



**TOXICIDADE DOS TEGUMENTOS DAS SEMENTES DE *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e *Canavalia rosea* (Sw.) DC. PARA O INSETO *Callosobruchus maculatus* (F.)**

GEOVANNA BASTOS GALLITO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

02/2023

**TOXICIDADE DOS TEGUMENTOS DAS SEMENTES DE *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e *Canavalia rosea* (Sw.) DC. PARA O INSETO *Callosobruchus maculatus* (F.)**

GEOVANNA BASTOS GALLITO

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

02/2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

G171

Gallito, Geovanna Bastos.

Toxicidade dos tegumentos das sementes de *Canavalia ensiformis* (L)DC e *Canavalia rosea* (Sw.) para o inseto *Callosobruchus maculatus* (F.) / Geovanna Bastos Gallito. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

136 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Antonia Elenir Amancio Oliveira.

1. Tegumentos. 2. Vicilinas. 3. Quitinases. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

GEOVANNA BASTOS GALLITO

**TOXICIDADE DOS TEGUMENTOS DAS SEMENTES DE *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e *Canavalia rosea* (Sw.) DC. PARA O INSETO *Callosobruchus maculatus* (F.)**

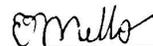
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2023

Banca Avaliadora:



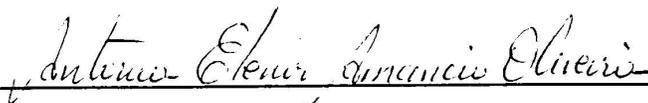
Prof<sup>o</sup>. Dr. José Roberto da Silva (UFRJ-Macaé)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Érica de Oliveira Mello (LFBM/CBB/UENF)



Prof<sup>o</sup> Dr. Geraldo de Amaral Gravina (LEAG/CCTA/UENF)



Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antonia Elenir Amancio Oliveira (LQFPP/CBB/UENF)

(Orientadora)

**“Tenha orgulho do quanto você já andou. Tenha fé em quão  
longe você pode chegar”**

## **Agradecimentos**

A Deus, meu Pai e meu melhor amigo, obrigada por sempre estar comigo em todos os momentos, iluminando meus caminhos e me dando forças para enfrentar os desafios da vida, todos os dias. Sem a fé em ti, nada existiria na minha vida. A Nossa Senhora Aparecida, Fátima e Auxiliadora por sempre ouvirem minhas orações de alegria e vitória mas também de momentos difíceis e conturbados. Obrigada por me guiarem e me protegerem de todo o mal, com suas graças divinas.

À minha mãe, por ser essa pessoa guerreira e trabalhadora, que me inspira todos os dias a ser como ela. Obrigada por ter enfrentado diversos obstáculos e desafios para eu ter uma excelente educação e valores que me fizeram ser a pessoa que sou hoje. Obrigada por entender as minhas ausências diárias devido aos meus trabalhos, estudos intensos e laboratório e por ser o meu refúgio e melhor amiga quando tudo parece desabar. Por fim, nunca terei palavras e textos suficientes para demonstrar toda a minha gratidão por você. Ao meu pai, obrigada por me ouvir em vários momentos, e ser risada e diversão sempre. Vocês fazem parte de tudo isso.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Antonia Elenir, por toda orientação até aqui e profissionalismo impecável. Agradeço por cada conversa que me incentivou tanto na vida acadêmica e profissional quanto na pessoal, isso para mim vale muito. Obrigada também pela oportunidade, compreensão e paciência. Você é um exemplo a ser seguido.

A prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érica Mello, ao prof. Dr<sup>o</sup> Geraldo Gravina e ao prof. Dr<sup>o</sup> José Roberto da Silva por terem aceitado participar da banca e contribuir para meu crescimento profissional.

Aos meus amigos de longa data: Karina, Milena, Carla, Igor, Laiza, Murilo, Amanda e Juan, vocês foram fundamentais nessa jornada. Agradeço por cada conversa e incentivo para continuar todos os dias firme nessa luta.

