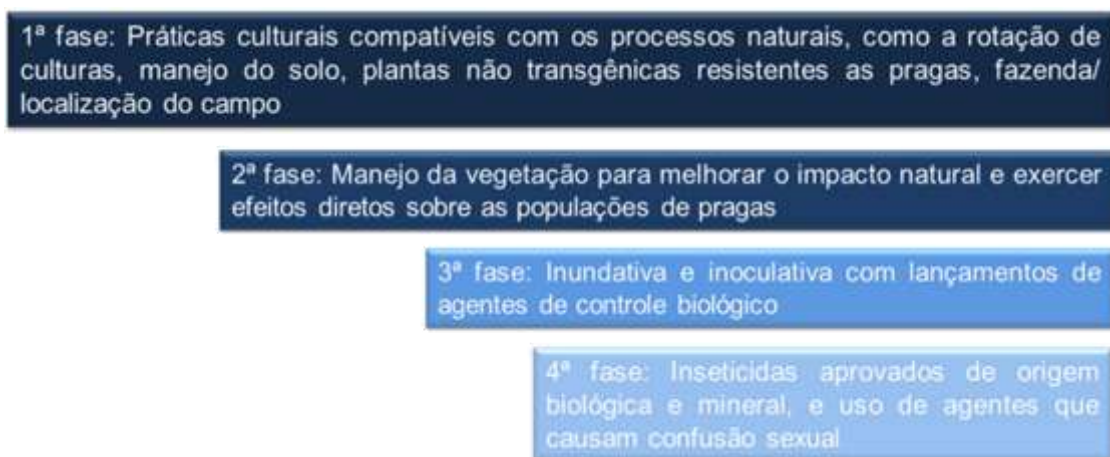


Figura 4. Representação esquemática das estratégias de manejo artrópodes-pragas de culturas orgânicas. A prioridade é dada a estratégias preventivas, que são descritas na primeira e segunda fases, seguida por medidas mais diretas (terceira e quarta fases), se as estratégias preventivas não forem suficientes. Fonte: WYSS *et al.* 2005; ZEHNDER *et al.*, 2007. Adaptado

Um dos principais objetivos de investigações básicas associadas ao manejo integrado de pragas é a perspectiva de entender e interferir nos processos vitais do

inseto (genéticos-bioquímicos-morfofisiológicos), de modo que tal interferência possua escassa ou nenhuma influência sobre outros animais, e ao mesmo tempo, possa servir como instrumento potencial para o controle de espécies prejudiciais (CRUZ *et al.*, 2000). Dentro desta perspectiva o sistema digestório dos insetos é uma região importante de exposição deste com o meio ambiente. Dessa forma, estratégias que interferiram na bioquímica e fisiologia desta região, visando à redução de absorção de nutrientes, seriam ferramentas potencialmente eficientes no manejo de pragas (SHEWRY *et al.*, 1997; HEGEDUS *et al.*, 2009).

1.4. SISTEMA DIGESTÓRIO DOS INSETOS

A habilidade dos insetos de se alimentar de praticamente todo tipo de matéria orgânica é o maior fator para o seu sucesso, capacitando-os para os mais diversos nichos ecológicos (HOUSE, 1961; WIGGLESWORTH, 1972). Seu trato digestório é constituído por um tubo de células epiteliais que se estende da boca até o ânus (WIGGLESWORTH, 1972; TERRA & FERREIRA, 1994; WATANABE & TOKUDA, 2010). Está dividido em três principais regiões baseado na origem embrionária e na sua função fisiológica em estomodeu (intestinos anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeu (intestino posterior), onde o principal local de absorção e digestão é o intestino médio (Figura 5) (WIGGLESWORTH, 1972; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA *et al.*, 1996; WATANABE & TOKUDA, 2010).

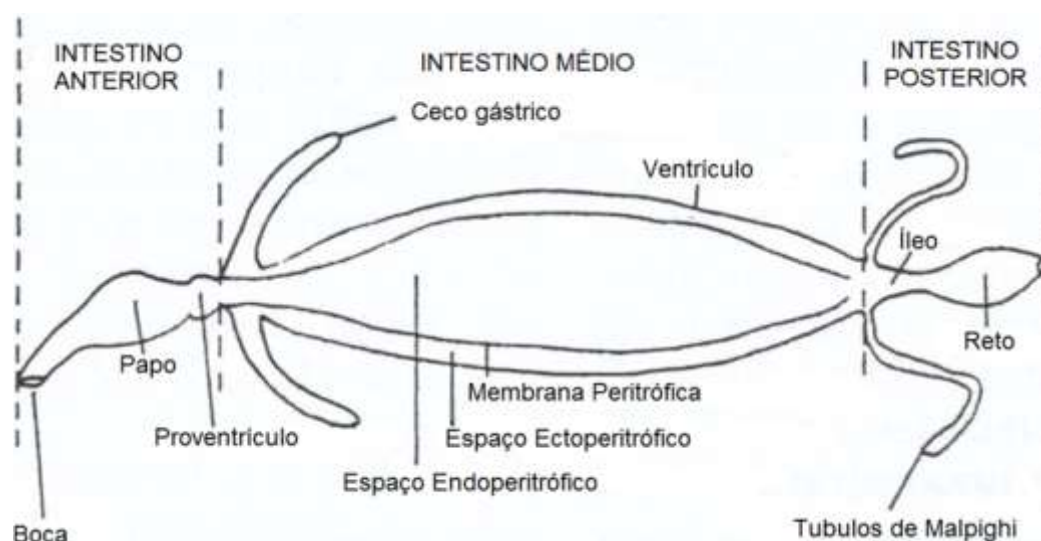


Figura 5. Diagrama generalizado do aparelho digestório de insetos. Fontes: TERRA, 2001. Adaptado

O trato digestório animal está exposto a uma variedade de agentes nocivos de natureza química, física e biológica, necessitando de mecanismos para a sua proteção. Nos vertebrados, o muco é uma secreção que recobre e protege o epitélio intestinal, enquanto auxilia o processo de digestão. Nos insetos, entretanto, observa-se uma camada mucosa ou não, recobrindo o trato digestório do intestino médio dos insetos, protegendo o epitélio intestinal com uma estrutura acelular e semipermeável denominada membrana peritrófica, matriz peritrófica ou gel peritrófico (PETERS, 1992; LEHANE, 1997; WANG & GRANADOS, 1997; TERRA, 2001).

Uma estrutura que envolvia o bolo alimentar de larvas em lepidópteros foi primeiramente observado por LYONET (1762) e citada com o termo de membrana peritrófica (MP) por BALBIANI (1890). Vignon (1901) foi o primeiro a fazer uma revisão sobre as pesquisas relacionadas à MP. Em 1956, Waterhouse sugeriu um provável papel da MP na digestão em insetos. As características da MP foram determinadas por Richards & Richards (1977), que observaram os mecanismos utilizados pelos insetos para as diferentes taxas de síntese da MP. As descobertas de novas características funcionais relacionados à estrutura e função da MP aumentaram vertiginosamente, fomentando diversas informações, que foram objeto de várias revisões (LEHANE, 1997; TELLAM *et al.*, 1999; TERRA, 2001). Os principais componentes da MP são proteínas e carboidratos (quitina). O Estudo da MP da mosca varejeira de ovelhas australianas, *Lucilia cuprina*, rendeu a primeira associação da MP com proteínas e a ligação de quitina a glicoproteínas (ELVIN *et al.*, 1996). Sendo Wang e Granados (2001), os primeiros a descreverem um modelo molecular da MP para lepidóptero.

A membrana peritrófica, que difere do muco dos vertebrados pela incorporação de quitina, resultando em uma estrutura protéica reforçada por fibrilas de quitina (PETERS, 1992). É constituída principalmente por glicoproteínas e proteoglicanos (20-55%) e por quitina (30-40%) (KRAMER *et al.*, 1995; LEHANE, 1997) em uma organização que fornece semi-permeabilidade e elasticidade à estrutura (LEHANE, 1997). A quitina é um importante componente estrutural da membrana peritrófica, pois além de fornecer rigidez, serve também como sítio de ancoragem para proteínas como as peritrofinas (WANG & GRANADOS, 2001). A presença desta membrana define a formação de um espaço endoperitrófico, o qual

contém o alimento ingerido; e o espaço ectoperitrófico correspondendo à região entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal (Figura 5) (TERRA, 2001).

A membrana peritrófica, em insetos pode ocorrer em duas formas, definidas quanto ao seu sitio de síntese: Tipo I e Tipo II (WIGGLESWORTH, 1972; PETERS, 1992). A membrana peritrófica do tipo I, por exemplo, em muitos insetos: Dictyoptera, Orthoptera, Hymenoptera, Lepidoptera (borboletas e mariposas), Diptera (mosquitos adultos hematófagos) e Coleoptera (bruquídeos), é sintetizada por células epiteliais do intestino médio, sendo produzida em resposta a ingestão de alimento, que por descamação da superfície epitelial, dá origem a uma estrutura em forma de bolsa que recobre o alimento (LEHANE, 1997; TERRA 2001). O Tipo II de membrana peritrófica é encontrado em larvas e adultos de Diptera (excluindo os hematófagos) e alguns Lepidoptera, sendo produzida a partir de um pequeno órgão altamente especializado chamado de cárdia situado na região anterior do intestino médio. Este tipo de membrana peritrófica é constitutivamente produzida como um contínuo tubo com estrutura altamente organizada. As mais bem caracterizadas membranas peritróficas do tipo II são de larvas de dípteros muscóides (PETERS, 1992; TELLAM & EISEMANN, 2000; TERRA 2001).

As principais funções atribuídas a esta membrana são a de proteção mecânica contra injúria nas células do intestino médio (WIGGLESWORTH, 1972), uma barreira física contra microorganismos (PETERS, 1992), uma barreira seletiva para enzimas digestivas e produtos de digestão (DAY & WATERHOUSE, 1953) e atuação no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação ecto-endoperitrófica (TERRA, 1988; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA, 2001).

1.5. MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

Os processos co-evolutivos que ocorrem entre plantas e seus inimigos naturais – dentre eles, vírus, fungos, bactérias, nematoides, mamíferos e insetos – promovem uma grande diversidade biológica nos vegetais (THOMPSON 1994; RAUSHER 2001). Dentre os fatores que contribuem com essa diversidade, a herbivoria pode ser destacada, já que a pressão da herbivoria excessiva dos insetos induz a seleção nas plantas de diversas estratégias de resistência e/ou proteção. Resistência é o termo usado para descrever a capacidade das plantas em prevenir,

restringir ou retardar a penetração de um predador no tecido hospedeiro (KOGAN, 1986; HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; HELKER & MEINERS 2010; CÂNDIDO *et al.*, 2011). Essa resistência é baseada nos vários mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, durante a evolução (Tabela 3) (SCHULER *et al.*, 1998; RAUSHER 2001; HELKER & MEINERS 2010; MITHÖFER & BOLAND 2012).

As defesas de plantas podem ser classificadas como físicas (espinhos, tricomas, e tegumentos) ou químicas se há envolvimento de substâncias químicas nos mecanismos pelos quais elas se protegem. As defesas químicas, por sua vez, podem ser de natureza não proteica ou de natureza proteica (RYAN, 1990; MITHÖFER & BOLAND, 2012). Por outro lado, as defesas também podem ser agrupadas em duas categorias: defesas constitutivas, se sua ação faz-se dentro do programa de desenvolvimento normal da planta nos diferentes tecidos vegetais; ou induzidas quando estão envolvidas diretamente na resposta a infecção ou estímulos ambientais (CHESSIN & ZIPF, 1990; HELKER & MEINERS 2010; CÂNDIDO *et al.*, 2011; MITHÖFER & BOLAND 2012). Essa resposta induzida pode resultar em efetivos mecanismos de resistência a doenças quando ela é expressa pela planta, sistemicamente. Nesse caso, os agentes envolvidos induzem uma resposta do hospedeiro, não apenas em torno das partes atingidas, como também em partes da planta distante da área onde ocorreu a injúria, sendo este processo denominado, imunização sistêmica adquirida (DEAN & KUC, 1986; GOTTSTEIN & KUC, 1989). As defesas induzidas são mais importantes para as partes vegetativas das plantas, enquanto que as defesas constitutivas são mais importantes para as sementes (Tabela 2) (XAVIER-FILHO, 1993; UCHÔA *et al.*, 2002; CÂNDIDO *et al.*, 2011).

Diversas proteínas envolvidas no processo de defesa presentes em sementes de leguminosas foram isoladas, purificadas e caracterizadas (Tabela 3). Entre elas estão enzimas como: quitinases (SANTOS *et al.*, 2004), β -1,3 glucanases; inibidores de enzimas hidrolíticas como: inibidores de amilases (SAWADA *et al.*, 2006) e de proteinases (ARAUJO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2005b), e proteínas de reserva como: as arcelinas (MINNEY *et al.*, 1990), lectinas (MORAES *et al.*, 1996) e vicilinas (MOURA, *et al.*, 2007). Além disso, lectinas e inibidores de proteinases podem apresentar também atividades hemolíticas e anticoagulantes (BANERJEE & SEN, 1981; Kim *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; MONTEIRO, 2011; LEITE *et al.*, 2012).

Tabela 2

Resumo dos fatores conhecidos que provocam respostas defensivas nas plantas em diferentes ataques por artrópodes herbívoros.

ELICITOR	RESPOSTA DA PLANTA	REFERENCIAS
Toque		
Pressão	Alargamento dos canais iônicos na membrana plasmática, seguida de uma rápida mudança na concentração citosólica de Ca ⁺⁺	Legué <i>et al.</i> (1997) Nakagawa <i>et al.</i> (2007) Haswell <i>et al.</i> (2008)
Arranhões nas folhas causados por tarsos de herbívoros	Aumento das concentrações foliares de ácido γ -aminobutírico (GABA)	Bown <i>et al.</i> (2002) Hall <i>et al.</i> (2004)
Secreções liberadas a partir dos tarsos dos insetos	Desconhecida	Beutel & Gorb (2001); Gorb (2007); Bullock <i>et al.</i> (2008)
Ovoposição		
"Bruchins" liberadas na presença de fêmeas de bruquídeos depositando ovos	Defesa direta: crescimento de neoplasias, mudança da transcrição de vários genes	Doss <i>et al.</i> (1995) Doss <i>et al.</i> (2000) Doss (2005)
Cianeto de benzila lançado contra ovos de <i>Pieris brassicae</i>	Defesa indireta: alteração na superfície foliar que recruta fêmeas do parasitoide que estão prontas para depositarem seus ovos. Intensificando busca por ovos do hospedeiro da planta; mudança de transcrição de numerosos genes	Fatouros (2005) Fatouros <i>et al.</i> (2005, 2008) Little <i>et al.</i> (2007)
Secreção proteica em ovos (= secreção do oviduto), depositadas em ovos por vespões e besouros folha	Defesa indireta: mudança na liberação de substâncias voláteis nas plantas que atraem parasitoides dos ovos dos hospedeiros; redução da atividade fotossintetizante; mudança de transcrição da síntese de terpeno	Meiners & Hilker (2000) Hilker <i>et al.</i> (2002a, 2005) Schroeder <i>et al.</i> (2005) Koepeke <i>et al.</i> (2008)
Alimentação		
Ácidos graxos – aminoácidos conjugados (FACS) de regurgitação, principalmente de larvas de lepidópteros	Defesa indireta: mudança na liberação das substâncias voláteis das plantas, a liberação dessa substância voláteis atraem parasitoides das larvas que estão se alimentando da planta.	Revisado por: Paré <i>et al.</i> (2005) Tumlinson & Lait (2005) Felton (2008) Mithoefer & Boland (2008) Tumlinson & Engelberth (2008)
	Defesa direta: indução da produção de inibidor de tripsina	Roda <i>et al.</i> (2004)
	A despolarização da membrana, provoca o influxo de Ca ⁺⁺ na cascata de várias respostas, incluindo a biossíntese do ácido jasmônico pela via octadecanoica, muda a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de fitormônios e de compostos defensivos	Revisado por: Schaller & Weiler (2002) Arimura <i>et al.</i> (2005) Kant & Baldwin (2007) Maffei <i>et al.</i> (2007a, b) Wasternack (2007) Heil & Ton (2008) Schaller (2008)
Caeliferinas de gafanhotos – regurgitação	Defesa indireta: mudança nas substâncias voláteis das plantas	Alborn <i>et al.</i> (2007)
Inceptinas isoladas de larvas de lepidópteros na regurgitação	Defesa indireta: mecanismo disparado por gatilhos que promovem o aumento e liberação de fitormônios voláteis relacionados com a defesa	Schmelz <i>et al.</i> (2006, 2007)
β -glicosidase de larva de <i>Pieris brassicae</i> – regurgitação	Defesa indireta: mudança nas substâncias voláteis de plantas que atraem carnívoros	Mattiacci <i>et al.</i> (1995)

Fonte: HELKER & MEINERS 2010. Adaptado.

Tabela 3

Classificação e origem de proteínas de defesa armazenadas em plantas e sementes. PSS: Proteínas estocadas em sementes; PSV: Proteínas estocadas em tecidos vegetativos

FAMÍLIA DE PROTEÍNA	CLASSIFICAÇÃO	TAMANHO kDa	ORIGEM
Albuminas 2S	PSS	10-20	Constitutiva
Inibidores de proteinases Kunitz	PSS/PSV	18-26	Constitutiva/Induzida
Lectinas de plantas	PSS/PSV	30-60	Constitutiva
Proteínas ricas em Glycina	PSS	6-30	Constitutiva
Vicilinas	PSS	150-190	Constitutiva
Patatinas	PSV	40-45	Constitutiva
Octatinas	PSV	18	Constitutiva
Tarinas	PSV	12,5	Constitutiva

Fonte: CÂNDIDO *et al.*, 2011. Adaptado.

1.6. VICILINAS

Nas últimas duas décadas, foi visto que proteínas de reserva de sementes do tipo globulina 7S (vicilinas), além de fornecerem aminoácidos, que são fundamentais para germinação da futura planta, também atuam como moléculas envolvidas em mecanismos de defesa das sementes, conferindo resistência a insetos pragas (DERBYSHIRE *et al.*, 1976; TEMPLEMAN *et al.*, 1987; XAVIER-FILHO *et al.*, 1989; MACEDO *et al.*, 1993; SHUTOV *et al.*, 1995; SALES *et al.*, 2000). As vicilinas também apresentam efeito contra fungos fitopatogênicos, ligando-se a estruturas quitinosas presentes na parede celular de fungos, interferindo na germinação dos esporos ou dos conídios de uma variedade de fungos, inibindo o crescimento de leveduras (GOMES *et al.*, 1997 e 1998).