Aos meus colegas do laboratório: Aline, Sarah, Kayan, Roberta e Karine, muito obrigada por todo apoio, conversas e ajuda no experimentos. Em especial, agradeço a minha amiga Sarah, por cada conversa, incentivo e ajuda. Vocês fizeram parte disso.

A coordenação do curso de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal. Em especial ao prof<sup>o</sup> Thiago Venâncio e a prof<sup>a</sup> Claudete que nunca mediram esforços para ajudar e

orientar os alunos do programa. Um agradecimento especial à Margareth, secretária do programa, que faz tudo que pode para ajudar os alunos.

À UENF e todo seu corpo docente, por ter persistido a várias crises educacionais e financeiras, mostrando a importância e valor da educação para formar grandes profissionais.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ por terem financiado meu projeto.

A todos que torcem por mim e me ajudaram na minha formação acadêmica, meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS.....	6
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Sementes.....	9
1.2. Insetos-praga.....	11
1.2.1 <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	14
1.3 Mecanismos de defesa de sementes .....	16
1.3.1. Tegumento de sementes como barreira de defesa.....	17
1.3.2. Proteínas tóxicas de sementes para o inseto-praga .....	19
1.4 <i>Canavalia rosea</i> .....	24
1.5 <i>Canavalia ensiformis</i> .....	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos específicos.....	28
3. METODOLOGIA.....	29
3.1 Material Vegetal.....	29
3.2. Insetos .....	29
3.3. Confeção de sementes artificiais com tegumentos naturais de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> .....	30
3.4. Análise proteômica comparativa dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> .....	30
3.4.1. Extração proteica.....	30
3.4.2. Digestão proteica.....	31
3.4.3. Análise das proteínas por espectrometria de massas .....	32
3.4.4. Análise dos dados da proteômica.....	33
3.5. Isolamento das proteínas com afinidade a quitina .....	34
3.5.1. Extração proteica.....	34
3.5.2. Isolamento das proteínas por cromatografia de afinidade a quitina .....	34
3.5.3. Separação das proteínas por diferença de solubilidade em água.....	35
3.6. Caracterização das proteínas com afinidade a quitina .....	35

3.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	35
3.6.2. <i>Western blotting</i> para detecção de vicilinas e quitinases na fração retida em quitina dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> .....	36
3.6.2. Identificação das proteínas por espectrometria de massas .....	37
3.7. Análises ds toxicidade das frações para o inseto <i>C. maculatus</i> .....	38
3.7.1. Confeção de sementes artificiais contendo frações retidas em quitina de tegumentos de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> .....	38
3.7.2. Sementes artificiais contendo a fração rica em quitinases (FRQ) do tegumento de <i>C. ensiformis</i> .....	38
3.8. Efeitos do calcofluor sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> .....	39
3.9. Análise bioquímicas dos conteúdos das reservas e enzimas digestivas das larvas desenvolvidas nas sementes contendo calcofluor .....	39
3.9.1. Extração das larvas .....	39
3.9.3. Determinação de triacilglicerol .....	40
3.9.4. Determinação de colesterol .....	41
3.9.5. Determinação de proteínas totais .....	41
3.9.6. Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase .....	42
3.9.7. Determinação da atividade de lipases .....	43
3.9.8. Determinação da atividade de proteases cisteínicas .....	43
3.10. Experimentos <i>in silico</i> .....	44
3.10.1. Sítios de ligação à quitina .....	44
3.10.2. <i>Docking</i> da vicilina e quitinase com o tetrâmero de N-acetilglicosamina (NAG) <sub>4</sub> .....	45
3.11. Análise de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina no transcriptoma de embriões, larvas pupas e adultos de <i>C. maculatus</i> .....	45
3.12. Análise estatística dos dados .....	46
4. RESULTADOS .....	47
4.1. Influência dos tegumentos naturais das sementes de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> sobre o desenvolvimento do inseto <i>C. maculatus</i> .....	47
4.2. Análise proteômica comparativa dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> .....	53
4.3. Isolamento das proteínas com afinidade a quitina dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> .....	72
4.4. Visualização do perfil proteico das frações com afinidade à quitina .....	73
4.5. Avaliação da toxicidade das frações retidas em quitina dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> e <i>C. rosea</i> para o inseto <i>C. maculatus</i> .....	75
4.6. Avaliação da toxicidade da fração rica em quitinase (FRQ) dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> .....	79