Como apresentado acima, as vicilinas compreendem uma classe de proteína de reserva muito bem conhecida, podendo constituir 70-80% do total de proteínas da semente. Geralmente são proteínas triméricas, com estrutura terciária composta de folhas β formando um barril β , seguido por duas α -hélices antiparalelas, de massa molecular variando de 150 a 190 kDa, não apresentando ligações dissulfeto devido á ausência de resíduos de cisteína (DERBYSHIRE *et al.*, 1976; PEDALINO *et al.*, 1992; CÂNDIDO *et al.*, 2011). As subunidades da vicilina de ervilha são sintetizadas inicialmente como um grupo de polipeptídeos de peso molecular entre 40 a 70 kDa, porém a proteólise pós-traducional e glicosilação resulta em subunidades com pesos

moleculares entre 12,5 a 33 kDa (Figura 6C) (GATEHOUSE *et al.*, 1984; CÂNDIDO *et al.*, 2011). Os dois processos citados anteriormente influenciam diretamente na adição incompleta ou degradação parcial das ligações dos oligossacarídeos nas cadeias laterais dos peptídeos tornando difícil a digestão desses fragmentos por parte dos insetos (CHEE *et al.*, 1991; MACEDO *et al.*, 1995; CÂNDIDO *et al.*, 2011). As subunidades são codificadas, na sua maioria, por 2 a 3 tipos de genes, com 3 a 4 cópias de cada tipo por genoma haplóide (GOLDBERG *et al.*, 1981; SUN *et al.*, 1981; TIERNEY *et al.*, 1987; BOWN *et al.*, 1988; HARADA *et al.*, 1989). Observa-se que os genes de vicilinas de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Glycine max* (Figura 6A e B), quando comparados, apresentam homologia. Cada gene tem 6 éxons e 5 íntrons (DOYLE, *et al.*, 1986; HIGGINS *et al.*, 1988).

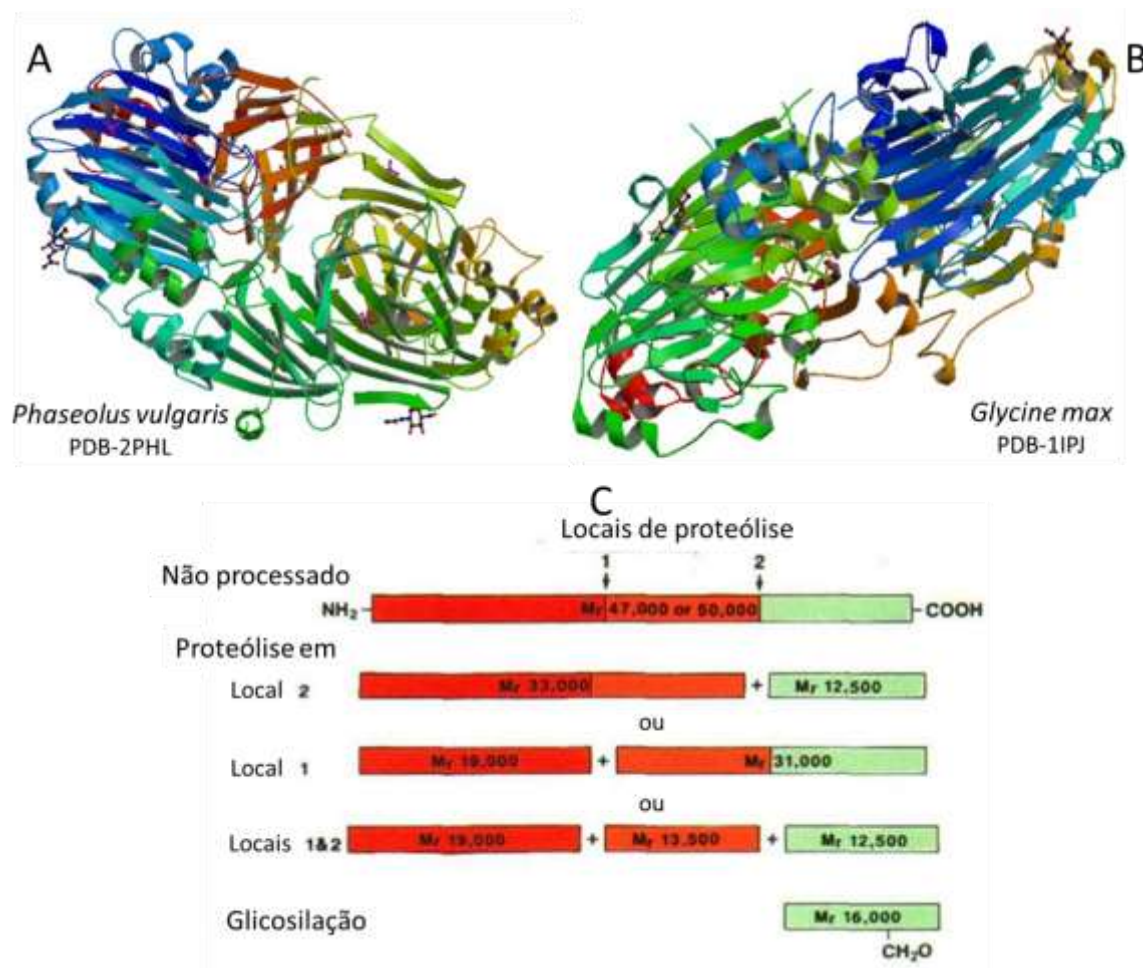


Figura 6. (A) e (B) Modelagem das vicilinas de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* respectivamente. (C) Diagrama esquemático mostrando a origem das subunidades da vicilina *Pisum sativum* (ervilha). Fonte: SHEWRY *et al.*, 1995. Adaptado

A incorporação de vicilinas isoladas de sementes resistentes a bruquídeos em sistema de dieta artificial afetou o desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus*, causando efeitos significativos sobre o desenvolvimento e a mortalidade das larvas (MACEDO *et al.*, 1993; SALES *et al.*, 1996; YUNES *et al.*, 1998). No nosso laboratório são realizados estudos de bioprospecção por proteínas tóxicas em sementes ditas selvagens presentes nos biomas de mata atlântica e caatinga. Resultados recentes do nosso grupo mostraram que vicilinas extraídas das sementes de outras leguminosas foram tóxicas para os bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, dípteros – *Ceratitis capitata* (tanto para larvas quando para adultos) e lepidóptera – *Plodia interpunctella* (TEIXEIRA, 2006; MACEDO, 2007; AMORIM, 2007; MACEDO, 2010).

Neste estudo, uma vicilina de sementes de *Anadenanthera macrocarpa* foi purificada, parcialmente caracterizada e avaliada quanto à sua atividade bioinseticida em sistema de bioensaio contra o inseto praga do feijão de corda, *C. maculatus* (Bruquídeo). Já que o mecanismo de toxicidade destas proteínas contra os insetos pragas e fungos fitopatogênicos ainda não está totalmente esclarecido, mas parece estar relacionado à afinidade dessas proteínas pela quitina presente na membrana peritrófica e/ou nas células epiteliais do intestino médio dos insetos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar e Investigar o potencial bioinseticida (*in vivo*) da vicilina de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-vermelho) sobre *Callosobruchus maculatus*.

2.2. Específicos

1. Purificar e caracterizar uma vicilina de sementes de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-vermelho).
2. Avaliar o efeito da vicilina de *A. macrocarpa* sobre a massa e mortalidade de larvas e o desenvolvimento dos adultos de *C. maculatus*, determinando a LD₅₀, WD₅₀ e ED₅₀.
3. Fomentar resultados que possam tornar mais claro o possível mecanismo de ação da vicilina contra o bruquídeo *C. maculatus*.
4. Descartar a presença de outras proteínas com atividades biológicas como: atividade inibitória para proteinase serínicas (tripsina, quimotripsina e elastase neutrofílica), cisteínica (papaína), atividade hemaglutinante anticoagulante e hemolítica, nos passos de purificação da AmV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Sementes

As sementes *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho) foram fornecidas pela divisão técnica – setor de sementeiras do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade - Nísia Floresta, RN (Figura 7). Encontravam-se armazenadas em sacos de papel sob temperatura e umidade controlada. O angico-vermelho (*A. macrocarpa* (Benth) Brenan) é uma espécie pertencente à Família Fabaceae (Leguminosae) e Subfamília Mimosoideae, podendo atingir 20 metros de altura, com tronco de 40 a 60 centímetros de diâmetro. Ocorre no Cerrado e Caatinga, preferencialmente em terrenos altos e bem drenados, podendo formar agrupamentos quase homogêneos (LORENZI, 2002; SARZI *et al.*, 2008). As sementes foram armazenadas em salas hermeticamente fechadas com temperatura e umidade controladas.

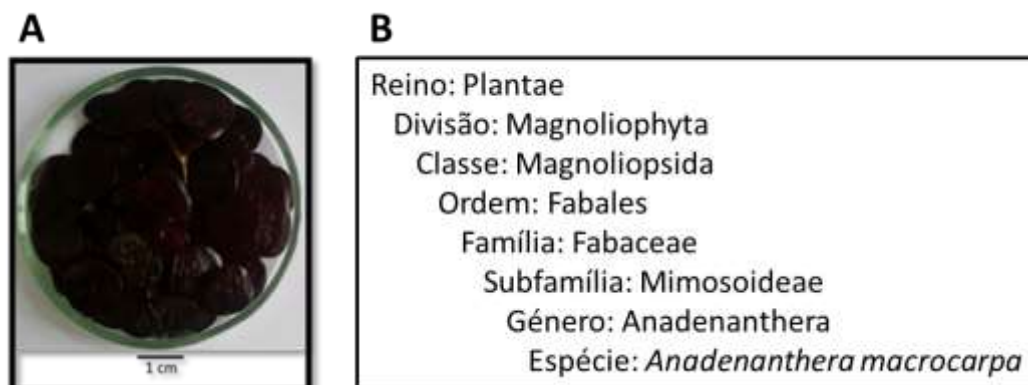


Figura 7. Sementes (A) e classificação taxonômica da *A. macrocarpa* segundo Brenan (1955) (B). Fonte: Patrícia Barbosa – imagem, LORENZI (2002) e ITIS, 2011 – classificação.

3.1.2. Inseto

As larvas e os adultos do inseto *C. maculatus* (Figura 8) utilizados neste trabalho foram provenientes da criação estabelecida no Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas do Departamento de Bioquímica no Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

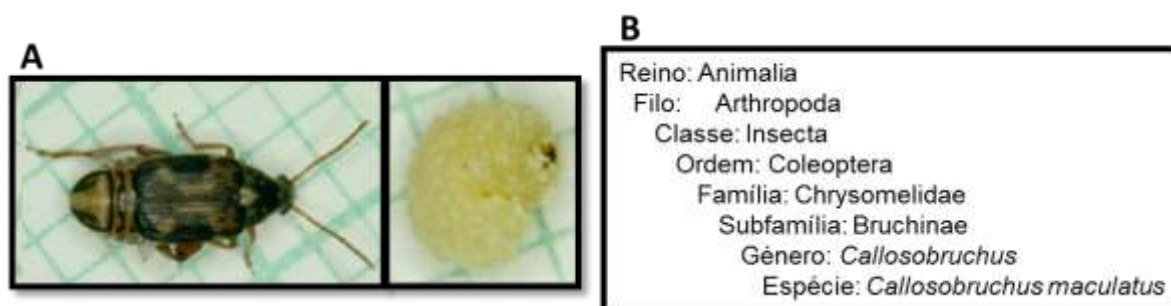


Figura 8. Adulto e larva, cada quadrado possui 1 mm² (A) e classificação taxonômica do *C. maculatus* segundo Fabricius, 1775 (B), sob o número serial taxonômico de 187743, segundo ITIS, 2011 e FARRELL *et al.*, 1998. Imagens adaptadas de BECK *et al.*, 2011.

3.1.3. Eritrócitos Humanos

Bolsas de concentrado de eritrócitos humanos dos diferentes tipos do sistema ABO foram gentilmente doados pelo HEMONORTE, Natal, RN. As bolsas fornecidas encontravam-se fora do prazo de validade para transfusões.

3.1.4. Reagentes

- ✓ Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Comassie Blue G250 e R250 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Acrilamida (Reidel – germany Co.);
- ✓ Ácido tricloroacético (Sigma, USA);
- ✓ Azocaseína (Sigma, USA);
- ✓ N,N-metileno-bis-acrilamida (Reidel – germany Co.);
- ✓ Temed (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Inibidores de enzimas (Sigma, USA);
- ✓ Quitina de carapaça de lagosta, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA;
- ✓ Exclusão Molecular Tricorn 10x300 superdex 75
- ✓ Fase reversa C8 Phenomenex (5 µm, St 4.6/250, 100 Å)

3.1.5. Equipamentos

- ✓ Banho Maria (Tecnal – Te 056);
- ✓ Balança analítica eletrônica - BEL Engineering;
- ✓ Balança eletrônica – Tecnal (mod. B-tec 2200);
- ✓ Centrífuga refrigerada HITACHI CR G;
- ✓ Cuba de eletroforese BIORAD;
- ✓ Espectrofotômetro Pharmacia Biotec (mod, ultrospec 2100 – pro);
- ✓ Purificador de água Milli-Q® Water System (Millipore Corp.);
- ✓ FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.);
- ✓ Liofilizador Labconco-Freezone com bomba Chemistry Hibrid Pump RC 6;
- ✓ Leitor de Microplaca BIOTEK-Epoch;
- ✓ HPLC Hitachi;
- ✓ Microcentrífuga para eppendorf 5410;
- ✓ Microcentrífuga para hematócrito (Modelo spin 1000);
- ✓ pHmetro Analyser (pH 300);
- ✓ Sistema de eletroforese vertical Amersham Biosciences;
- ✓ Moinho Tecnal (TE 631/2);
- ✓ Além dos aparelhos usuais do laboratório.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MANUTENÇÃO DOS INSETOS

Sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) foram infestados com fêmeas sexualmente maduras de *C. maculatus* por um período de 24 horas, na proporção de uma fêmea para 5 sementes. Após esse período, as fêmeas foram retiradas e as sementes infestadas mantidas em frascos de plástico transparente fechados com tampas plásticas com passagem de ar permanente, e incubadas em câmara de criação mantida à temperatura constante de 28 °C e umidade relativa de 70%, por um período de 28 a 30 dias. Os insetos emergidos das sementes foram retirados diariamente dos frascos, colocados em outros frascos vazios e deixados

por um período de 48 horas para maturação sexual e fertilização das fêmeas. Após este período, as fêmeas fecundadas foram utilizadas para infestar novas sementes de feijão, a fim de manter uma população de insetos equilibrada para a realização dos experimentos (TEIXEIRA, 2006).

3.2.2. PURIFICAÇÃO DA VICILINA

3.2.2.1. Preparo da farinha de sementes de *A. macrocarpa*.

Sementes secas de *A. macrocarpa* (Angico-vermelho) tiveram seus tegumentos removidos, e em seguida seus cotilédones foram triturados em moinho elétrico refrigerado para obtenção de uma farinha de granulação fina.

3.2.2.2. Preparo do Extrato Bruto das Sementes

O extrato bruto da farinha das sementes foi obtido a partir da homogeneização em tampão tetraborato de sódio 0,02 M com cloreto de sódio 0,15 M, pH 7,5 na proporção de 1:10 (m:v) sob agitação constante por 4 h à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sedimentado foi descartado e o sobrenadante filtrado em lã de algodão foi denominado de Extrato Bruto (EB).

3.2.2.3. Fracionamento com Sulfato de Amônio

O extrato bruto foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio em três faixas de concentração: 0–30%, 30–60% e 60–90%. Após cada etapa de fracionamento, a solução permaneceu a 4 °C por aproximadamente 16 horas e, posteriormente foi centrifugada a 12.000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. Os precipitados resultantes de cada fracionamento foram ressuspensos em tetraborato de sódio 0,02 M com cloreto de sódio 0,15 M em pH 7,5 e submetidos à diálise, com poros de 8 kDa durante 18 horas a 4 °C contra o mesmo tampão. Após diálise as frações foram denominadas F0–30% e F30–60% (frações albumínicas) e F60–90%

(fração globulínica), de acordo com a faixa de saturação de sulfato de amônio na qual precipitaram.

3.2.2.4. Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina

A fração F60–90% das sementes foi submetida a uma cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Uma coluna de afinidade de quitina com dimensões de 2,9 x 3,7 x 3,0 cm (volume total de 32,23 mL) foi previamente estabilizada com tampão tetraborato de sódio 0,02 M com cloreto de sódio 0,15 M em pH 7,5. Frações de 4,0 mL foram coletadas e suas absorvâncias monitorada a 280 nm. Após a eluição das proteínas não adsorvidas com tampão de equilíbrio, as proteínas retidas foram eluídas com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. As frações correspondentes ao pico retido foram dialisadas contra água destiladas, liofilizadas e denominadas AmV.

3.2.2.5. Cromatografias em sistemas de FPLC e HPLC

Fracionamento por FPLC. As amostras obtidas por cromatografia de afinidade em matriz de quitina foram submetidas à separação por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75, dimensões 10x300 mm (Tricorn, GE Healthcare) em sistema cromatográfico de baixa pressão AKTA purifier (GE Healthcare). A fase móvel constituída de tampão Tris 0,02 M com NaCl 0,2 M em pH 8,0 a um fluxo de 0,5 mL/min, foi também empregada para equilibrar a coluna. A cromatografia foi iniciada com a aplicação de 1 mL de amostra na concentração de 10 mg/mL, sendo coletadas frações de 2 mL.

Fracionamento por HPLC. O pico protéico derivado do fracionamento por cromatografia de exclusão molecular foi submetido a cromatografia de fase reversa realizada em HPLC, cromatógrafo Hitachi usando-se colunas do tipo C8 Phenomenex (5 µm, St 4.6/250, 100 Å). Para isso, foram aplicados 20 µL (10 µg/µL), à coluna pré-equilibrada com ácido trifluoroacético (0,1%). A proteína foi eluída com gradiente linear (de 0 - 100%) de acetonitrila 100% em ácido trifluoroacético 0,1%. O

perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. Os picos foram coletados manualmente, liofilizados e testados quanto às suas atividades biológicas.

3.2.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina para construir uma curva de proteína padrão. Para o ensaio, 10 μ L de amostra proteica foram conjugados com 200 μ L com Reagente de Bradford. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 10 min. As leituras das amostras foram verificadas à absorbância a 595 nm. A concentração proteica das amostras foi calculada a partir da equação da curva obtida para Albumina Serica Bovina - BSA.

3.2.4. DOSAGEM DE CARBOIDRATOS

Para caracterização da natureza glicoproteica das vicilinas isoladas foi realizada a dosagem de carboidratos pelo método do fenol/ácido sulfúrico como previamente descrito por Dubois *et al.*, (1956), adaptado por Masuko *et al.*, (2005), empregando-se como padrão D-glicose. AmV foi dissolvida em tampão tetraborato de sódio 0,02 M pH 7,5 contendo 0,15 M de NaCl na concentração de 10 mg/mL. Para o ensaio, 50 μ L desta solução foram adicionados a 30 μ L fenol 5%, 150 μ L de ácido sulfúrico. A reação foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 90 °C. As leituras das amostras foram verificadas à absorbância a 490 nm. A concentração de carboidratos das amostras foi calculada a partir da equação da curva de D-glicose nas concentrações de 0,05 a 0,5 mg/mL previamente construída.

3.2.5. DETECÇÃO DE OUTRAS PROTEÍNAS DE DEFESA NAS FRAÇÕES

A. macrocarpa

A presença de outras proteínas de defesa de plantas foi monitorada ao longo do processo de purificação da vicilina de *A. macrocarpa*. As frações obtidas em todas as etapas de purificação foram submetidas a ensaios inibitórios contra enzimas digestivas do tipo serínicas, cisteínicas e α -amilásica. Para detecção da

presença de possíveis lectinas, também foram realizados ensaios de hemaglutinação em todos os passos de purificação. Também foram avaliadas as atividades das frações por meio de ensaio de hemólise e de coagulação, em todas as frações, com intuito de excluir a presença de algumas proteínas com essas características ou presença dessas atividades para a vicilina.

3.2.5.1. Ensaio para avaliação da presença de atividade inibitória para enzimas digestivas

A cada passo de purificação foram congeladas alíquotas de 1 mL das frações para serem testadas quanto a presença de atividade inibitória. Para cada ensaio uma unidade de inibidor foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 para suas respectivas absorbâncias. Com resultados observados em UI (unidades de inibição) por miligrama de proteína.

a. Preparo dos substratos

Amido a 0,5%. Pesou-se 2,5 g de amido solúvel e adicionou-se 500 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9. Ferver até completar dissolução. Resfriar e aferir para 500 mL com o tampão fosfato de sódio 20 mM. Guardar em recipiente plástico sob refrigeração.

Azocaseína a 1%. Um grama de azocaseína foi pesado e dissolvido em 100 mL de tampão tetraborato de sódio 0,05 M pH 7,5. A suspensão foi aquecida e deixada em ebulição por 5 minutos. Após o resfriamento, o pH da solução foi reajustado e o volume completado para 100 mL com água destilada. Essa solução foi armazenada a -20 °C até sua utilização.

SAAVpNa a 0,15M. Quantidade suficiente do substrato sintético SAAVpNA foi dissolvido em DMSO 100% para uma concentração final de 0,15 M

b. Determinação da Atividade Inibitória contra:

Enzima α -amilase. Alíquotas de 200 μ L de uma solução de α -amilase (0,2 mg/mL em tampão fosfato de sódio, 0,02 M, pH 6,9) foram pré-incubadas a temperatura ambiente com 40 μ L da amostra, juntamente com 160 μ L de água destilada e 400 μ L de amido 0,5% (tampão fosfato de sódio, 0,02 M, pH 6,9). A mistura foi então incubada a 25 °C em intervalos de tempo de 1, 2 e 3 minutos, alíquotas de 200 μ L da mistura foram coletadas e em seguida adicionadas a tubos contendo 100 μ L DNS (Solução de hidróxido de sódio 2 M com DNS-ácido 3,5-dinitro salicílico, mais tartarato de sódio e potássio, solubilizada em água destilada). A nova mistura foi mantida em banho maria por 15 minutos a 85 °C. Após este período foram adicionados 900 μ L de água destilada e as amostras resultantes foram medidas a absorvância de 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e provas em branco foram feitas (ABESUNDARA *et al.*, 2004).

Enzima tripsina. Alíquotas de 10 μ L da solução de tripsina bovina (0,3 mg/mL em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,5) foram pré-incubadas com 120 μ L de HCl 0,0025 M, 370 μ L de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e 50 μ L das frações derivadas de *A. macrocarpa*, por 10 min, a 37 °C. Após o tempo de pré-incubação foram adicionados 200 μ L de solução de azocaseína 1%, e a mistura de reação permaneceu por mais 20 minutos nas mesmas condições. A reação foi parada pela adição de 300 μ L de solução de TCA 20%. O material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g e alíquotas de 700 μ L do sobrenadante foram alcalinizadas com o mesmo volume de NaOH 2 N. O efeito das frações sobre a atividade proteolítica a pH 7,5 foi observado pela medida da absorvância a 440 nm originada dos peptídeos diazotizados. Os ensaios foram adaptados de Xavier-Filho e Campos (1989), realizados em triplicatas e provas em branco (sem adição das frações) foram feitas.

Enzima Quimotripsina. Alíquotas de 10 μ L da solução de quimotripsina (0,2 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 contendo 0,02 M de CaCl_2) foram pré-incubadas com 490 μ L de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 contendo 0,02 M de CaCl_2 e 50 μ L das frações, por 10 min, a 37 °C. Após o tempo de pré-incubação foram adicionados 200 μ L de solução de azocaseína 1%, e a mistura permaneceu por mais 20 minutos

nas mesmas condições. A reação foi parada pela adição de 300 µL de solução de TCA 20%. O material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g e alíquotas de 700 µL do sobrenadante foram alcalinizadas com o mesmo volume de NaOH 2 N. O efeito das frações protéicas sobre a atividade proteolítica a pH 7,5 foi observado pela medida da absorbância a 440 nm originada dos peptídeos diazotizados. Os ensaios foram adaptados de Xavier-Filho e Campos (1989), realizados em triplicatas e provas em branco foram feitas.

Enzima Papaína. Alíquotas de 20 µL de uma solução de papaína (0,2 mg/mL em tampão fosfato de sódio monobásico 0,25 M em pH 6,0) foram pré-incubadas com 0,002 M de EDTA e 0,003 M de DTT, com 440 µL de fosfato de sódio monobásico 0,25 M em pH 6,0 e 50 µL das frações, por 10 min, a 37 °C. Após o tempo de pré-incubação foram adicionados 200 µL de solução de azocaseína 1%, e a mistura de reação permaneceu por mais 20 minutos nas mesmas condições. A reação foi parada pela adição de 300 µL de solução de TCA 20%. O material foi centrifugado por 15 min a 10.000 x g e alíquotas de 700 µL do sobrenadante foram alcalinizadas com o mesmo volume de NaOH 2 N. O efeito das proteínas sobre a atividade proteolítica a pH 7,5 foi observado pela medida da absorbância a 440 nm originada dos peptídeos diazotizados. Os ensaios foram adaptados de Xavier-Filho e Campos (1989) realizados em triplicatas e provas em branco foram feitas.

Enzima Elastase neutrofílica. A avaliação da presença de inibição para elastase neutrofílica foi realizada segundo a metodologia descrita por Johansson *et al.*, (2002), empregando SAAVpNA como substrato. Alíquotas de 10 µL (0,4 µg/µL) da elastase neutrofílica purificada a partir de neutrófilos derivados de bolsas sanguíneas doadas, foram pré-incubadas com 50 µL das frações protéicas (10 µg) e 680 µL de tampão PBS 0,15 M, pH 7,4 por 15 min a 37 °C. Em seguida a reação foi iniciada com a adição de 5 µL de substrato SAAVpNA (0,15 M). Após 2 horas a reação foi parada com a adição de 250 µL de ácido cítrico 2 %. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 10000 x g a 25 °C, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e provas em branco foram feitas.

3.2.5.2. Detecção de Lectinas

Preparação dos Eritrócitos para os Ensaios de Hemaglutinação. Alíquotas de 2 mL de sangue foram lavadas com 10 mL de solução salina fisiológica e centrifugadas a 924 x g, até a obtenção de uma massa de eritrócitos íntegros livre de soro e material hemolisado.

Tratamento dos Eritrócitos com Papaína. Uma solução estoque de papaína a 1% em solução salina foi preparada e mantida a 4 °C por 24 horas com agitação ocasional. A solução foi estocada em alíquotas de 3 mL de papaína a -20 °C. Quando necessário, foi diluído na proporção 1:10 (v/v) com tampão SORENGEN (3 partes de NaH_2PO_4 0,067 M e 1 parte de KH_2POH , 0,067 M). A solução de papaína foi adicionada a massa de eritrócitos, previamente lavado, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C, com agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e o precipitado resultante foi lavado seis vezes com solução salina gelada. O hematócrito foi determinado, e em seguida as hemácias foram diluídas a 4% em solução salina.

Tratamento dos Eritrócitos com Tripsina. Uma solução estoque de tripsina a 1% em solução salina foi preparada e mantida a 4 °C por 24 horas com agitação ocasional. A solução foi estocada em alíquotas de 3 mL a -20 °C. Quando necessário, a solução estoque foi diluída na proporção 1:10 (v/v) com tampão SORENGEN (3 partes de NaH_2PO_4 0,067 M e 1 parte de KH_2POH , 0,067 M). A solução de tripsina foi adicionada a massa de eritrócitos, previamente lavado, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura ficou a temperatura ambiente por 45 minutos, com agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e o precipitado resultante foi lavado seis vezes com solução salina gelada. O hematócrito foi realizado e as hemácias foram diluídas a 4% em solução salina

Ensaio de Hemaglutinação das Frações. Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de 96 poços com fundo em “V” por meio de diluição seriada das amostras testes (1/2, 1/4, 1/8, 1/16... 1/1024). No primeiro poço foram adicionados 50 μL da amostra não diluída, deste foram transferidos 25 μL de

amostra para o segundo poço no qual foram acrescentados 25 µL de solução salina, e a partir daí foi iniciada a diluição seriada com a transferência de 25 µL da solução do segundo poço para o terceiro poço seguido de adição de salina, e assim sucessivamente até a diluição de 1/1024. Em seguida alíquotas de 25 µL de uma suspensão de eritrócitos a 4%, submetidos a tratamentos enzimáticos foram adicionados a todos os poços contendo as proteínas diluídas. A reação foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. O grau de aglutinação foi observado visualmente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), que foi definido como o inverso da maior diluição da amostra que tenha apresentado nítida aglutinação (MOREIRA & PERRONE, 1977).

3.2.5.3. Detecção de atividade Hemolítica

Com o intuito de avaliar se as frações e AmV apresentavam alguma atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos, hemácias humanas foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas três vezes com Tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15M. O mesmo tampão foi utilizado para preparar uma suspensão 1% (v:v) de hemácias e solubilizar as amostras. Em tubos de 1,5 mL, 100 µL da suspensão de hemácias foram incubados com 100 µL da amostra por 60 minutos, à temperatura ambiente. As referências de 100% e de 0% de hemólise foram feitas incubando-se 100 µL da suspensão de hemácias com 100 µL Triton X-100 1% (v:v) ou com 100 µL do Tampão 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15M, respectivamente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 2 minutos e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços, analisadas em leitura de 405 nm.

3.2.5.4. Testes anticoagulantes *in vitro*

Os testes de atividade anticoagulante das frações obtidas da semente *A. macrocarpa* foram realizados através de kits comerciais (Wiener lab.) em coagulômetro automático, segundo a metodologia descrita por Osoniyi e Onajobi (2003). Para a obtenção do plasma, foi utilizado sangue de voluntários sadios que

negaram o uso de alguma medicação durante duas semanas antes da coleta e a ingestão de bebidas alcoólicas nos últimos três dias ou que fossem fumantes.

A coleta do sangue se deu através de punção venosa não traumática em tubos contendo o anticoagulante citrato de Sódio 3,8 % na proporção de 9 partes de sangue para 1 de citrato. Após coleta o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi então removido e realizado um “pool” dos plasmas citratados. O “pool” de plasmas foi congelado e posteriormente utilizado nos ensaios de coagulação.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT). O ensaio do APTT avalia a eficiência da via intrínseca na medição da formação do coágulo. Este ensaio foi realizado com as frações da semente de *A. macrocarpa* e heparina (controle positivo), os quais foram diluídos em tampão PBS 0,15 M, pH 7,4 em diversas concentrações. Alíquotas de 90 µL de plasma humano citratado foram misturadas com 10 µL das soluções em diferentes quantidades das frações protéicas (0; 0,25; 0,5 e 1,5 µg). A esta mistura foram adicionados 100 µL de cefalina. Em seguida, a solução foi incubada por 3 min a 37 °C, decorrido este tempo adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,025 M e o tempo de coagulação foi determinado em coagulômetro. Todos os pontos foram realizados em triplicata. Para o controle negativo, tampão PBS 0,15 M, pH 7,4 foi adicionado ao plasma em substituição das frações e heparina.

Tempo de Protrombina (PT). O ensaio do PT avalia a eficiência da via extrínseca na medição da formação do coágulo. Para determinação do tempo de protrombina, o “pool” de plasma humano citratado (90 µL) foi misturado com 10 µL das frações e heparina (controle positivo) em diferentes quantidades e as misturas foram incubadas por 3 min a 37 °C. Decorrido este tempo adicionou-se 200 µL de tromboplastina cálcica de cérebro de coelho pré-aquecida a 37 °C e o tempo necessário para a coagulação foi determinado em coagulômetro automático. Para controle negativo, tampão PBS 0,15 M, pH 7,4 foi adicionado ao plasma em substituição às frações e heparina. Todos os pontos foram realizados em triplicata.

3.2.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESCONTÍNUO E DESNATURANTE (SDS-PAGE)

Para avaliar o perfil proteico e o grau de pureza das amostras, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado em um conjunto de lâminas de vidro de 10 x 14 cm, com espaçadores de 0,75 mm, pela polimerização de uma solução contendo 3,75 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,95 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; água destilada 1,8 mL; 75 µL de SDS 10%; 3,75 µL de TEMED e 37,5 µL de persulfato de amônio 30%. O gel de empacotamento foi preparado a uma concentração de 5% pela polimerização de uma solução contendo 0,495 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 0,938 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 2,25 mL de água destilada; 37,5 µL de SDS 10%; 3,75 µL de TEMED e 18,75 µL de persulfato de amônio. Uma vez diluídas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol, em um volume de 10 µL, as alíquotas das amostras foram aplicadas no gel. A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão de corrida (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M e SDS 10%) e o sistema submetido a uma voltagem constante de 50 V por 30 min, seguido de uma etapa a 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 min.

Após a eletroforese o gel foi fixado em solução fixadora composta de etanol 40% e ácido acético 10 % em água destilada por 30 min. E as bandas protéicas foram coradas após a imersão do gel em uma solução corante de azul de coomassie coloidal G-250 (Neuhoff et al., 1988), seguida de sucessivas lavagens em água ultra-pura. Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados marcadores de proteínas padrões.

3.2.7. BIOENSAIOS

3.2.7.1. Avaliação do potencial larvicida para *Callosobruchus maculatus*

O potencial larvicida da vicilina isolada de *A. macrocarpa* (AmV) foi avaliado através de um sistema de dieta artificial, no qual, a vicilina foi incorporada em

sementes artificiais pesando cerca de 400 mg. AmV foi incorporada na farinha de sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) em concentrações crescentes (0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0%). O controle contendo apenas farinha do feijão de corda foi adicionado ao ensaio. As sementes artificiais foram preparadas em um sistema de prensa manual adaptado, com auxílio de um molde cilíndrico de latão. Depois de prensadas, as sementes artificiais foram expostas à infestação durante 24 horas, na proporção de 3/6 sementes/ fêmeas adultas de *C. maculatus* (48 horas de idade). Passando o período de ovoposição, as fêmeas foram retiradas dos tubos e os ovos foram contabilizados. O excesso de ovos foi excluído com auxílio de uma pinça, deixando-se apenas 3 ovos por semente. Em seguida, as sementes foram mantidas em câmara incubadora por 5 dias, período no qual foi verificada a eclosão dos ovos. Feito isso, eles foram colocados novamente na câmara incubadora por mais 15 dias a 28 °C e 70% de umidade relativa.

Passados os 20 dias, as sementes foram abertas com o auxílio de pinças e um microscópio estereoscópico. As larvas de cada semente artificial, foram contabilizadas, pesadas e os dados grafados para a determinação da WD_{50} e LD_{50} .

3.2.7.2. Avaliação da ação de AmV na emergência e sobrevivência de adultos de *C. maculatus*

O ensaio biológico para a determinação da atividade das vicilinas sobre a emergência de adultos seguiu o mesmo protocolo descrito no item da avaliação da atividade larvicida descrito no item 3.2.7.1., no entanto, o ensaio teve sua observação estendida até completar-se o ciclo biológico do inseto com a emergência de adultos. A partir da emergência dos primeiros adultos do controle foram observados parâmetros de desenvolvimento dos insetos, como o tempo para emergência e o número de indivíduos que emergiram para cada concentração testada. Como parâmetro foi determinada a ED_{50} , como a concentração de vicilina efetiva para retardar o processo de emergência de adultos em 50% do tempo.

3.2.8. INVESTIGAÇÃO DO PROVAVEL MECANISMOS DE AÇÃO DE VICILINAS

3.2.8.1. Digestibilidade *in vitro* da vicilina de *A. macrocarpa* por homogenato intestinal (HI) de *C. maculatus*.

Larvas de 17 dias de *C. maculatus* tiveram seus intestinos removidos com auxílio de pinças e lupa estereoscópica. Duzentos intestinos foram removidos e acondicionados em 200 µL de solução salina 0,15 M. Os intestinos foram extraídos em 0,8 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 5,5, em banho de gelo, por 10 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi recolhido e denominado homogenato intestinal (HI).

Para o ensaio de digestibilidade, 8 µg de vicilinas foram dissolvidos em 240 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 5,5 e incubados em banho-maria a 37 °C por 0, 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. A relação vicilina:intestino foi de 6:1 para todos os ensaios. Os resultados dos ensaios de digestibilidade das vicilinas foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% conforme descrito no item 3.2.6.

3.2.8.2. Produção de anticorpos contra vicilina de *E. velutina*, utilizados contra vicilina de *A. macrocarpa*

O isolamento de imunoglobulinas do tipo G (IgG) se deu passando as amostras de antissoros em uma coluna de proteína A-Sepharose previamente equilibrada com tampão NaH₂PO₄ 0,02M pH 8,0, 150 mM NaCl. O material não adsorvido foi eluído com tampão de equilíbrio. A eluição de IgGs adsorvidas na coluna foi realizada com tampão Na₂HPO₄ 0,05 M, ácido cítrico 0,025 M, pH 3,0. As IgG isoladas foram neutralizadas com NaOH 0,1M, dialisadas contra água e liofilizadas. Soluções estoques de IgG foram preparadas em PBS pH 7,5, BSA 2% na concentração de 10 mg/mL. Os anticorpos assim obtidos foram utilizados para o imunoblot. O título do anticorpo foi estabelecido pela técnica de “dot-blot”.

3.2.8.3. Imunodeteção de proteínas - “*Imunoblotting*”

O método de “western blotting” ou “imunoblotting” representa uma combinação das técnicas de eletroforese e imunodeteção de proteínas, com o objetivo de visualizar a especificidade de interação antígeno/anticorpo por meio de uma imunoreação (TOWBIN *et al.*, 1979).

Após a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, os géis foram retirados das placas e equilibrados em tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M em pH 8,0 em metanol 20%). Membranas de nitrocelulose e papéis de filtros Whatman 3 MM foram cortados no tamanho dos géis. As membranas foram também equilibradas com tampão de transferência por 5 minutos. Em uma bandeja de vidro foi montado um “sanduíche de transferência” que tinha a seguinte ordem de empilhamento: primeiro foi colocado o suporte plástico do aparelho de transferência, seguido de uma esponja, três folhas de papel de filtro, o gel de eletroforese, a membrana de nitrocelulose e por último três folhas de papel de filtro, esponja e outro suporte de plástico (Figura 9). Entre o gel e a membrana teve-se o cuidado de retirar bolhas de ar que poderiam interferir na transferência das proteínas. O “sanduíche” foi comprimido pelos suportes plásticos que se conectavam com os eletrodos da cuba de eletrotransferência (célula comercial Transblot) e imerso em tampão de transferência. A eletrotransferência foi feita por 90 minutos com uma corrente constante de 200 mA a 4 °C. Após transferência o “sanduíche” foi desfeito e a membrana, retirada cuidadosamente, foi corada com Vermelho de Ponceau 2%, para se verificar a eficiência da transferência.