4.7. Identificação, por espectrometria de massas, das proteínas com afinidade à quitina dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> .....	80
4.8. <i>Docking</i> molecular da vicilina com o tetrâmero de <i>N</i> -acetilglicosamina (NAG) <sub>4</sub> .....	84
4.9. <i>Docking</i> molecular da quitinase com o tetrâmero de <i>N</i> -acetilglicosamina (NAG) <sub>4</sub> .....	88
4.10. Análise da influência do calcofluor sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> .....	91
4.11. Análise quantitativa de glicose, triacilglicerol, colesterol e proteínas totais em larvas de <i>C. maculatus</i> .....	94
4.11.1. Quantificação de glicose .....	94
4.11.2. Quantificação de triacilglicerol .....	95
4.11.3. Quantificação de colesterol .....	95
4.11.4. Quantificação de proteínas totais .....	96
4.12. Análise da atividade das enzimas em larvas de <i>C. maculatus</i> .....	97
4.12.1. Atividades de enzimas $\alpha$ -amilases .....	97
4.12.2. Atividades de lipases .....	98
4.12.3. Determinação da atividade de proteases cisteínicas .....	99
4.13. Transcritos envolvidos com metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de embriões de <i>C. maculatus</i> .....	100
4.14. Transcritos envolvidos com metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de larvas, pupas e adultos de <i>C. maculatus</i> .....	101
5. DISCUSSÃO .....	104
6. CONCLUSÃO .....	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116

## LISTA DE ABREVIações

<b>ANOVA</b>	Analysis Of Variance
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>APS</b>	Amonium Persulfate
<b>BLASTp</b>	Protein-Basic Local Alignment Search Tool
<b>B.O.D.</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>DAB</b>	Di-amino-benzidina
<b>DAO</b>	Dias Após a Oviposição
<b>DOPE</b>	Discrete Optimized Protein Energy
<b>DTT</b>	1,4 - Dithiothreitol
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic acid)
<b>FRQ</b>	Fração rica em quitinase
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>MP</b>	Matriz Peritrófica
<b>MW</b>	Marcador de massa molecular
<b>NAG<sub>4</sub></b>	Tetrâmero de N-Acetil- $\beta$ -D-Glicosamina
<b>OPD</b>	OrtoPhenilDiamina
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PLIP</b>	Protein-Ligand Interaction Profiler
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salina)
<b>SDS-Page</b>	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>TCA</b>	TriChloroacetic Acid (Ácido Tricloroacético)

**PDT** Período de Desenvolvimento Total

**TEMED** Tetra-Metil-Etileno-Diamina

**Tris** Tris-hidroximetil amino etano

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>C. maculatus</i> .....	17
Figura 2. Avaliação da interferência dos tegumentos naturais de <i>C. rosea</i> e <i>C. ensiformis</i> sobre a oviposição de fêmeas de <i>C. maculatus</i> .....	50
Figura 3. Avaliação da interferência dos tegumentos naturais de <i>C. rosea</i> e <i>C. ensiformis</i> sobre a eclosão larval de <i>C. maculatus</i> .....	51
Figura 4. Avaliação da interferência de semente natural de <i>C. rosea</i> e <i>C. ensiformis</i> sobre a eclosão larval de <i>C. maculatus</i> .....	52
Figura 5. Análise da interferência do tegumento de <i>C. rosea</i> e <i>C. ensiformis</i> sobre os parâmetros de desenvolvimento e sobrevivência do <i>C. maculatus</i> .....	54
Figura 6. Diagrama de venn representando a distribuição das proteínas identificadas durante a análise proteômica comparativa.....	56
Figura 7. Análise dos processos biológicos das proteínas únicas identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica.....	58
Figura 8. Análise dos processos biológicos das proteínas únicas identificadas nos tegumentos de <i>C. rosea</i> (CR) durante a análise proteômica.....	58
Figura 9. Análise dos processos biológicos das proteínas UP identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica.....	67
Figura 10. Análise dos processos biológicos das proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica.....	68
Figura 12. Perfil cromatográfico das proteínas de tegumentos de <i>C. ensiformis</i> isoladas por cromatografia em coluna de afinidade a quitina.....	75
Figura 13. Perfil cromatográfico das proteínas de tegumentos de <i>C. rosea</i> isoladas por cromatografia em coluna de afinidade a quitina.....	76