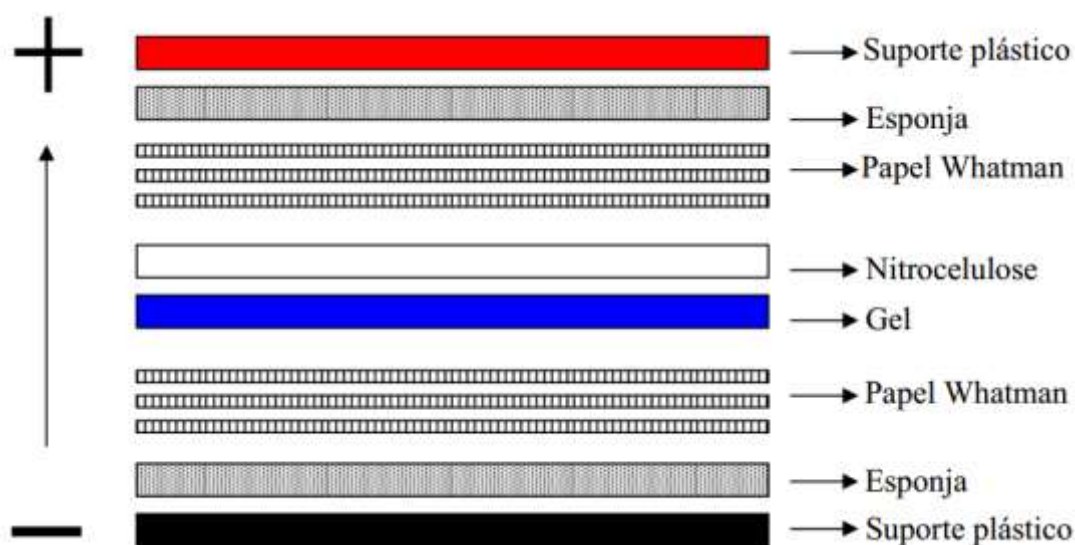


Figura 9. Esquema de montagem do “sanduíche” para eletrotransferência de proteínas de gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose.

3.2.9. ANALISE ESTATÍSTICA

Foi feito teste de Normalidade (distribuição) dos dados. As análises dos dados foram feitas pela análise de variância não paramétrica, Kruskal-Wallis, seguido do teste de hipótese de Dunn, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão disponível gratuitamente.

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VICILINA DE *Anadenanthera macrocarpa*

4.1.1 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina

As proteínas provenientes da extração da farinha de *A. macrocarpa* foram fracionadas por precipitação com sulfato de amônio, resultando em três frações (0-30%, 30-60% e 60-90%). A F60-90%, rica em proteínas de natureza globulínica (UCHÔA *et al.*, 2009), foi submetida a uma cromatografia em matriz de quitina com a finalidade de isolar a vicilina de *A. macrocarpa*. O perfil cromatográfico da fração de *A. macrocarpa* apresentou um pico não retido eluído com o tampão de equilíbrio da coluna e um pico retido que foi obtido após eluição do material com solução de HCl 0,1 M (Figura 10). As proteínas retidas em quitina e eluídas com HCl 0,1 M foram dialisadas contra água destilada e concentradas por liofilização, sendo em seguida utilizadas nos passos de purificação e caracterização da vicilina (AmV).

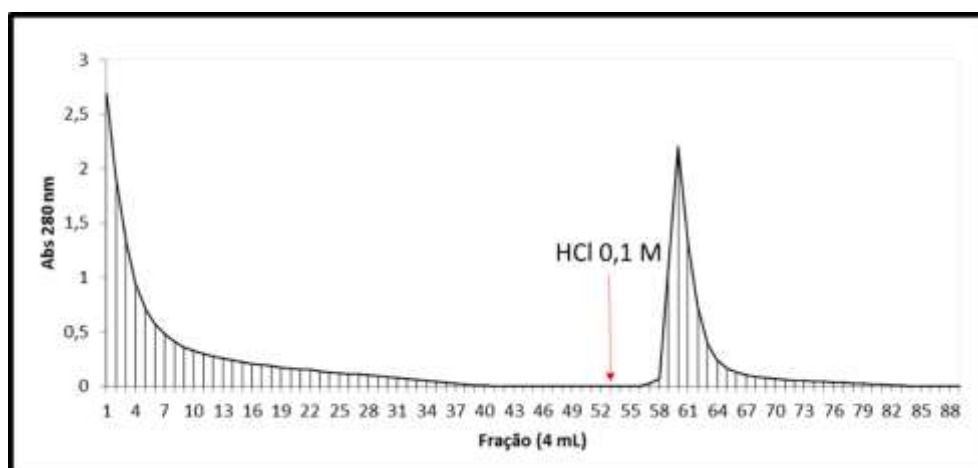


Figura 10. Perfil de eluição de AmV em cromatografia de Ex. A coluna foi previamente equilibrada com tampão tetraborato de sódio 0,02M, pH 7,5. Foram aplicados 5 mL (1,024 mg/mL) da fração. As proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 0,1M, em fluxo constante de 2 mL/min., a absorbância foi monitorada a 280 nm.

4.1.2. Cromatografia de Exclusão Molecular Superdex 75 em sistema de FPLC AKTA Purifier.

As frações protéicas de *A. macrocarpa* eluída da matriz de quitina com HCl 0,1 M e denominada de pico retido, foi submetida a cromatografia de exclusão molecular Superdex 75 (Figura 11). Um pico proteico majoritário foi eluído da coluna com aproximadamente 16 minutos, seguido da eluição de um pico minoritário aos 20 minutos. Os picos foram separados e o pico majoritário foi submetido às etapas seguintes do trabalho.

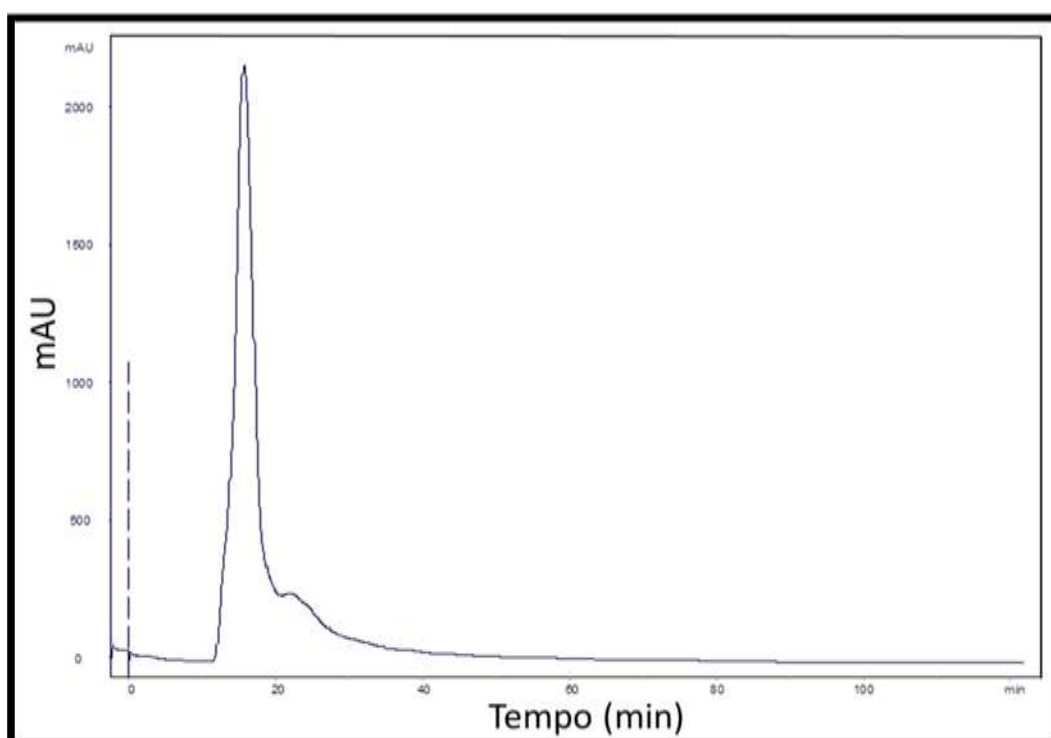


Figura 11. Perfil de eluição proteica de AmV em cromatografia Superdex 75 Tricorn 10x300 mm. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão tris 0,02M com NaCl 0,2M em pH 8,0 com fluxo constante de 0,5 mL/min., a absorbância medida a 280 nm.

4.1.3. Cromatografia de fase reversa em C8 Phenomenex em sistema de HPLC Hitachi.

A fim de confirmar a sua pureza do pico obtido da cromatografia em sistema FPLC/AKAT Purifier, foi submetido à cromatografia por HPLC de fase reversa. O perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm (Figura 12). A cromatografia de fase reversa em HPLC revelou quatro picos não resolvidos com tempos de retenção muito próximos. Os picos obtidos foram coletados manualmente, liofilizados e as

proteínas analisadas por eletroforese e testadas quanto às suas atividades biológicas.

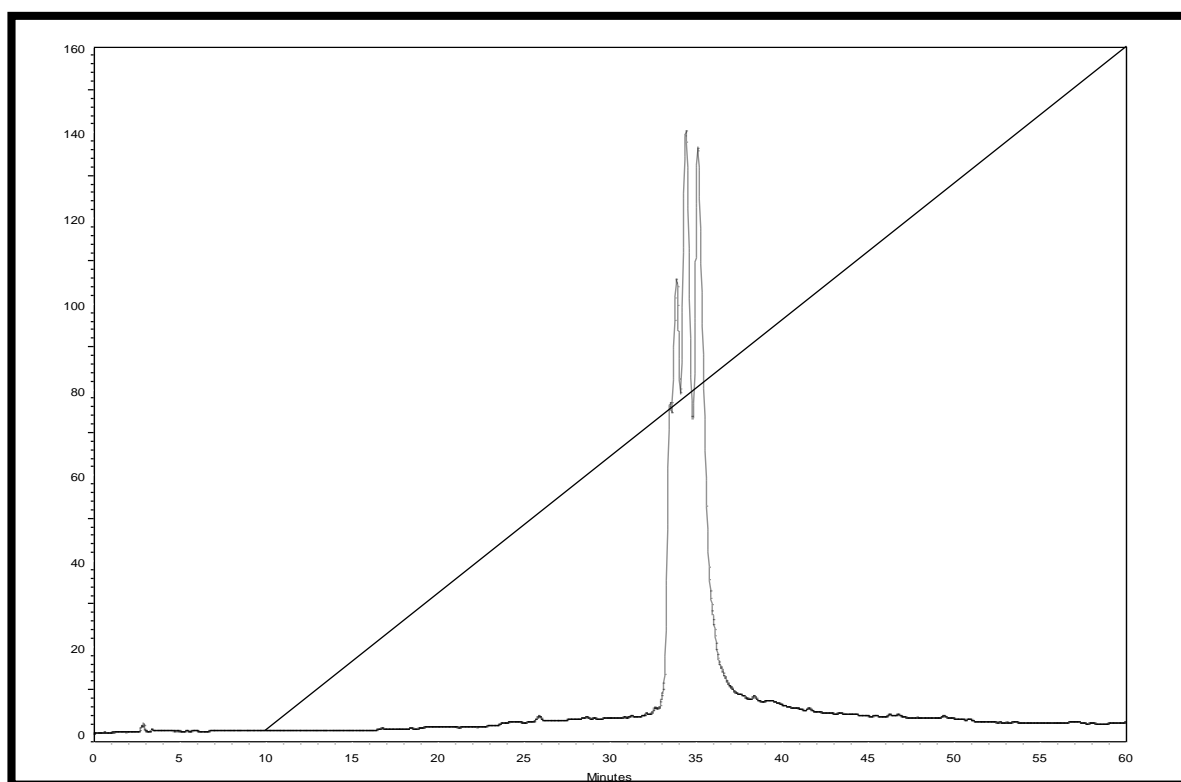


Figura 12. Perfil de eluição proteica de AmV em cromatografia C8 Phenomenex (5 μm , st 4.6/250, 100 \AA). A coluna foi equilibrada com ácido trifluoroacético (0,1%) e eluída com gradiente linear (de 0 - 100%) de acetonitrila 100% em ácido trifluoroacético 0,1%. O perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm.

4.1.4. Análise de AmV por eletroforese em geis de poliacrilamida em condições desnaturante e não desnaturante.

AmV foi submetida a análise eletroforética em condições desnaturantes e não desnaturantes. Em condições desnaturantes, AmV apresentou-se como uma proteína multimérica composta por quatro subunidades de 73, 70, 43 e 41kDa, segundo a curva de calibração obtida a partir de marcadores de massas moleculares conhecidas (Figuras 13A e B). Bandas protéicas com alta massa molecular foram observadas, possivelmente complexos formados durante o processo de purificação. Em condições não desnaturantes AmV apresentou-se como uma proteína homogênea com característica ácida (Figura 13C), indicando que os complexos de alta massa molecular são formados por complexos da proteína multiimérica.

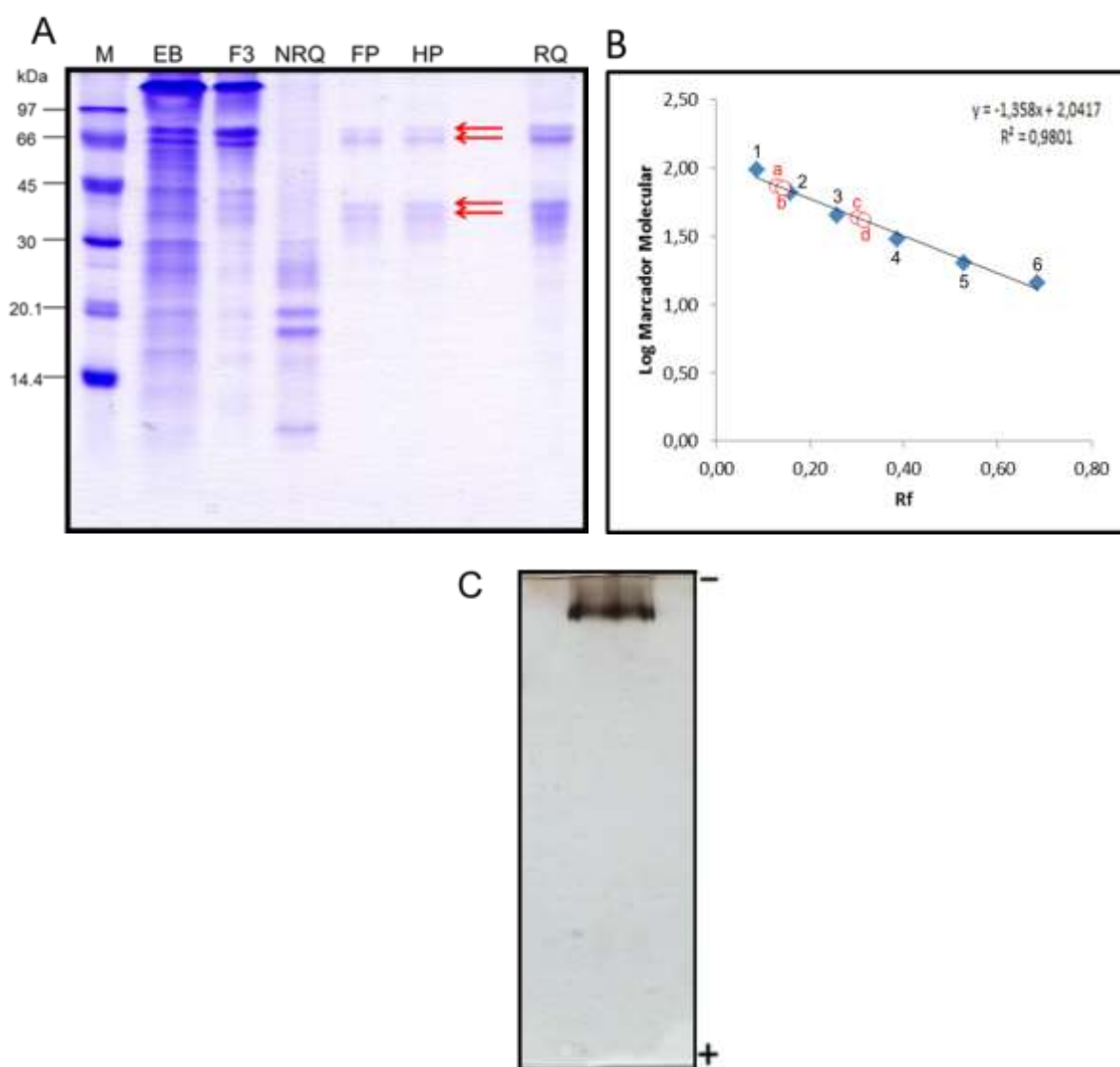


Figura 13. Análises eletroforéticas das frações proteicas de *A. macrocarpa*. (A) SDS-PAGE (15%) das frações de *Anadenanthera macrocarpa* corado com azul brilhante de comassie. M: marcadores de massa molecular; EB – extrato bruto; F3 – fração de proteínas precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na faixa de 60-90%; NRQ – fração não retida em quitina; FP – fração obtida por cromatografia em FPLC; HP – fração obtida por cromatografia em HPLC; RQ – fração retida em quitina. Setas indicam as subunidades da vicilina de *A. macrocarpa* (AmV); (B) determinação da massa molecular de AmV por meio da curva de calibração. Marcadores de massa molecular (identificados por números) e massas dos fragmentos de AmV (identificados por letras): 1 – Fosforilase (97,0 kDa); 2 – Albumina sérica bovina (66,0 kDa); 3 – Ovalbumina (45,0 kDa); 4 – Anidrase carbônica (30,0 kDa); 5 – Inibidor de tripsina (20,1 kDa); 6 – α -lacto albumina (14,4 kDa); a – AmV1 (73,64 kDa); b – AmV2 (70,42 kDa); c – AmV3 (43,08 kDa); d – AmV4 (41,20 kDa). (C) PAGE (15%) de AmV revelada com prata.

4.1.5. Quantificação de carboidratos em AmV.

Pelo método de Dubois *et al.*, (1956), adaptado por Masuko *et al* (2005) e empregando uma curva de concentração de D-glicose, foi possível estabelecer que o conteúdo de carboidrato presente em AmV corresponde a 1,55% da massa total.

4.1.6. Detecção de Proteínas de Defesa ao Longo do Processo de Purificação da AmV.

Para identificação de proteínas de defesa (lectina, inibidores de glicosidase e de proteinases digestivas e da coagulação sanguínea) foram feitos vários testes de atividade ao longo de todos os passos de purificação.

A atividade lectínica não foi detectada nas amostras da semente de *A. macrocarpa*, testada para tipos sanguíneos A, B e O, não tratados e tratados com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína).