Figura 14. Visualização do perfil proteico em gel de eletroforese 12% das frações retidas dos tegumentos de <i>C. rosea</i> através de cromatografia.....	77
Figura 15. Perfil proteico da fração retida em quitina em gel de eletroforese...	80
Figura 16. Perfil proteico da fração retida em quitina em gel de eletroforese...	80
Figura 17. Avaliação da toxicidade de 1% da fração retida em quitina dos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> sobre os parâmetros de oviposição, penetração larval e massa larval de <i>C. maculatus</i> .....	82
Figura 18. Avaliação da toxicidade de 1% da fração retida em quitina dos tegumentos de <i>C. rosea</i> sobre os parâmetros de oviposição, penetração larval e massa larval de <i>C. maculatus</i> .....	83
Figura 19. Avaliação interferência de 1% da fração CBC de tegumentos de <i>C. ensiformis</i> a massa larval de <i>C. maculatus</i> .....	84
Figura 20. Interferência do tegumento artificial contendo 1% de calcofluor sobre os parâmetros de oviposição e penetração larval de <i>C. maculatus</i> .....	85
Figura 21. Interferência do tegumento artificial contendo 0,5% de calcofluor sobre os parâmetros de oviposição e massa larval de <i>C. maculatus</i> .....	90
Figura 22. Quantificação de glicose em larvas com 20 DAO. Quantidade de glicose ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larva do controle e desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor.....	93
Figura 23. Quantificação de triacilglicerois em larvas com 20 DAO. Quantidade de triacilglicerois ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	90
Figura 24. Quantificação de colesterol em larvas com 20 DAO. Quantidade de colesterol ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	93
Figura 25. Quantificação de proteínas totais solúveis em larvas com 20 DAO. Quantidade de proteínas totais ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	96

Figura 26. Análise da atividade de a-amilases em larvas com 20 DAO. Atividade da enzima (U por mg de larva) controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	97
Figura 27. Análise da atividade de lipases em larvas com 20 DAO. Atividade da enzima em larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	98
Figura 28. Análise da atividade de proteases cisteínicas em larvas com 20 DAO. Atividade da enzima de larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.....	99
Figura 29. Banda reativa ao anticorpo anti-quitinase, de aproximadamente 25 kDa do gel de eletroforese da fração retida em quitina de tegumentos de <i>C. ensiformis</i> .....	100
Figura 30. Alinhamento dos peptídeos obtidos da banda retida em quitina de tegumento de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	101
Figura 31. Alinhamento dos peptídeos obtidos da banda retida em quitina de tegumento de <i>C. ensiformis</i> .....	102
Figura 32. Alinhamento da sequência das proteínas com vicilina de <i>V. anguicularis</i> ,.....	103
Figura 33. Potencial sítio de ligação à quitina na estrutura do monômero de vicilina.....	103
Figura 34. Potencial sítio de ligação à quitina com a quitinase.....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas unicamente identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica.....	57
Tabela 2. Proteínas unicamente identificadas nos tegumentos de <i>C. rosea</i> (CR) durante a análise proteômica.....	57
Tabela 3. Proteínas UP identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica. ....	60
Tabela 4. Proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica. ....	62
Tabela 5. Proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de <i>C. ensiformis</i> (CE) durante a análise proteômica. ....	69
Tabela 6. Interações entre o monômero de vicilina e (NAG) <sub>4</sub> .....	91
Tabela 7. Interações entre o monômero de vicilina e (NAG) <sub>4</sub> .....	94
Tabela 8. Transcritos relacionados ao metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de embriões de <i>C. maculatus</i> nos estágios de 0-7 e 7-24 horas após a fertilização (haf).....	106
Tabela 9. Transcritos relacionados ao metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de larvas, pupas e adultos de <i>C. maculatus</i> .....	107