Também não foi observada a atividade hemolítica para as frações testada em três concentrações diferentes: 7,5; 10 e 20 µg/mL, como visto no ensaio hemolítico em placa de 96 poços.

A existência de um possível potencial anticoagulante para as frações foi testada por meio dos testes APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e PT (tempo de protrombina), usando heparina padrão como referência (hep G3000). Os testes citados são referidos como testes funcionais, pois, monitoram a formação do coágulo sanguíneo (LEADLEY *et al.*, 2000). De acordo com os resultados obtidos, as frações não foram capazes de retardar a formação do coágulo sanguíneo tanto para o APTT quanto para o PT. Os resultados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4

Detecção de atividades biológicas ao longo do processo de purificação da AmV. (+) presença da atividade; (-) ausência da atividade; (1) as enzimas proteolíticas da classe serínica testadas foram Tripsina, Quimotripsina e Elastase Neutrofílica; (2) enzimas proteolíticas da classe cisteínica testadas foram, Papaína; (3) A atividade hemaglutinante, indica a presença de lectinas, foi testada para eritrócitos do tipo A, B e O não tratados e tratados com tripsina e papaína; (4) A atividade anticoagulante foi testada através dos testes APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e PT (tempo de protrombina).

<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Proteínas de Defesa					
	Inibidores α-amilase	¹ Inibidores serínicos	² Inibidores cisteínicos	³ Lectinas	Atividade Hemolítica	⁴ Atividade Anticoagulante
Extrato Bruto	+	+	+	-	-	-
F3 (60-90%)	+	+	+	-	-	-
Retido Quitina	-	-	-	-	-	-
FPLC	-	-	-	-	-	-
HPLC	-	-	-	-	-	-

4.2. BIOENSAIOS

4.2.1. Efeito de AmV sobre o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*

O efeito de AmV sobre o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* foi avaliado por ensaio com dieta artificial, na qual a proteína foi incorporada a sementes artificiais em concentrações crescentes. Nos gráficos A e B (Figura 14) pode ser observado que nas concentrações superiores a 1%, há formação de um platô, indicando a inexistência de larvas vivas (mostrando 100% mortalidade), ressaltando a eficácia da AmV. Com base nesses parâmetros, foram construídos dois outros gráficos (Figura 14C e 13D) para avaliar a quantidade de AmV que reduzia o peso das larvas pela metade (WD_{50}) e a quantidade que reduzia a população das larvas pela metade (LD_{50}). As concentrações doses-efeitos da AmV indicaram que esta proteína de defesa afetou a massa das larvas com WD_{50} de 0,32% mostrando diferença estatisticamente significativa a partir da concentração 0,2% e o número de indivíduos com LD_{50} de 0,33% com diferença estatisticamente significativa na concentração a 0,5%, durante o desenvolvimento larval desta praga (Figuras 14C e D).

Na Figura 13E observa-se larvas alimentadas em dietas contendo AmV nas concentrações utilizadas para o ensaio biológico. Confirmando que a partir da concentração 0,5% as larvas não se desenvolveram, estacionando em um valor de tamanho corporal equivalente a larvas de 2° instar.

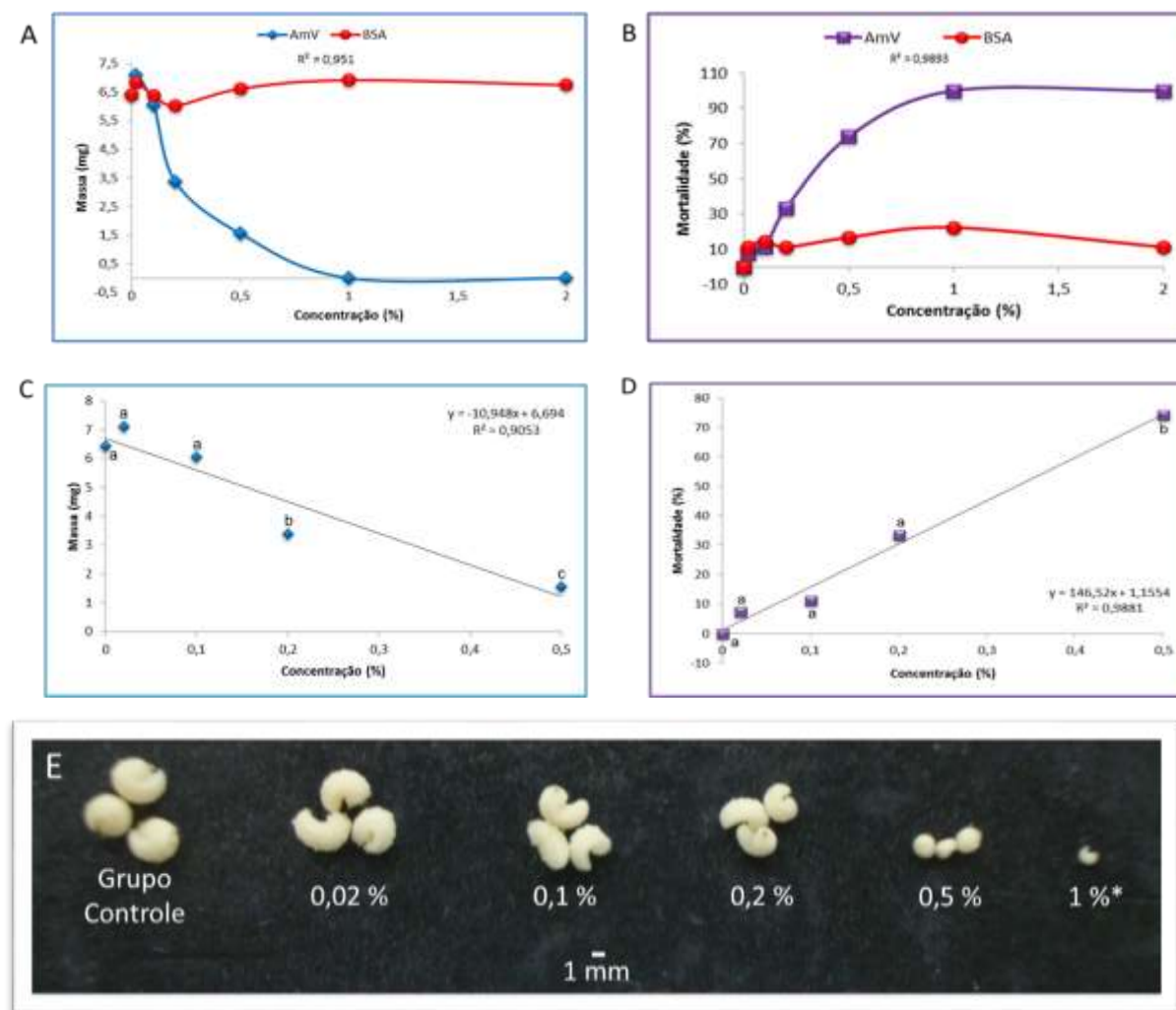


Figura 14. Efeito de AmV sobre a massa e mortalidade nas larvas de *C. maculatus*. Curvas dose-efeito sobre a massa (A e C) e sobre a mortalidade dos adultos (B e D). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações no teste de Dunn com $p < 0,05$. (E) larvas de *C. maculatus* alimentadas em dieta artificial nas concentrações crescentes de 0; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5 e 1% de AmV. (*) a concentração de 1% apresentou esta única larva.

4.2.2. Efeito de AmV sobre a emergência dos adultos de *C. maculatus*

Para avaliar o efeito de AmV sobre a emergência dos adultos de *C. maculatus* durante o ciclo de vida completo, concentrações crescentes da vicilina foram incorporadas à dieta das larvas em um modelo de bioensaio. Com 28 dias da infestação, indivíduos adultos começaram emergir do grupo controle, seguido pela concentração de 0,02% os 29 dias, 0,1% os 30 dias, 0,2% os 32 dias e 0,5% os 33 dias. O experimento contou ainda com duas concentrações a mais de 1% e 2%, sendo dado por finalizado aos 50 dias do início da infestação, quando, o último grupo teste, da AmV foi analisado (Figura 15A). Todos os adultos que emergiram, foram retirados e pesados em balança analítica e encontravam-se entre o grupo

controle e a concentração 0,5%. Observou-se que AmV na concentração de 0,5% foi capaz de permitir que 1 indivíduo de grupo emergisse, com massa total de 7 mg (Figura 14A), sendo ele o último grupo a apresentar emergência de adultos, com este único representante.

Uma curva dose resposta foi realizada para verificar o efeito de AmV durante o ciclo de vida completo sobre a emergência de *C. maculatus*, observada na Figura 15B. A partir da curva dose resposta observou-se que AmV em concentrações superiores a de 0,5%, adicionada a dieta, causou a mortalidade de 100% dos adultos impedindo assim sua emergência (Figura 15B). A ED₅₀, ou seja, a quantidade de vicilina necessária para reduzir em 50% a emergência de adultos para AmV foi de 0,096% mostrando diferença estatisticamente significativa na concentração 0,5% (p/p). O controle com BSA não causou efeito sobre os adultos.

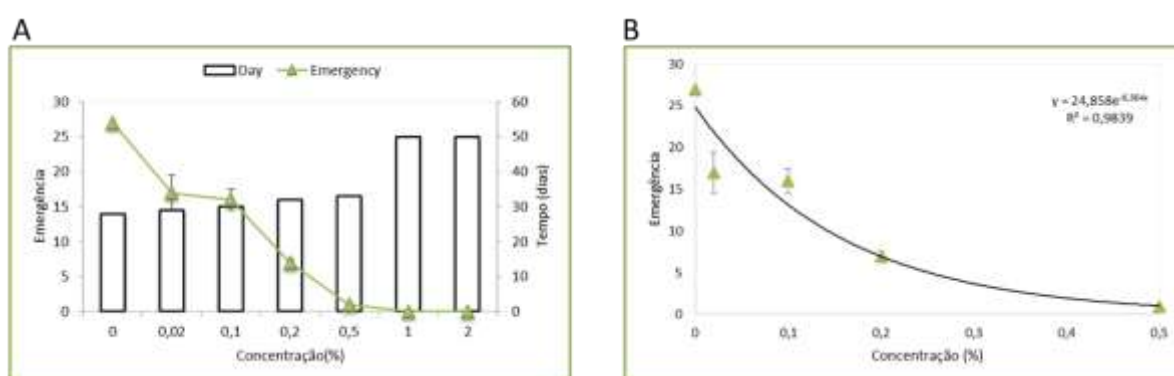


Figura 15. (A e B) efeito de AmV sobre a mortalidade nos adultos de *C. maculatus* em diferentes concentrações. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações no teste de Dunn com $p < 0,05$.

4.3. PROVAVEL MODELO DE AÇÃO DE VICILINAS DE *A. macrocarpa* PARA LARVAS DE *C. maculatus*

4.3.1. Digestibilidade *in vitro* de vicilina de *A. macrocarpa* pelas enzimas digestórias das larvas de *C. maculatus*

A digestibilidade de AmV foi avaliada *in vitro* para as enzimas digestórias das larvas de *C. maculatus* de quarto ínstar. As larvas foram dissecadas e seus intestinos foram retirados como foi descrito no item 3.2.8.1. As vicilinas purificadas foram submetidas à digestão com as enzimas totais do homogenato intestinal das larvas em banho-maria a 37 °C por intervalos de tempo variando de 0 a 24 h. Foram visualizadas várias bandas reativas, provenientes da degradação da vicilina pelas

enzimas proteolíticas intestinais das larvas de *C. maculatus*, porém uma banda proteica foi bem conservada, mostrando-se presente tanto na vicilina íntegra, como também em todos os tempos utilizados no experimento, apresentando uma massa molecular por volta de 22 kDa, que também foi visualizada na eletroforese, porém de maneira mais branda, indicada pela setas vermelhas (Figura 16A) e pela caixa vermelha (Figura 16B). Outro peptídeo de vicilina com massa aproximada 13 kDa foi observado tanto no gel, identificado pelas setas roxas (Figura 16A), quanto no imunoblot, indicado pela caixa roxa (Figura 16B). Esse fragmento não se mostrou presente na AmV não digerida e também não foi possível visualizá-lo claramente nos primeiros tempos do experimento, a exceção do observado no imunoblot, com o tempo de 1 hora que mostrou a presença desse fragmento (Figura 16B).

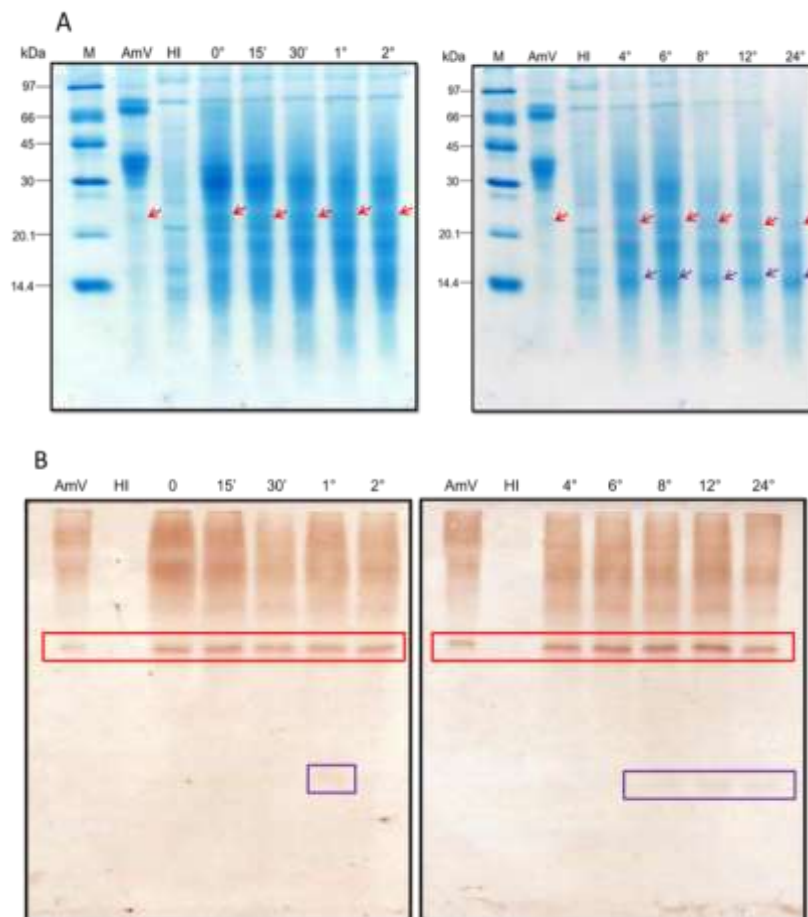


Figura 16. Produtos de digestão in vitro da vicilina de *A. macrocarpa* por enzimas do homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus*. (A) eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). M – marcador de peso molecular: Fosforilase (97,0 kDa); Albumina sérica bovina (66,0 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa); AmV – vicilina *A. macrocarpa* íntegra; HI – homogenato intestinal de *C. maculatus*; 0, 15, 30, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 – tempos utilizados para digestão da AmV com HI. (B) Western blotting da AmV – vicilina *A. macrocarpa* íntegra; HI – homogenato intestinal de *C. maculatus*; 0, 15, 30, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 – tempos utilizados para digestão da AmV com HI.

4.3.2. Cromatografia de afinidade em quitina dos peptídeos de AmV

Para investigar o provável mecanismo de ação da AmV sobre o desenvolvimento e sobrevivências das larvas de *C.maculatus*, a ligação dos peptídeos gerados da digestão da AmV com o homogenato intestinal de *C. maculatus* no tempo de 24 horas foram submetidos a cromatografia de afinidade a quitina (Figura 17A). A vicilina digerida (2 mg) foi aplicada em uma coluna de quitina (0,6 x 1,0 cm) equilibrada previamente com tampão tetraborato de sódio 0,02 M em pH 7,5 e eluída com HCl 0,1 M (Figura 17A). Os fragmentos retidos foram concentrados e submetidos a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 17B). Os peptídeos de vicilinas identificados após hidrólise com homogenato intestinal com massa molecular de 23 e 13 kDa (marcados pela caixa vermelha) mostraram afinidade por quitina e foram eluídos da resina em conjunto com outros peptídeos de massas moleculares variando entre 30 e 7 kDa.

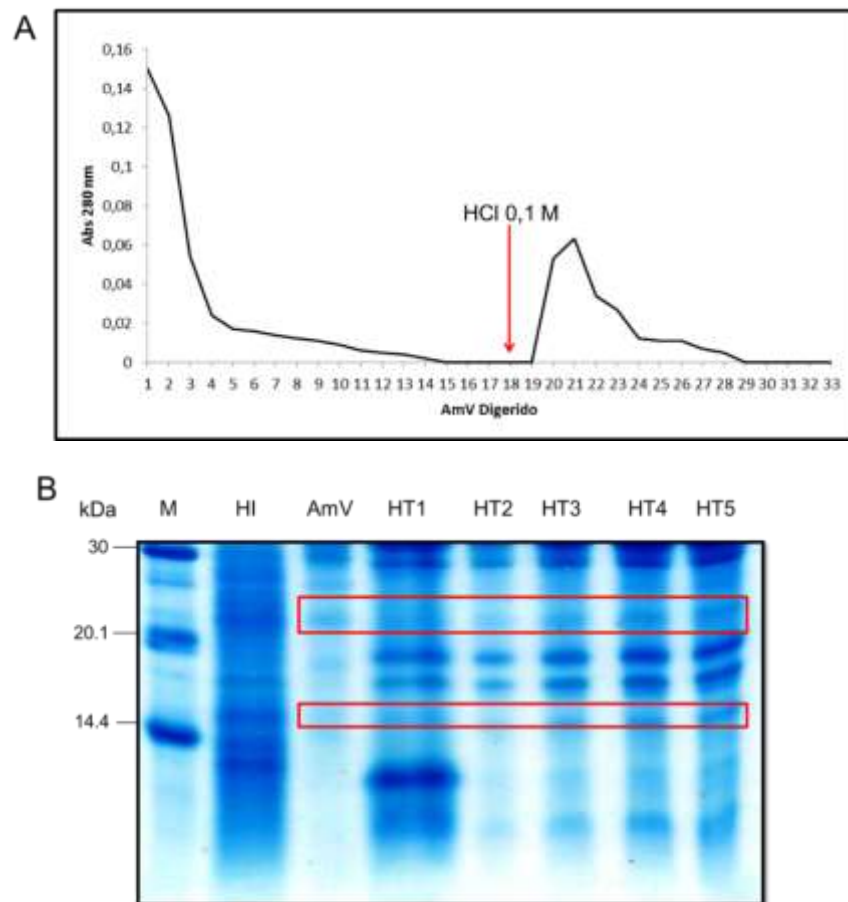


Figura 17. Análise dos fragmentos de digestão de AmV pelo homogenato intestinal de *C. Maculatus*. **(A)** perfil de eluição dos fragmentos de AmV em cromatografia de afinidade a quitina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão tetraborato de sódio 0,02 m, pH 7,5. Os fragmentos adsorvidas foram eluídos com HCl 0,1 M, em fluxo constante de 1 mL/min., a absorbância medida a 280 nm. **(B)** eletroforese dos fragmentos adsorvidos da cromatografia da figura A: M – marcador de massa molecular (Anidrase carbônica (30,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa), HI – homogenato intestinal, vicilina de *A. macrocarpa* integra, HT – homogenato total (HI + AmV) em diferentes concentrações (HT1 ao HT5), aplicadas no gel de eletroforese. Marcados pelas caixas em vermelho os prováveis fragmentos encontrados na figura 17 (A e B).

5. DISCUSSÃO

A procura por alternativas mais seguras para o controle de pragas é urgente em um cenário mundial onde a população aumenta, terras agriculturáveis escasseiam e a segurança alimentar está em pauta, pois a ocorrência de grandes perdas na agricultura podem estar associadas à propagação de doenças e ao surgimento de insetos pragas, resistentes aos inseticidas existentes. Além disso, os inseticidas químicos clássicos têm apresentado alta toxicidade para insetos não alvo e também para mamíferos, incluindo os seres humanos. Com o avanço de novas tecnologias, a capacidade de obtenção de uma alternativa verde aos inseticidas clássicos, que possam atuar com uma melhor atividade inseticida em termos de seletividade para insetos, baixa toxicidade para o meio ambiente e para espécies não alvo, incluindo os seres humanos, tem se mostrado de grande valia e importância para áreas científica e socioeconômica (LOPEZ, *et al.*, 2005; DESPRÉS, *et al.*, 2007).

Fatores ecológicos, tais como diversificação geográfica e a ausência e/ou presença de concorrentes influenciaram na relação inseto/planta que, passaram por uma co-evolução ao longo dos 400 milhões de anos nessa relação, o que levou a uma diversificação nos mecanismos adaptativos existentes nas plantas e conseqüentemente suas respectivas sementes (KOGAN, 1986; DESPRÉS, *et al.*, 2007). Essa pressão ecológica levou ao longo do tempo a seleção e armazenamento de proteínas que apresentam papéis fundamentais em seus mecanismos de defesa. Em conseqüência disso, uma série de biomoléculas de carácter proteico encontram-se presentes nas sementes, atuando diretamente ou indiretamente contra pragas ou patógenos que possam atacar diversos tecidos nas plantas, tanto nas partes vegetativas quanto em tecidos reprodutivos como nas sementes. Dentre estas proteínas relacionadas a defesa de plantas destacam-se os inibidores de proteinases (cisteínicas e serínicas), inibidores de α -amilases, lectinas, quitinases, glucanases, patatinas, octatinas, tarinas, albuminas 2S, proteínas ricas em glicina e as vicilinas (globulinas 7S) que estão associadas ao mecanismo de defesa em plantas (XAVIER-FILHO, *et al.*, 1989; MACEDO, *et al.*, 1993; SHEWRY, *et al.*, 1995; SALES, *et al.*, 1996; OLIVEIRA, *et al.*, 2002; ARAUJO, *et al.*, 2005; CÂNDIDO, *et al.*, 2011).

Em plantas, e especificamente nas sementes, as globulinas 7S, têm revelado uma potencial multifuncional. Sendo uma das principais classes de proteínas constitutivas da semente, atuam como fonte de nutriente fornecendo aminoácidos e nitrogênio, no processo de germinação ou exercendo papel fundamental na defesa desses organismos contra atividades de fungos e insetos pragas, sendo considerada uma proteína de defesa (MACEDO, *et al.*, 1993; SALES, *et al.*, 2001; SHUTOV, *et al.*, 2003; CÂNDIDO, *et al.*, 2011). As propriedades de vicilinas relacionadas à defesa foram primeiramente identificadas e relatadas por Xavier-filho *et al.* (1989 e 1991). Em 1992, Sales *et al.* demonstraram que uma variedade de *Vigna unguiculata* resistente a *C. maculatus* apresenta uma vicilina que não é completamente digerida pelas proteinases intestinais do *C. maculatus*. Macedo *et al.* (1993) em seu trabalho utilizou as vicilinas isoladas das mesmas variedades de *V. unguiculata* estudadas por Sales *et al.* (1996) e observou que as vicilinas das variedades resistentes, IT81D-1032 e IT81D-1045 (obtidas da Nigéria e cultivadas na EMBRAPA) e suscetíveis, CE-11 e CE-31 (obtidas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza) apresentavam efeitos sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* em concentrações diferentes, refletindo o fenótipo resistente e susceptível. A partir desses estudos, diversos trabalhos foram realizados, para investigar a ação das vicilinas (globulinas 7S), sobre o desenvolvimento dos insetos pragas e seus prováveis mecanismos de ação contra insetos pragas e seu potencial também na germinação de fungos (MACEDO, *et al.*, 1995; FIRMINO, *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1997).

Em 1996 Sales *et al.*, observaram que vicilinas de sementes de *V. unguiculata* de genótipos susceptíveis (Pitiuba, CE-11) e suas variantes resistentes, IT81D-1032 e IT81D-1045, apresentam afinidade por quitina, um polímero de N-acetil- β -glicosamina. Corroborando esses resultados, Yunes *et al.*, (1998) observou que vicilinas purificadas de sementes de várias espécies de leguminosas (*V. angularis*, *C. ensiformis*, *G. max*, *P. vulgaris* e *P. lunatus*), apresentaram resultados significativos na inibição do desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*. Nestes trabalhos foi proposta uma primeira sugestão para o mecanismo de ação das vicilinas, sugerindo que estas proteínas possam interferir na captação de nutrientes no intestino dos insetos pragas devido à sua ligação na membrana peritrófica ou estruturas quitinosas presentes no intestino médio das larvas. Esta ligação a quitina

associada à baixa taxa de digestibilidade das vicilinas pelas proteases do intestino médio das larvas poderia interferir nos processos digestivos inibindo seu desenvolvimento e conseqüentemente, promovendo a redução na emergência de adultos. Ambos os efeitos antimetabólicos podem atuar separadamente ou em conjunto dificultando a digestão das vicilinas e de outras proteínas da dieta (DESHPANDE & DAMODARAN, 1989; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; SALES, *et al.*, 1992; FIRMINO, *et al.*, 1996; UCHÔA *et al.*, 2009; COELHO, *et al.*, 2010). A ligação a quitina pode impedir a ação de enzimas proteolíticas sobre a molécula de vicilina, como também poderá reduzir o fluxo de enzimas e proteínas entre os espaços ecto e endoperitróficos. A propriedade de ligação a quitina associada à baixa digestibilidade das subunidade de vicilinas foram observadas nas vicilinas de diferentes leguminosas analisadas que apresentaram efeitos deletérios sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* (SALES, *et al.*, 1992; FIRMINO, *et al.*, 1996; YUNES *et al.*, 1998; UCHÔA *et al.*, 2009).

No presente estudo, a purificação de uma nova vicilina das sementes da leguminosa *Anadenanthera macrocarpa* seguindo a metodologia descrita por Macedo, *et al.*, (2008) e Uchôa *et al.*, (2009) com adaptações é relatado. A proteína foi obtida a partir da fração 60–90% (globulínica) das sementes e submetida à uma cromatografia em matriz de quitina, na qual as proteínas retidas na matriz foram na maior parte de natureza vicilínica.

Na etapa seguinte, para purificação da vicilina, a fração retida em quitina foi submetida a uma cromatografia analítica de exclusão molecular em uma coluna de Superdex 75. O pico obtido foi denominado AmV (vicilina de *A. macrocarpa*) foi re-cromatografado em sistema HPLC de fase reversa Hitachi, usando-se coluna C8. O perfil cromatográfico apresenta quatro picos menores dentro do pico maior obtido na cromatografia de exclusão molecular, comprovando a eficiência da etapa de cromatografia em quitina para a purificação de AmV.

Para validar os resultados obtidos nas etapas cromatográficas, o padrão de proteínas foi analisado por eletroforese em condições nativa (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE). A observação de uma única banda na eletroforese em condição nativa, revela o isolamento de uma proteínas, que analisada por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE), apresenta-se formada por quatro subunidades com massas moleculares de aproximadamente 73, 70, 43 e 41 kDa. Nossos dados

demonstram que na sua forma nativa, havendo uma combinação dessas multisubunidades, AmV é um tetrâmero, sendo observado também este padrão multimérico em outras vicilinas de leguminosas (YUNES *et al.*, 1998; TEIXEIRA, 2006 e MACEDO, *et al.*, 2008). Foi verificada também a presença de subunidades de menores massas moleculares provenientes de processamento proteolítico pós-traducional das subunidades da proteína, que é uma das características dessa classe de proteínas oligoméricas (SCHOLZ *et al.*, 1983; SPENCER *et al.*, 1983; SHEWRY *et al.*, 1995; SHUTOV, *et al.*, 2003; SANCHEZ-MONGE, *et al.*, 2004; CÂNDIDO, *et al.*, 2011). A homogeneidade da AmV analisada por eletroforese nativa (PAGE) também revelou que a única banda apresenta característica ácida, que está de acordo com os resultados encontrados para diversas globulinas 7S (PEDALINO, *et al.*, 1992; SHUTOV, *et al.*, 1995; ORRUNO & MORGAN, 2007; TEIXEIRA, 2006 e MACEDO, *et al.*, 2008). Como foi visto em outras vicilinas, AmV é uma glicoproteína que apresenta 1,55% de sua massa composta por carboidratos, mostrando que ela se encontra na média de glicosilação observada para as vicilinas já descritas, que foi de 1 a 2% (DERBYSHIRE, *et al.*, 1976; BURKS, *et al.*, 1995; SHEWRY, *et al.*, 1995; MÜLLER, *et al.*, 2000; LAUER, *et al.*, 2004; COELHO, *et al.*, 2010).

Várias proteínas de defesas em sementes apresentam a capacidade de ligarem-se ao polímero de quitina. Dentre elas, podemos ressaltar as quitinases (KRISHNAVENI *et al.*, 1999; TAIRA *et al.*, 2001; SANTOS, *et al.*, 2004; NAKAMURA, *et al.*, 2008; GOMES, *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2012), as lectinas (BLOCH & BURGER, 1974; DATTA *et al.*, 1984; BARONDES, 1988; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; YAO, *et al.*, 2010; VANDENRBORRE, *et al.*, 2011) e alguns inibidores de proteinases (MACEDO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2003). Para exclusão de outras proteínas de defesa de plantas, todas as frações obtidas (extrato bruto, fração 3 ou globulínica, retido em quitina, FPLC e HPLC), foram submetidas a testes de atividades biológicas (inibitória de α -amilase, de protease serínica e cisteínica, atividade hemaglutinante, atividade anti-coagulante e hemolítica). Nos resultados observados, não foram detectadas atividades hemaglutinante, coagulante e hemolítica em todas as frações. Os resultados apresentados para inibição das enzimas proteolíticas mostraram a presença de atividade inibitória no extrato bruto e na fração globulínica, no entanto, a etapa seguinte de purificação da AmV na cromatografia de afinidade em quitina, foi eficiente para excluir as proteínas com

estas propriedades, sendo inexistentes estas atividades na fração retida em quitina e nas frações obtidas no FPLC e no HPLC. A ausência de atividade inibitória e hemaglutinante reforçam e confirmam os resultados obtidos com relação à descrição de uma vicilina (globulina 7S), que não apresenta atividade hemaglutinante, nem inibitória contra enzimas digestórias (SALES, *et al.*, 2000; TEIXEIRA, 2006; MACEDO, *et al.*, 2008; CÂNDIDO, *et al.*, 2011).

A nocividade das vicilinas (globulinas 7S) para insetos pragas é amplamente estudada. As vicilinas isoladas de variedades resistentes de *V. unguiculata* que apresentaram atividade inseticida contra os gorgulhos do feijão de corda *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) foram os primeiros relatos demonstrando essa toxicidade da vicilina contra insetos pragas, observando através de ensaios com dieta artificial que a incorporação destas a uma concentração de 2% já mostrava uma redução de 50% no número de larva por semente (Macedo *et al.* 1993). Posteriormente, Yunes *et al.*, (1998) testou vicilinas isoladas de sementes de várias espécies de leguminosas cultivadas e selvagens, *V. angularis* (feijão azuki), *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e *Phaseolus lunatus* (feijão de lima) contra o bruquídeo *C. maculatus* e verificou que as vicilinas de sementes não hospedeiras do gorgulho, incluindo vicilinas da variante resistente de *V. unguiculata* IT81D-1045 apresentaram toxicidade e inibição do desenvolvimento larval a concentrações variando de 2,2% a 1,07%, sendo a menor concentração para a variedade resistente IT81D-1045. Nesse trabalho também foi observada que as vicilinas são imunorrelacionadas e todas as vicilinas testadas apresentaram capacidade de ligação à quitina. Estes resultados foram posteriormente corroborados por dados de imunohistoquímica e imunocitoquímica das larvas do inseto alimentados com vicilinas de *V. unguiculata*, nas quais a marcação com anticorpos contra vicilinas e quitina foram co-localizadas na superfície das células epiteliais do intestino médio das larvas (Sales *et al.*, 2001). Mota, *et al.* (2003) mostraram que as vicilinas de *V. unguiculata* na concentração de 2%, provocaram uma diminuição de cerca de 40% na emergência de adultos do lepidóptera *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) quando comparado com a dieta controle. Nos resultados obtidos por Amorim, *et al.* (2008) outra espécie de lepidóptera, *Plodia interpunctella* (Traça-indiana-da-farinha) a vicilina de sementes da leguminosa, *Erythrina velutina* (EvV) a 0,23% promoveu a mortalidade de 50% da

população (LD_{50}) e que 0,27% da mesma, afetou o desenvolvimento e reduziu em 50% a massa das larvas (ED_{50}). Macedo, *et al.*, 2008 demonstraram que a EvV apresentou toxicidade para as larvas do díptera *Ceratitis capitata* (mosca da fruta) a uma LD_{50} de 0,14% e um ED_{50} de 0,12%. Outro estudo com vicilinas de sementes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) desenvolvido por Paes e colaboradores (2008) mostrou a capacidade destas proteínas em inibir o desenvolvimento das larvas do coleóptera: *Tenebrio molitor* (Bicho-da-farinha), nos quais a variação IT81D-1045 de vicilina, na concentração de 2% foi capaz de reduzir o peso médio larval em 38%, após 10 semanas de tratamento o número de sobreviventes foi de 50%. Já a variação EPACE-10 na concentração de 2% com quatro semanas, mostrou 100% mortalidade.

Em 2006 Teixeira, testou três vicilinas proveniente de sementes de *Crotalaria pallida*, *Erythrina velutina* e *Enterolobium contortisiliquum*, obtendo os respectivos resultados com o LD_{50} de 0,2% e o WD_{50} 0,28%, LD_{50} de 0,26% e o WD_{50} 0,19% e LD_{50} com 1,11% e o WD_{50} 1,03% para o *C. maculatus*. Recentemente em trabalho publicado por Souza e colaboradores (2012) uma vicilina isolada de tegumentos de sementes de *Albizia lebbek* foi capaz de reduzir a massa das larvas de 8,1 mg (grupo controle) para 1,8 mg na concentração de 0,1%, representando uma perda de 78%. Estes resultados em conjunto demonstram que as propriedades de ligação a quitina e baixa digestibilidade das vicilinas corroboram para a consequente toxicidade destas proteínas a insetos pragas que apresentam quitina revestindo e compondo estruturas presentes no intestino. A ED_{50} e LD_{50} das vicilinas apresentam uma redução quando as vicilinas são obtidas de sementes não cultivadas quando comparada as obtidas a partir de sementes cultivadas. Também é possível observar que insetos não especialistas em sementes de leguminosas são mais sensíveis a ação destas proteínas. Estas observações podem ser explicadas por um provável processo co-evolutivo das sementes de leguminosas e seus insetos predadores.

Considerando que a leguminosa não-cultivada *A. macrocarpa* dispõe de um arsenal de proteínas de defesa protegendo seu embrião, a vicilina das sementes foi isolada e seu efeito tóxico sobre as larvas e adultos de *C. maculatus*, um inseto praga de sementes armazenadas, foi avaliado através de um bioensaio em sementes artificiais (MACEDO, *et al.* 1993; YUNES, *et al.*, 1998). Um curva dose-

resposta foi realizada para avaliar o efeito de AmV sobre o desenvolvimento larval e a emergência de adultos. AmV na concentração de 0,5% reduziu a massa total das larvas em aproximadamente 75%, quando comparado ao grupo controle, e foi letal em concentrações acima de 1%. A WD_{50} e a LD_{50} calculados para os resultados do bioensaio larval foram de 0,32% e 0,33% (p:p), respectivamente. Mostrando que a concentração de AmV encontra-se na faixa de toxicidade obtida para os resultados de mortalidade e perda de massa encontrados para larvas de *C. maculatus* citados nos trabalhos descritos anteriormente. Na concentração de 1% apenas uma única larva foi encontrada, essa larva encontrava-se morta, e apresentava tamanho característicos de larvas do segundo estágio de desenvolvimento. O efeito das vicilinas sobre a emergência de adultos também foi avaliado por meio de ensaio biológico semelhante ao modelo empregado para avaliar a toxicidade sobre as larvas. O bioensaio para avaliação sobre a emergência de adultos se prolonga até a finalização do ciclo de vida do inseto, no qual nós consideramos um ED_{50} , quando houve um aumento de no mínimo 50% do tempo necessário para a emergência dos adultos, quando comparado aos insetos mantidos na semente controle. A partir da curva dose resposta observou-se que AmV em concentrações superiores a de 0,5% (emergência de 3,7%), adicionada na dieta, causou a mortalidade de 100% dos adultos, quando visto no quinquagésimo dia, a contar da infestação, reforçam o resultado encontrado para as larvas. A ED_{50} , foi para AmV de 0,096% (p:p). Estes dados demonstram o potente efeito da AmV na sobrevivência e desenvolvimento das larvas e adultos de *C. maculatus*, quando comparado com outras vicilinas já testadas. A baixa concentração efetiva para inibir em 50% a emergência de adultos demonstra o potencial das vicilinas como ferramenta de controle para pragas, considerando a baixa concentração necessária e o efeito controlador da mesma sobre o amadurecimento de adultos, o que pode corroborar para um controle populacional da praga em programas de manejo.

O mecanismo de ação de vicilinas sobre o desenvolvimento das larvas dos insetos pragas ainda não está totalmente esclarecido, porém a ação de AmV demonstrou ser bastante semelhante ao observado para vicilinas purificadas e avaliadas por Sales *et al.* (1992 e 2001), Macedo *et al.* (1993), Uchôa *et al.* (2006 e 2009), Souza *et al.* (2010) e Alexandre, *et al.* (2011), as quais apresentaram afinidade por quitina e estruturas quitinosas presente no intestino médio das larvas

de *C. maculatus*, e baixa digestibilidade ou digestibilidade parcial com formação de peptídeos derivados que são internalizados por interagir com células apicais do intestino médio do inseto.

A ação sistêmica das vicilinas pode explicar a baixa taxa de emergência de adultos e prolongamento do período de desenvolvimento dos mesmos. Este modo de ação das vicilinas tóxicas a insetos dependentes da ligação às estruturas constituídas de glicoproteína nas microvilosidades da superfície do intestino médio, assemelha-se o modo de ação proposto de certas lectinas (FITCHES *et al.*, 2001; ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998 e 2008).