## RESUMO

O tegumento é a estrutura externa da semente e está relacionado com a defesa contra agressores, como o inseto *C. maculatus*. Estudos mostraram que os tegumentos de sementes de *C. ensiformis* bloquearam 100% a penetração das larvas de *C. maculatus* e possuem proteínas tóxicas para insetos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade de tegumentos de sementes de *C. ensiformis* e *C. rosea* para *C. maculatus*, com ênfase nas proteínas com afinidade a quitina. A toxicidade dos tegumentos naturais para o inseto foram estudadas em sistema de sementes artificiais. Para a identificação das proteínas foi realizada proteômica comparativa por espectrometria de massas. Frações proteicas foram extraídas dos tegumentos por cromatografia de afinidade à quitina. A caracterização das proteínas foi feita por SDS-PAGE, *Western blotting* e espectrometria de massas. Estudos *in silico* foram realizados para identificar os sítios de ligação a quitina. Os efeitos tóxicos do calcofluor (ligante de quitina) também foram avaliados. Larvas sobreviventes ao calcofluor foram submetidas a dosagens de reservas e atividades de enzimas digestivas. A presença de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina foi investigada no transcriptoma de *C. maculatus*. Nossos resultados confirmaram que os tegumentos naturais impediram 100% a penetração larval. A análise de proteômica comparativa identificou 308 proteínas, sendo 156 presentes em ambos os tegumentos com níveis de expressão similares. Um total de 38 proteínas estavam aumentadas (UP) e 95 proteínas estavam diminuídas (DOWN) no tegumento de *C. ensiformis*, 7 proteínas estavam presentes unicamente em cada tegumento. Dentre as proteínas identificadas estão algumas relacionadas a defesa, como uréases, lipoxigenases, peptidases e quitinases. A presença de vicilinas e quitinases na fração retida em quitina de tegumentos de *C. ensiformis* foi confirmada por *Western blotting* e espectrometria de massas. A fração retida em quitina (1%) de ambos os tegumentos interferiu no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*. A fração rica em quitinase (FRQ) de *C. ensiformis* inibiu o desenvolvimento larval do inseto. Interações de vicilinas e quitinases com tetrâmero de *N*-acetilglicosamina e os sítios de ligação à quitina foram identificados. Calcofluor (1%) bloqueou 100% a eclosão larval enquanto 0,5% reduziu a massa larval. Nestas larvas foram observados aumentos na atividade das enzimáticas e outras biomoléculas. Transcritos para as enzimas quitina sintase, quitina desacetilase e quitinases foram identificados em todas as fases do ciclo de vida do inseto. Esses dados comprovam que o metabolismo de quitina está ativo desde as primeiras fases de desenvolvimento de *C. maculatus* e que proteínas que interferem nesse metabolismo tem potencial para o controle dessa praga.

**Palavras-chave:** Tegumentos; vicilinas; quitinases

## ABSTRACT

The seed coat is the external structure of the seed and is related to defense against aggressors, such as the insect *C. maculatus*. Studies have shown that the seed coat of *Canavalia ensiformis* blocked 100% the penetration of *C. maculatus* larvae and contain proteins that are toxic to insects. Therefore, the objective of this work was to evaluate the toxicity of seed coat of *C. ensiformis* and *Canavalia rosea* for *C. maculatus*, with emphasis on chitin binding proteins. The toxicity of natural seed coat to the insect was studied in artificial seed systems. For the identification of proteins, comparative proteomics was performed by mass spectrometry. Protein fractions were extracted from the seed coat by chitin affinity chromatography. Protein characterization was performed by SDS-PAGE, *Western blotting* and mass spectrometry. *In silico* studies were performed to identify chitin binding sites. The toxic effects of calcofluor (chitin binding) were also evaluated. Larvae that survived calcofluor were subjected to measurements of reserves and activities of digestive enzymes. The presence of transcripts related to chitin metabolism was investigated in the transcriptome of *C. maculatus*. Our results confirmed that natural seed coat prevented 100% larval penetration. Comparative proteomics analysis identified 308 proteins, 156 were present in both seed coat with similar expression levels. A total of 38 proteins were increased (UP) and 95 proteins were decreased (DOWN) in *C. ensiformis* seed coat, 7 proteins were uniquely present in each seed coat. Among the proteins identified are some related to defense, such as ureases, lipoxygenases, peptidases and chitinases. The presence of vicilins and chitinases in the *C. ensiformis* chitin binding fraction was confirmed by *Western blotting* and mass spectrometry. The chitin binding fraction (1%) from both seed coats interfered with the development of *C. maculatus* larvae. The *C. ensiformis* chitinase rich fraction (FRQ) inhibited the insect larval development. Interactions of vicilins and chitinases with N-acetylglucosamine tetramer and the chitin binding sites were identified. Calcofluor (1%) blocked 100% larval penetration, while 0.5% reduced larval mass. In these larvae, increases in the activity of enzymes and other biomolecules were observed. Transcripts for chitin synthase, chitin deacetylase and chitinase enzymes were identified at all stages of the insect's life cycle. These data showed that chitin metabolism is active from the earliest stages of *C. maculatus* development and that proteins that interfere in this metabolism have the potential to control this pest.