Para testar a hipótese de que o efeito tóxico da AmV está relacionado à digestibilidade parcial e formação dos peptídeos que ligam em quitina, as enzimas extraídas do intestino de larvas *C. maculatus* foram incubadas *in vitro* com AmV, na proporção de 1:6 (enzima:vicilina), em diferentes tempos e os peptídeos derivados da digestão foram analisados por imunodeteção com anti-EvV. AmV se mostrou parcialmente resistente a proteólise pelas enzimas intestinais das larvas de *C. maculatus*. As subunidades proteicas da AmV de massa molecular entre 70 e 40 kDa foram digeridas nos intervalos de tempo observados. Porém, fragmentos de vicilinas com massa molecular de 22,6 kDa foram resistentes a hidrólise. No entanto como já foi relatado antes por Uchôa *et al.* (2009) houve formação de vários fragmentos, com a predominância de fragmentos com massa molecular de 30 e 10 kDa. Nas análises por western blotting, a imunodeteção com anticorpos anti-EvV (MACEDO *et al.*, 2008; AMORIM *et al.*, 2008), os dois fragmentos predominantes foram os fragmentos de 22,6 kDa e o fragmento derivado da proteólise de 12,6 kDa.

A presença de peptídeos de vicilinas com massas moleculares semelhantes às observadas por outros autores sugerem que fragmentos imunorreativos ainda mantêm suas regiões de ligação à quitina com o polímero de N-acetil- β -glicosamina conservada (CHEE *et al.*, 1991; MACEDO *et al.*, 1995; UCHÔA *et al.*, 2009). Os peptídeos derivados da hidrólise de AmV submetidos a cromatografia em coluna de afinidade a quitina, apresentaram um perfil semelhante ao observado para a vicilina não digerida, mostrando a presença de dois picos, sendo um pico retido na coluna eluído com 0,1 M de HCl, semelhante aos resultados encontrados por Uchôa e colaboradores (2009) quando avaliaram peptídeos de vicilinas de *V. unguiculata* e à sua ligação à matrizes de quitina e Amorim *et al.*, (2008) que eluíram peptídeos de

vicilinas de *E. velutina* de membranas peritróficas de *P. interpunctella*. As análises por SDS-PAGE e por imunodeteção com anti-EvV revelaram alta semelhança dos peptídeos de AmV ligados a quitina e EvV. Isso reforça a ideia, de que eles realmente podem responder pela ação deletéria da AmV sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*.

Portanto de acordo com os resultados apresentados neste trabalho o provável mecanismo bioinseticida de AmV se deve à sua ligação a estruturas quitinosas presentes no intestino médio dos insetos, associada com a baixa capacidade das enzimas digestivas de *C. maculatus* em degradá-las. Estes resultados confirmam que vicilinas 7S apresentam um papel importante nos mecanismos de defesa de plantas contra insetos, e assim como as outras proteínas ligantes à quitina, são parte do arsenal de defesa de sementes. Portanto, proteínas do tipo vicilinas de sementes de leguminosas não cultivadas podem ser candidatas a utilização no combate a insetos não adaptados. Este trabalho vem contribuir com resultados significativos para elucidar o mecanismo de ação efetivo de vicilinas contra *C. maculatus* baseado nas propriedades tóxicas de proteínas de origem vegetal. Isto evidencia a grande potencialidade de proteínas antimetabólicas encontradas em sementes de leguminosas de vários ecossistemas, tanto regionais, como nacionais, tornando-as potenciais moléculas para o desenvolvimento de bioinseticidas em programas de manejo integrado de pragas, na composição de iscas tóxicas, ou mesmo nos programas de melhoramento de plantas cultivadas.

6. CONCLUSÃO

1. A vicilina de *A. macrocarpa* é uma glicoproteína ácida, oligomérica (tetrâmero), com massa molecular de aproximadamente 228 kDa, composta por subunidades apresentando massas moleculares de 73, 70, 43 e 41 kDa.
2. Semelhante ao observado para outras vicilinas, a AmV apresenta alta afinidade por matrizes de quitina.
3. AmV apresentou uma potente atividade larvicida. Causando mortalidade de 50% das larvas a partir de 0,33% e mortalidade total à concentração de 1%.
4. AmV apresentou uma potente atividade sobre a emergência de adultos. Mostrando redução de 50% na concentração de 0,096%.
5. AmV foi capaz de inibir a muda de *C. maculatus*. A emergência dos adultos só ocorreu até a concentração de 0,5% (p:p) sendo prolongando o tempo de emergência de adultos em 18%. Acima dessa concentração não houve emergência.
6. A vicilina de *A. macrocarpa* foi parcialmente resistentes a digestão pelas proteases digestórias das larvas de *C. maculatus*.
7. Os fragmentos peptídicos gerados com massas moleculares de 22 e 13 kDa preservaram a afinidade a quitina, sugerindo que provavelmente a afinidade por matrizes de quitina esteja relacionada a estes peptídeos.
8. Os fragmentos obtidos da digestão ligaram-se ao anticorpo anti-EvV, mostrando que os fragmentos gerados pela digestão das duas vicilinas são imunorrelacionados, podendo corresponder a uma região conservada na família destas proteínas de defesa.

7. REFERÊNCIAS

ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUIT, T.; MATSUMOTO, K. α -Glicosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52 p. 2541-2545, 2004.

ALEXANDRE, D., LINHARES, R. T., QUEIROZ, B., FONTOURA, L., UCHÔA, A. F., SAMUELS, R. I., MACEDO, M. L. R.; BEZERRA, C. S.; OLIVEIRA, E. M.; DEMARTINI, D. R.; CARLINI, C. R.; SILVA, C. P. 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.

AMORIM, T. M. L. Avaliação da ação bioinseticida de sbti e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de *Plodia interpunctella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). 2007. 82 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

AMORIM, T. M. L.; MACEDO, L. L. P.; UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; PITANGA, J. C. M.; MACEDO, F. P.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): targets for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EvV). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7738–45, 2008.

ARAUJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L. P.; GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M. S.; FRANCO, O. L.; BLOCH-J, C.; SALES, M. P., *In vivo* bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (Fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4381-4387, 2005.

BALBIANI E. G. Etudes anatomiques et histologiques sur le tube digestif des Crytops. **Arch Zool Exp Gen**, v. 8, p. 1–82, 1890.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined, v. 13, n. 12, p. 480-482, 1988.

BARRETO, S. M.; PINHEIRO, A. R. O.; SICHIERI, R.; MONTEIRO, C. A.; FILHO, M. B.; SCHIMIDT, M. I.; LOTUFO, P.; ASSIS, A. M.; GUIMARÃES, V.; RECINE, E. G. I. G.; VICTORA, C. G.; COITINHO, D.; PASSOS, V. M. A. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. **World Health Organization**, v. 14, n. 1, p. 41–68, 2005.

BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*, 2011.

BLOCH, R.; BURGER, M. M., Purification of Wheat-Germ Agglutinin Using Affinity Chromatography on Chitin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, n. 1. p. 13-19. 1974.

BOWN, D.; ELLIS, T. H. N.; GATEHOUSE, J. A., The Sequence of a Gene Encoding Convicilin from Pea (*Pisum sativum*-L) Shows That Convicilin Differs from Vicilin by an Insertion near the N-Terminus. **Biochemical Journal**, v. 251, n. 3. p. 717-726. 1988.

BRADFORD, M. M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2. p. 248-254. 1976.

BURKS, A W.; COCKRELL, G.; STANLEY, J. S.; HELM, R. M.; BANNON, G. A. Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 4, p. 1715–21, out. 1995.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Chronic dietary risk assessment for pesticide residues in Brazilian food. **Revista de Saúde Pública Journal of Public Health**. v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Chronic dietary risk for pesticide residues in food in Brazil : an update. v. 21, n. 11, p. 1057–1064, 2004.

CÂNDIDO, E. S.; PINTO, M. F.; PELEGRINI, P.B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3290-3305, 2011.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B., Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. p. 1-16, 1998.

CHEE, P. P.; JONES, J. M.; SLIGHTOM, J. L., Expression of Bean Storage Protein Minigene in Tobacco Seeds - Introns Are Not Required for Seed Specific Expression. **Journal of Plant Physiology**, v. 137, n. 4. p. 402-408, 1991.

CHESSIN, M.; ZIPF, A. E., Alarm Systems in Higher-Plants. **Botanical Review**, v. 56, n. 3. p. 193-235, 1990.

CHRIS M. ELVIN, TONY VUOCOLO, ROGER D. PEARSON, IAIN J. EAST, GEORGE A. RIDING, CRAIG H. EISEMANN, AND R. L. T. Characterization of a Major Peritrophic Membrane Protein, Peritrophin-44, from the Larvae of *Lucilia cuprina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8925–8935, 12 abr. 1996.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defence. **The Plant cell**, v. 3, n. 1, p 1-9, 1991.

COELHO, M. B.; MACEDO, M. L. R.; MARANGONI, S.; SILVA, D. S.; CESARINO, I.; MAZZAFERA, P. 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.

CRAVEN, A.; HOY, S., Pesticide persistence and bound residues in soil - regulatory significance. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 1. p. 5-9, 2005.

CRUZ, I. B. M. D.; TAUFER, M.; OLIVEIRA, A. K. D., Estudos Toxicológicos. In Moscas-das-frutas de importancia econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado, Malavasi, A.; Zucchi, R. A., Eds. Holos: Ribeirão Preto. 2000.

DATTA, P. K.; BASU, P. S.; DATTA, T. K. Isolation and Characterization of *Vicia faba* Lectin Affinity Purified on Chitin Column. **Preparative Biochemistry**, v. 14, n. 4. p. 373-387. 1984.

DAY, M. F.; WATERHOUSE, D. F., Functions of the alimentary system. John Wiley: New York, p. 299-310. 1953.

DEAN, R. A.; KUC, J., Induced Systemic Protection in Cucumber - Time of Production and Movement of the Signal. **Phytopathology**, v. 76, n. 10. p. 966-970. 1986.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D., Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1. p. 3-24. 1976.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. **J Food Sci**, v. 54, n. 1, p. 108-113, 1989.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual review of entomology**, v. 52, p. 81–106, 2007.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 6, p. 298-307. 2007.

DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R.; LE, D. P., New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. p. 545-569, 1998.

DHALIWAL, G. S.; JINDAL, V.; DHAWAN, A. K. Insect Pest Problems and Crop Losses : Changing Trends. v. 37, p. 1–7, 2010.

DOYLE, J. J.; SCHULER, M. A.; GODETTE, W. D.; ZENGER, V.; BEACHY, R. N.; SLIGHTOM, J. L., The Glycosylated Seed Storage Proteins of *Glycine max* and

Phaseolus vulgaris - Structural Homologies of Genes and Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 20. p. 9228-9238, 1986.

DRESCH, R. R.; A.S. Haeser.; C. Lerner.; B. Mothes.; M.M. Vozári-Hampe.; A.T. Henriques. Artigo Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. v. 15, n. 1, p. 16–22, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUBUS, I. G.; HOLLIS, J. M.; BROWN, C. D., Pesticides in rainfall in Europe. **Environmental Pollution**, v. 110, n. 2, p. 331-344, 2000.

DUYZER, J., Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 5, n. 4, p. 77n-80n, 2003.

EISEMANN, C. H.; BINNINGTON, K. C. The Peritrophic Membrane - Its Formation, Structure, Chemical-Composition and Permeability in Relation to Vaccination against Ectoparasitic Arthropods. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 15-26, 1994.

EISEMANN, C. H.; DONALDSON, R. A.; PEARSON, R. D.; CADOGAN, L. C.; VUOCOLO, T.; TELLAM, R. L., Larvicidal Activity of Lectins on *Lucilia cuprina* - Mechanism of Action. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 72, n. 1, p. 1-10, 1994.

EISENSTEIN, E.; COELHO, K. S. C.; COELHO, S. C.; COELHO, M. A. S. C. Nutrição na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 2, p. 263–274, 2000.

ELVIN C. M.; VUOCOLO T.; PEARSON R. D.; EAST I. J.; RIDING G. A.; EISEMANN, C. H.; TELLAM, R. L. Characterization of a major peritrophic membrane protein, Peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 89, p. 25–35, 1996.

ESHED, V.; GOPHER, A.; GAGE, T. B.; HERSHKOVITZ, I. Has the transition to agriculture reshaped the demographic structure of prehistoric populations? New evidence from the Levant. **American journal of physical anthropology**, v. 124, p. 4, 315–319, 2004.

ESHED, V.; GOPHER, A.; PINHASI, R.; HERSHKOVITZ, I. Paleopathology and the origin of agriculture in the Levant. **American journal of physical anthropology**, v. 143, n. 1, 121–133, 2010.

FAO Feeding the world in 2050. World agricultural summit on food security 16–18 November 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009.

FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION ProdSTAT: Crops. 2011. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/indexes.html?locale=es#DOWNLOAD>>. Acesso em: (11 jun. 2013).

FARRELL, B. "Inordinate Fondness" Explained Why Are There So Many Beetles? **Science**, v. 281, n. 5376, p. 555-559, 1998.

FAVA, L.; ORRU, M. A.; CROBE, A.; CARACCILO, A. B.; BOTTONI, P.; FUNARI, E., Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-dichlorobenzoic acid, 3,4-dichloroaniline, 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. **Microchemical Journal**, v. 79, n. 1-2. p. 207-211. 2005.

FAVERET FILHO, P.; ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L. D. Fruticultura Brasileira: A busca de um modelo exportador. BNDES: Rio de Janeiro, 1999.

FIRMINO, F.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; GOMES, V. M.; MIRANDA, M. R. A.; DOMINGUES, S. J. S.; XAVIER, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, n. 6, p. 749-756, 1996.

FITCHES, E.; ILETT, C.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, L. N.; GREENE, R.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. The effects of Phaseolus vulgaris erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo. **Journal of insect physiology**, v. 47, n.12, p. 1389–1398, 2001.

GATEHOUSE A.M.R., POWELL K.S., PEUMANS W.J., VAN DAMME E.J.M., GATEHOUSE J., Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection, in: Pusztai A., Bardocz S. (Eds.), Lectins, **Biomedical Perspectives**, Taylor & Francis Ltd Publishers, London, p. 35–57, 1995.

GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; BOULTER, D. The Synthesis and Structure of Pea Storage Proteins. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 1, n. 4, p. 287-314, 1984.

GEIER, P. W., Management of Insect Pests. **Annual Review of Entomology**, v. 11, p. 471-500, 1966.

GODDUHN, A.; DUFFY, L. K., Multi-generation health risks of persistent organic pollution in the far north: use of the precautionary approach in the Stockholm Convention. **Environmental Science & Policy**, v. 6, n. 4, p. 341-353, 2003.

GOLDBERG, R. B.; HOSCHEK, G.; DITTA, G. S.; BREIDENBACH, R. W., Developmental Regulation of Cloned Superabundant Embryo Messenger-Rnas in Soybean. **Developmental Biology**, v. 83, n. 2, p. 218-231, 1981.

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A.; MACEDO, L. L. P.; PITANGA, J. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. S.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P., Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005b.

GOMES, L. P.; OLIVIA, C. I. R.; SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M. D.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera*) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

GOMES, V. M.; MOSQUEDA, M. I.; BLANCOLABRA, A.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CORDEIRO, R. A.; XAVIER, J. Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10. p. 4110-4115. 1997.

GOMES, V. M.; OKOROKOV, L. A.; ROSE, T. L.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1379, n. 2, p. 207-216, 1998.

GOMES, V. M.; MOSQUEDA, M-I.; BLANCO-LABRA, A.; SALES, P. Vicilin Storage Proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) Seeds Inhibit Fungal Growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4110–4115, 2000.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. A., Induction of Systemic Resistance to Anthracnose in Cucumber by Phosphates. **Phytopathology**, v. 79, n. 2. p. 176-179. 1989.

GRAPOV, A. F., New insecticides and acaricides. **Uspekhi Khimii**, v. 68, n. 8. p. 773-784. 1999.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G., Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10. p. 1773-1791. 1996.

HAPEMAN, C. J.; MCCONNELL, L. L.; RICE, C. P.; SADEGHI, A. M.; SCHMIDT, W. F.; MCCARTY, G. W.; STARR, J. L.; RICE, P. J.; ANGIER, J. T.; HARMANFETCHO, J. A., Current United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. **Pest Management Science**, v. 59, n. 6-7. p. 681-690. 2003.

HARADA, J. J.; BARKER, S. J.; GOLDBERG, R. B., Soybean Beta-Conglycinin Genes Are Clustered in Several DNA Regions and Are Regulated by Transcriptional and Posttranscriptional Processes. **Plant Cell**, v. 1, n. 4. p. 415- 425. 1989.

HARPER, M. S.; HOPKINS, T. L.; CZAPLA, T. H., Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. **Tissue & Cell**, v. 30, n. 2. p. 166-176. 1998.

HEGEDUS, D. Dwayne Hegedus, Martin Erlandson, Cedric Gillott, Umut Toprak. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual review of entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, v. 54, p. 254-302, 2009. Apud: Balbiani, E. G. Etudes anatomiques et histologiques sur le tube digestif des Crytops. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, v. 8, p. 1–82, 1890.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 254-302, 2009. Apud: VIGNON, P. Recherches sur les épithéliums. **Arch. Zool. Exp. Gen. Ser**, v. 39, p. 371–715, 1901.

HIGGINS, T. J. V.; NEWBIGIN, E. J.; SPENCER, D.; LLEWELLYN, D. J.; CRAIG, S., The Sequence of a Pea Vicilin Gene and Its Expression in Transgenic Tobacco Plants. **Plant Molecular Biology**, v. 11, n. 5. p. 683-695. 1988.

HILDER, V. A.; BOULTER, D., Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, v. 18, n. 3. p. 177-191. 1999.

HILKER, M.; MEINERS, T. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 85, n. 2, p. 267–80, maio. 2010.

HOPKINS, T. L.; HARPER, M. S., Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 47, n. 2. p. 100-109. 2001.

HOUSE, H. L. *Insect nutrition*. n. 5, p. 13–26, 1960.

IMURA, O. Life histories of stored-product insects. apud: FUJII, K.; GATEHOUSE, A. M. R.; JOHNSON, C. D.; MITCHEL, R.; YOSHIDA, T. Bruchids and legumes: economics, ecology and coevolution. **Kluwer Dordrecht**, p. 257–269, 1990.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2011. Disponível em: <<http://www.itis.gov/>>. Acesso em: (20 mar. 2013).

SARZI, I.; INOUE, A. M.; CARMELLO, Q. A. C. Produção de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (benth.) brenan) em substrato a base de casca de pinus compostada, variando as soluções de fertirrigação. **Embrapa Agroindústria Tropical**, SEBRAE/CE-UFC, 2008.

ISHAAYA, I., Biorational insecticides - Mechanism and application. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 54, n. 4. p. 144-144. 2003.

ISHIMOTO, M. & CHRISPEELS, M.J. 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of amylase inhibitor in the common bean. **Plant phisiol**, v. 111, p. 393- 401.