**Key words:** Vicilins; seed coat; chitinases.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sementes

As plantas com flores, como as angiospermas, acumularam uma extraordinária diversidade de espécies que englobam uma vasta gama morfológica, funcional e ecológica e constitui a base estrutural e energética da maioria dos ecossistemas terrestres atuais. A grande diversidade e abundância desse grupo permitiu uma rica cadeia de interações dentro dos níveis tróficos, possibilitando sua diversificação biológica (SCHNEIDER *et al.*, 2004). A ascensão das angiospermas ao poder ecológico é relacionada a ocorrência da dupla fecundação, resultando a formação do embrião e o do endosperma (LAFON-PLACETTE & KOHLER, 2014;). As sementes foram uma grande inovação no processo evolutivo das plantas vasculares, desempenhando um papel importante no sucesso de todas as plantas com sementes e, em especial no grupo das angiospermas (LINKIES *et al.*, 2010).

As sementes das angiospermas se desenvolvem a partir do óvulo fertilizado e é composta pelo tegumento, tecido de reserva (cotilédones ou endosperma) e o eixo embrionário e atribuem diversas funcionalidades específicas. O papel do tegumento é de suma importância pois protege o embrião do ambiente externo, representando a primeira barreira física e química das sementes contra o ambiente externo e agentes agressores (MOÍSE *et al.*, 2005). O tecido de reserva atua como reservatório de compostos químicos importantes para o crescimento do eixo embrionário, pode ser representado pelo endosperma e cotilédones, e é caracterizado por ser especialmente rico em três grupos de macromoléculas como proteínas, lipídeos e carboidratos (OLIVEIRA *et al.* 2001). O endosperma é o produto da fusão dos dois núcleos polares do óvulo no saco embrionário e um núcleo do gameta masculino (LAFON-PLACETTE & KOHLER, 2014;). O eixo embrionário é o resultado da fertilização da célula-ovo no saco embrionário por dois núcleos masculinos do tubo polínico (BRADFORD e NONOGAKI, 2009).

Leguminosae é considerada a terceira maior família de angiospermas, com 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS *et al.* 2005). As suas sementes se

destacam por desempenharem um papel muito importante nas dietas das populações globais. Cerca de 70% de todos os alimentos para o consumo humano vêm diretamente de sementes de leguminosas devido seu alto valor nutricional (MANSOOR E YUSUF, 2002). Há países na África, mas também na Ásia e na América Latina onde estas sementes contribuem em mais de 10% para a ingestão diária total de alimentos (AKIBODE E MAREDIA, 2011).

Essas sementes são conhecidas por possuírem altos níveis de carboidratos (50% a 65%), ricas em fibras solúveis e insolúveis (TOSH E YADA 2010), além de serem fontes de gorduras mono e poli-insaturadas e fornecem ainda proteínas à dieta, ricas em aminoácidos lisina (Lys) e baixos níveis de aminoácidos essenciais como metionina e triptofano (LOVEJOY, 2010). Em algumas leguminosas, por exemplo, as proteínas podem corresponder até 40% do peso seco de suas sementes (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002). Sendo assim, sementes de leguminosas são consideradas altamente valiosas para a alimentação humana, correspondendo à principal fonte de proteína no mundo em desenvolvimento (ASIF *et al.*, 2013). Como resultado de suas altas propriedades nutricionais, o consumo de leguminosas demonstrou ter efeitos benéficos na prevenção e gestão de obesidade e distúrbios relacionados, como doenças cardíacas, diabetes e síndrome metabólica (BAZZANO *et al* 2001; JENKINS *et al* 2012).

Entre as principais sementes de leguminosas com importância para a alimentação, se destacam os feijões, dentre os quais estão o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) que são importantes fontes de proteína, fibra dietética e minerais na dieta, ocupando um lugar mundial na alimentação humana. Dentre as principais moléculas nutricionais desses feijões estão as proteínas, como as globulinas (54-79%) e albuminas (12-30%), entretanto compostos antinutricionais como inibidores de protease e  $\alpha$ -amilase, lectinas e lipoxigenase (PUJOLÀ *et al.*, 2007) também estão presentes nessas sementes.

Devido a esses altos valores nutricionais e do maior crescimento da população mundial, há necessidades crescentes para a produção e cultivo de leguminosas nas próximas décadas. Por outro lado, existem diversos desafios enfrentados para o cultivo e produtividade de leguminosas que incluem fatores

genéticos, socioeconômicos e climáticos (KEBEDE *et al*, 2020). Além disso, há efeitos adversos do aquecimento global sobre a produtividade de leguminosas que vem diminuindo nas últimas décadas, apesar do crescimento das áreas cultivadas (KOROMA *et al.*, 2016). Um efeito desse fenômeno é o estresse biótico no campo e no armazenamento, causado por insetos praga, acarretando em impactos diretos na reprodução, desenvolvimento, sobrevivência e dispersão dessas sementes (PRAKASH *et al*, 2014).

## 1.2. Insetos-praga

O filo Arthropoda é destacado pela grande variedade de espécies e constitui cerca de 80% do Reino Animal. Além disso, esse filo possui diversos subfilos, sendo que no subfilo Hexapoda, a classe Insecta representa cerca de 83% de todo o filo Arthropoda (CHAPMAN, 2013; MARANHÃO, 1977). A grande diversidade de insetos parece ser reflexo da combinação de características vantajosas tais como: co-evolução com as plantas, miniaturização, voo e evolução dos genes de desenvolvimento em corpos segmentados e compartimentalizados (PANIZZI, A.R. PARRA, 1991).

O corpo desses insetos é formado por três tagmas: cabeça, torác e abdômen. A cabeça possui um número de três a sete segmentos fundidos, com um par de olhos compostos e até três ocelos simples com um par de antenas. O torác possui três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax e com um par de pernas em cada segmento torácico. As asas são denominadas anteriores e posteriores e são desenvolvidas apenas nos adultos. As asas anteriores são esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas, denominadas élitros, que cobrem as asas posteriores e o corpo (BRUSCA, R.C, BRUSCA, 2007). O abdômen contém em seu interior os aparelhos reprodutor, excretor, circulatório, nervoso e digestivo. Em relação ao último, há uma grande diversidade na dieta dos insetos e nas modificações que ocorreram com suas peças bucais para obter variados alimentos (ROCA, 2005).

Muitos insetos especializaram-se em uma dieta de líquidos que consiste em fluidos, animais e vegetais. Essa diferenciação alimentar e especialização em relação ao hábito alimentar foram acompanhados por uma evolução

concomitante das peças bucais, bem como a morfologia e fisiologia intestinal (NATION 2008; CHAPMAN 2013). Portanto, as estruturas dos tratos digestivos e processos digestivos se diferem entre os diferentes insetos (TERRA; CRISTOFOLETTI, 1996; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003). Na maioria dos insetos, o intestino é dividido em intestino anterior, médio e posterior. (CHAPMAN, 2013). O intestino médio é considerado o centro do canal alimentar, uma vez que, é nesse compartimento onde é realizado a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes (NATION *et al.*, 2008; CHAPMAN, 2013).