JOHANSSON, S.; GO, U.; LUIJENDIJK, T.; BACKLUND, A.; CLAESON, P.; BOHLIN, L. A Neutrophil Multitarget Functional Bioassay to Detect Anti-inflammatory. **Journal of natural products**, v. 65, n. 1, p. 32–41, 2002.

JOHNSON, C. D.; SOUTHGATE, B. J.; DELOBEL, A. A revision of the Caryedontini (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae) of Africa and the Middle East. **Mem. Amer. Entomol. Soc.** v. 44, p. 1–120, 2004.

KIDD, K. A.; SCHINDLER, D. W.; MUIR, D. C. G.; LOCKHART, W. L.; HESSLEIN, R. H., High-Concentrations of Toxaphene in Fishes from a Sub-Arctic Lake. **Science**, v. 269, n. 5221. p. 240-242. 1995.

KIM, J.-Y.; Park, Seong-Cheol.; Hwang, Indeok.; Cheong, Hyeonsook.; Nah, Jae-Woon.; Hahm, Kyung-Soo.; Park, Yoonkyung. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2860–72, jun. 2009.

KOGAN, M., Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. p. 243-270. 1998.

KOGAN, M., Natural Chemicals in Plant-Resistance to Insects. *Iowa State Journal of Research*, v. 60, n. 4. p. 501-527. 1986.

KOLPIN, D. K.; SCHNOEBELEN, D. J.; THURMAN, E. M., Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. **Ground Water**, v. 42, n. 4. p. 601-608. 2004.

KRAMER, K. J.; HOPKINS, T. L.; SCHAEFER, J., Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 10. p. 1067-1080. 1995.

KRATTIGER, A. F., Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA: Ithaca: NY, v. 2, p. 42, 1997.

KRISHNAVENI, S.; LIANG, G. H.; MUTHUKRISHNAN, S.; MANICKAM, A., Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. **Plant Science**, v. 144, n. 1. p. 1-7. 1999.

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

LAUER, I.; FOETISCH, K.; KOLARICH, D.; BALLMER-WEBER, B. K.; CONTI, A.; ALTMANN, F.; VIETHS, S.; SCHEURER, S., Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. **Biochemical Journal**, v. 383, n. p. 327-334. 2004.

LEADLEY, R. J.; Chi, L.; Rebello, S S.; Gagnon, A. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 43, n. 2, p. 101–16, 2000.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**. v. 42, p. 525–550, 1997.

LEITE, J. F. M.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. L.; BRINGEL, P. H. S. F.; LACERDA, R. R. E.; GOMES, V. M.; CAJAZEIRAS, J. B. A.; NASCIMENTO, K. S.; PESSÔA, H. L. F.; GADELHA, C. A. A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. **Howard Seeds**. p. 3277–3290, 2012.

LINGAFELTER, S. and J. Pakaluk. Comments on the Bean beetle Chrysomelidae. **Chrysomela**, v. 33, 3 p., 1997.

LOPEZ, O.; FERNANDEZ-BOLANOS, J. G.; GIL, M. V., New trends in pest control: the search for greener insecticides. **Green Chemistry**. v. 7, n. 6, p. 431-442, 2005.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, v. 1, 4^o ed. 384p, 2002.

LYONET P. Traité Anatomique de la Chenille qui ronge le bois de Saule. **La Haye, Holland: Gosse and Pinet**, p. 587, 1762.

MACEDO, C. S. Avaliação da ação efeito inseticida de vicilinas isoladas de sementes de *Erythrina velutina* em condições de semi-campo para moscas das frutas (*Ceratitis capitata*). 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

MACEDO, L. L. P. Atividade bioinseticida e mecanismo de ação de vicilinas de sementes *Erythrina velutina* sobre moscasdas-frutas *Ceratitis capitata*. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

MACEDO, L. L. P.; AMORIM, T. M. L.; OLIVEIRA, A. S.; UCHÔA, A. F.; MACEDO, F. P.; RIBEIRO, J. K. C.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Larvicidal effects of a chitin-binding vicilin from *Erythrina velutina* seeds on the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 56. p. 802-808, 2008.

MACEDO, M. L. R.; ANDRADE, L. B. D.; MORAES, R. A.; XAVIER-FILHO, J., Vicilin Variants and the Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds to the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 105, n. 1, p. 89-94, 1993.

MACEDO, M. L. R.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; XAVIER-FILHO, J. Purification and Properties of Storage Proteins (Vicilins) from Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds Which Are Susceptible or Resistant to the Bruchid Beetle *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 2, p. 183-190, 1995.

MALDONADO, S. H. G.; MARIN-JARILLO, A.; CASTELLANOS, J. Z. GONZALES DE MEJIA, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **J. Stored Prod. Res.**, v. 32, n. 1, p. 53-58, 1996.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S-I.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 2005.

MCDUGALL P. The Global Agrochemical and Seed Markets Industry Developments, AgriService, Vineyard Business Centre Saughland Pathhead Midlothian EH37 5XP Copyright 2012. Visto em junho/2013.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR 2013. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=1&menu=1680>>. Acesso em: (13 jun. 2013).

MINNEY, B. H. P.; GATEHOUSE, A. M. R.; DOBIE, P.; DENDY, J.; CARDONA, C.; GATEHOUSE, J. A., Biochemical-Bases of Seed Resistance to *ZabrotesSubfasciatus* (Bean Weevil) in *Phaseolus-Vulgaris* (Common Bean) - a Mechanism for Arcelin Toxicity. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 10. p. 757-&. 1990.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 431–50, 2 jun. 2012.

MONTEIRO, N. K. V. Avaliação das atividades anti-inflamatória, anticoagulante e antiproliferativa do inibidor de quimotripsina das sementes de *Erythrina velutina* (EvCI). 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUEBARREIRA, M. C.; SANTOSDEOLIVEIRA, R.; PINTO, V. P. T.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 8, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 59, p. 783-787, 1977.

MOTA, A C.; DAMATTA, R. A.; LIMA FILHO, M.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 9, p. 873–880, 2003.

MÜLLER, U.; LÜTTKOPF, D.; HOFFMANN, A.; PETERSEN, A.; BECKER, W. M.; SCHOCKER, F.; NIGGEMANN, B.; ALTMANN, F.; KOLARICH, D.; HAUSTEIN, D.; VIETHS, S., Allergens in raw and roasted hazelnuts (*Corylus avellana*) and their

cross-reactivity to pollen. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 1. p. 2-12. 2000.

NAKAMURA, T.; MINE, S.; HAGIHARA, Y.; ISHIKAWA, K.; IKEGAMI, T.; UEGAKI, K. Tertiary Structure and Carbohydrate Recognition by the Chitin-Binding Domain of a Hyperthermophilic Chitinase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of molecular biology**, v. 381, n. 3, p. 670-680, 2008.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 01, p. 31, 2005.

OERKE, E.C.; DEHNE, H. W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. Crop production and crop protection—estimated losses in major food and cash crops. **Elsevier Science**, Amsterdam, 808 pp, 1994.

OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH, C.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SALES, M. P. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, n. 2, p. 122-132, 2002.

ORRUNO, E.; MORGAN, M. R. A. Purification and characterisation of the 7S globulin storage protein from sesame (*Sesamum indicum* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 926-934, 2007.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 101–105, 2003.

PAES, E. V.; UCHÔA, A. F.; PINTO, S. T.; SILVA, C. P.; FERNANDES, K. V. S.; Oliveira, A. E. A.; Xavier-Filho, J. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, n. 1, p. 11–17, 2008.

PEDALINO, M.; DURZO, M. P.; DELLEDONNE, G.; GRILLO, S.; RAO, R., The Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp) Seed Storage Proteins. **Seed Science and Technology**, v. 20, n. 2. p. 223-231. 1992.

PETERS, W., Peritrophic membranes. Springer-Verlag New York, v. 1992.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 243–255, 17 out. 2012.

RAUSHER, M. D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 857–64, 14 jun. 2001.

RICHARDS A. G; RICHARDS P. A. The peritrophic membrane of insects. **Annual Review of Entomology**. v. 22, p. 219–240, 1977.

RYAN, C. A., Protease Inhibitors in Plants - Genes for Improving Defenses against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. p. 425-449. 1990.

- SAGIV, S. K.; TOLBERT, P. E.; ALTSHUL, L. M.; KORRICK, S. A., Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. **Epidemiology**, v. 18, n. 1. p. 120-129. 2007.
- SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER-FILHO, J., 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.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J., Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 3, p. 319-326, 1996.
- SALES, M. P.; MACEDO, M. L. R.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. **Comp Biochem Physiol**, v. 103B, p. 945-950, 1992.
- SALES, M. P.; PIMENTA, P. P.; PAES, N. S.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER-FILHO, J., Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 27-34, 2001.
- SALLES, L. A., Manejo Integrado de Pragas em Pomares de Frutíferas. In Bases e técnicas do manejo de insetos Guedes, J. C.; Costa, I. D. d.; Castiglioni, E., Eds. UFSC/CCR/DFS; Palloti: Santa Maria, pp 219-226. 2000b.
- SANCHEZ-MONGE, R.; LOPEZ-TORREJÓN G.; PASCUAL, C. Y.; J. VARELA, J.; MARTIN-ESTEBAN, M.; SALCEDO, G. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 34, n. 11, p. 1747-53, nov. 2004.
- SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. D. A.; ARAGAO, K. S.; DE OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. D. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. D. O.; DE ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S., Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4. p. 1050-1055. 2006.
- SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M., A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. **Plant Science**, v. 167, n. 6. p. 1203-1210. 2004.
- SAWADA, S.; YANAGA, Y.; TASHIRO, M., Structure and stability of alpha-amylase inhibitors from the seeds of Shirohanamame (*Phaseolus coccineus* L.), Murasakihanamame (*Phaseolus coccineus* L.), Toramame (*Phaseolus vulgaris* L.) and Uzuramame (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 53, n. 10, p. 534-541, 2006.

SCHOLZ, G.; MANTEUFFEL, R.; MUNTZ, K.; RUDOLPH, A., Low-Molecular-Weight Polypeptides of Vicilin from *Vicia faba* L Are Products of Proteolytic Breakdown. **European Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 103-107, 1983.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I., Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4. p. 168-175. 1998.

SHARMA S. S. (1984) Review of literature on losses caused by *Callosobruchus* species during storage of pulses. *Bulletin of Grain Technology* 22, 62–71. apud: BHALLA, S.; GUPTA, K.; KAPUR, M. L.; LAL, B.; KHETARPAL, R. K. **Phytosanitary risk of bruchids in lentil imported into India, Bulletin EPPO**, v. 36, n. 1, p. 25-29. 2006.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A., Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, **Advances in Botanical Research**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.

SHUTOV, A. D.; BÄUMLEIN, H.; BLATTNER, F. R.; MÜNTZ, K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 388, p. 1645-1654, 2003.

SHUTOV, A. D.; KAKHOVSKAYA, I. A.; BRAUN, H.; BAUMLEIN, H.; MUNTZ, K., Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: Evidence for a common single-domain ancestral gene. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 6. p. 1057-1069. 1995.

SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; LIMA, A. L. R.; FERREIRA, J. G.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, M. L. V.; ZINGALI, R. B.; CORREIA, M. T. S. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74–80, 2011.

SIVANESAN, S. D.; KRISNAMURTHI, K.; WACHASUNDER, S. D.; CHAKRABARTI, T., Genotoxicity of pesticide waste contaminated soil and its leachate. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 17, n. 3. p. 257-265, 2004.

SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. **Annual Review of Entomology**, v. 24, p. 449–473, 1979.

SOUZA, A. J.; FERREIRA, A. T. S.; PERALES, J.; BEGHINI, D. G.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J.; VENANCIO, T. M.; OLIVEIRA, A. E. A. Identification of *Albizia lebeck* seed coat chitin-binding vicilins (7S globulins) with high toxicity to the larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 118–124, 2012.

SOUZA, S. M.; UCHÔA, ADRIANA F.; SILVA, JOSÉ R.; SAMUELS, RICHARD I.; OLIVEIRA ANTÔNIA E A.; OLIVEIRA, ELIANA M.; LINHARES, RICARDO T.; ALEXANDRE, DANIEL.; SILVA, CARLOS P. The fate of vicilins, 7S storage

globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 9, p. 1130–8, 2010.

SPENCER, D.; CHANDLER, P. M.; HIGGINS, T. J. V.; INGLIS, A. S.; RUBIRA, M. Sequence Interrelationships of the Subunits of Vicilin from Pea-Seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 2, n. 5, p. 259-267. 1983.

STRAUSS, S.; AGRAWAL, A. The ecology and evolution of tolerance to herbivory. **Trends Ecol. Evol.** v. 14, p. 179–185, 1999.

SUN, S. M.; SLIGHTOM, J. L.; HALL, T. C., Intervening Sequences in a Plant Gene - Comparison of the Partial Sequence of Cdna and Genomic DNA of French Bean Phaseolin. **Nature**, v. 289, n. 5793, p. 37-41. 1981.

TAIRA, T.; YAMAGAMI, T.; ASO, Y.; ISHIGURO, M.; ISHIHARA, M., Localization, accumulation, and antifungal activity of chitinases in rye (*Secale cereale*) seed. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 12, p. 2710-2718. 2001.

TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, E. S.; SALES, M. P. Effects of a chitin binding vicilin from *Erythrina velutina* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*). **Protein and peptide letters**, v. 15, n. 3, p. 270–4, 2008.

TEIXEIRA, F. M. Vicilinas de sementes de leguminosas selvagens: purificação, caracterização, efeito deletério e mecanismo de ação para bruquídeos e fungos fitopatogênicos. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Celular) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C., Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 12, p. 1189-1201. 2000.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 2, p. 87–101, 1999.

TEMPLEMAN, T. S.; DEMAGGIO, A. E.; STETLER, D. A. Biochemistry of Fern Spore Germination: Globulin Storage Proteins in *Matteuccia struthiopteris* L. **Plant physiology**, v. 85, n. 2, p. 343–9, 1987.

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

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BAKER, J., Compartmentalization of digestion. In *Biology of the Insect Midgut*, Lehane, J.; Billingsley, P., Eds. Chapman and Hall: London, pp 206-233. 1996.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C., Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 109, n. 1, p. 1-62. 1994.

- TERRA, W. R., Physiology and Biochemistry of Insect Digestion - an Evolutionary Perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 4, p. 675-734. 1988.
- THOMPSON, J. N. The Coevolutionary Process, Univ. of Chicago Press, Chicago, 1994.
- TIERNEY, M. L.; BRAY, E. A.; ALLEN, R. D.; MA, Y.; DRONG, R. F.; SLIGHTOM, J.; BEACHY, R. N., Isolation and Characterization of a Genomic Clone Encoding the Beta-Subunit of Beta-Conglycinin. **Planta**, v. 172, n. 3. p. 356-363. 1987.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D., Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515. p. 281-284. 2001.
- TOWBIN, H.; STACHELIN, N.T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- TUDA, M. Applied evolutionary ecology of insects of the subfamily Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, n. 3, p. 337-346, 2007.
- TUDA, M; RÖNN, J.; BURANAPANICHPAN, S.; WASANO, N.; ARNQVIST, G. Evolutionary diversification of the bean beetle genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): traits associated with stored-product pest status. **Molecular ecology**, v. 15, n. 12, p. 3541-51, out. 2006.
- UCHÔA, A. F.; CARVALHO, C. D. S. C. D.; OLIVEIRA, A. E. A. D.; XAVIERFILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. 2002. Disponível em: <<http://www.jxavierfilho.hpg.ig.com.br/semente.htm>>. Acesso em: (10 março 2013).
- UCHÔA, A. F.; DAMATTA, R. A.; RETAMAL, C. A.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; SOUZA, S. M.; SAMUELS, R. I.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 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. 169-78, 2006.
- UCHÔA, A.; MIRANDA, M.; SOUZA, A.; GOMES, V.; FERNANDES, K.; LEMOS, F.; OLIVEIRA, A.; XAVIER, J. Toxicity of hydrolyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, n. 17, p. 8056-8061, 2009.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-50, 2011.
- VIGNON P. Recherches sur les épithéliums. **Arch. Zool. Exp. Gen. Ser.** v. 3, n. 9, p. 371-715, 1901.

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**, v. 47, n. 2, p. 110–118, 2001.

WANG, P.; GRANADOS, R. R., An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13. p. 6977-6982. 1997.

WANG, P.; LI, G.; GRANADOS, R. R. Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 215–27, 2004.

WANG, S.; YE, X.; CHEN, J.; RAO, P. A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 116-122, 2012.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 609–32, 2010.

WATERHOUSE, D. F. Digestion in insects. **Annual Review of Entomology**. v. 2, p. 1–18, 1957.

WIGGLESWORTH, V., The principles of insect physiology. 7 ed.; Chapman and Hall: London, p 827. 1972.

WILKENING, K. E., Trans-pacific air pollution: Scientific evidence & political implications. **Water Air and Soil Pollution**, v. 130, n. 1-4. p. 1825-1830. 2001.

WOLKERS, H.; VAN BAVEL, B.; ERICSON, I.; SKOGLUND, E.; KOVACS, K. M.; LYDERSEN, C., Congener-specific accumulation and patterns of chlorinated and brominated contaminants in adult male walrus from Svalbard, Norway: Indications for individual-specific prey selection. **Science of the Total Environment**, v. 370, n. 1. p. 70-79. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; food and agriculture organization of the United Nations. Diet, nutrition and the prevention of Report of a Joint WHO / FAO Expert Consultation, 2003.

WORRALL, F.; BESIEN, T., The vulnerability of groundwater to pesticide contamination estimated directly from observations of presence or absence in wells. **Journal of Hydrology**, v. 303, n. 1-4. p. 92-107. 2005.

WYSS, E.; LUKA, H.; PFIFFNER, L.; SCHLATTER, C.; UEHLINGER, G.; DANIEL, C. Approaches to pest management in organic agriculture: a case study in European apple orchards. **Organic Research**, p. 33–36, 2005.

XAVIER-FILHO, J.; Campos, F. a. P.; Ary, Maria B.; Silva, C. Peres.; Carvalho, Marta M. M.; Macedo, Maria Ligia R.; Lemos, F. J. a.; Grant, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus*

maculatus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 1139–1143, 1989.

XAVIER-FILHO, J. The resistance of seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) to the cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86, n. 2, p. 75-77, 1991.

YAO, Q.; WU, C. LUO, P.; XIANG, X.; LIU, J.; MOU, L. BAO, J. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1477-1485, 2010.

YUNES, N. A.; ANDRADE, M. T.; SALES, M. P.; MORAIS, R. A.; FERNANDES, K. V.; GOMES, V. M.; XAVIER-FILHO, J. Legume Seed Vicilins (7S Storage Proteins) Interfere with the Development of the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 1, p. 111-116, 1998.

ZEHNDER, G.; GURR, G. M.; KÜHNE, S.; WADE, M. R.; WRATTEN, S. D.; WYSS, E. Arthropod pest management in organic crops. **Annual review of entomology**, v. 52, p. 57–80, 2007.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 852–858, 2008.

ZHU-SALZMAN, K; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 15123–15128, 1998.