A membrana peritrófica ou matriz peritrófica (MP) é uma matriz fina, porosa e acelular que se encontra no lúmen ao longo do epitélio do intestino médio, formando um tubo dentro do trato digestivo que envolve o bolo alimentar (ROCA, 2005). A presença da MP divide o lúmen em compartimentos; o espaço dentro do intestino médio e do PM é denominado espaço endoperitrófico, enquanto a área entre as células do intestino médio e o PM é denominado espaço ectoperitrófico (MERZENDORFER *et al.*, 2016). Geralmente tem como função desempenhar papéis importantes na proteção das células epiteliais do intestino médio de patógenos e partículas de alimentos e/ou na formação de compartimentos necessário nos processos digestivos (HEGEDUS *et al.*, 2009; Bolognesi *et al.*, 2008). A MP também é considerada a primeira barreira para proteger os compostos de toxinas de atingirem o intestino médio e o corpo do inseto.

Além disso, a composição química da MP é formada majoritariamente por quitina, proteínas, glicoproteínas e peptidoglicanos (WANG E GRANADOS, 2001; LIU *et al.*, 2019). Normalmente, a quitina é responsável por aproximadamente 3-13% e a parte proteica (proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos) representa 20-55% da massa total da MP (DE METS E JEUNIAUX, 1962; ZIMMERMANN *et al.*, 1975). As proteínas são os principais componentes da MP na maioria dos insetos que têm sido examinada (LEHANE, 1997). Essas proteínas são compostas principalmente por peritrofinas (ou proteínas de matriz/membrana – PMP's) e proteínas com uma ou mais proteínas de quitina domínios de ligação de peritrofina-A (CBD's). Essas proteínas são responsáveis por organizar as fibrilas de quitina, permitindo a formação da MP (TETREAU *et al.*, 2015).

Em alguns insetos praga, a matriz peritrófica clássica no intestino médio, foi substituída por um gel peritrófico (GP) e a presença de quitina nesta estrutura já foi confirmada (TERRA *et al.*, 2001). Devido às importantes funções relacionadas a MP e GP, algumas defesas de plantas com um importante potencial de danificar essas estruturas, como proteínas que se ligam a quitina como quitinases e outras, podem interferir no desenvolvimento ou causar a morte desses insetos praga na agricultura (PAES *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2003).

Muitos desses insetos praga são mastigadores ou sugadores de várias ordens são predadores de leguminosas. Alguns destes insetos se tornaram especializados em predação de sementes, como os gorgulhos da família Bruchidae, da ordem Coleoptera (SANTOS *et al.*, 1977). Esses insetos praga são conhecidos por danificarem estruturas morfológicas, reduzindo reservas de nutrição, e comprometendo o armazenamento e a comercialização de grãos armazenados (CREDLAND, 2003). Essas pragas sempre foram uma das principais restrições bióticas para as leguminosas, e causam consideráveis prejuízos econômicos. A infestação desses insetos praga tem um impacto direto na produção de alimentos agrícolas e produtos armazenados, pois podem representar 20 a 30% da perda de produção e, em casos graves, causam perda total (DE GEYTER, LAMBERT, GEELLEN & SMAGGHE, 2012).

Esses insetos praga de grãos armazenados podem ser classificados como pragas primárias e secundárias. As primárias rompem a parede externa dos grãos íntegros (tegumento) e atingem o tecido de reserva. Podem se alimentar também da parte interna após o rompimento da externa ou tanto completar seu ciclo no interior dos grãos ou se alimentam da parte externa do grão, como é o caso de insetos como *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Entretanto, as pragas secundárias, se desenvolvem na parte externa dos grãos, aproveitando-se de danos, causados anteriormente nas sementes, para atacá-los (LORINI *et al.*, 2015).

Entre essas pragas de armazenamento, os bruquídeos se destacam sendo responsáveis pelas perdas mais severas no rendimento de grãos (TSIALTAS; IRAKLI; LAZARIDOU, 2018). Cerca de 600 espécies de insetos atacam grãos armazenados e entre estas, cerca de 100 espécies causaram

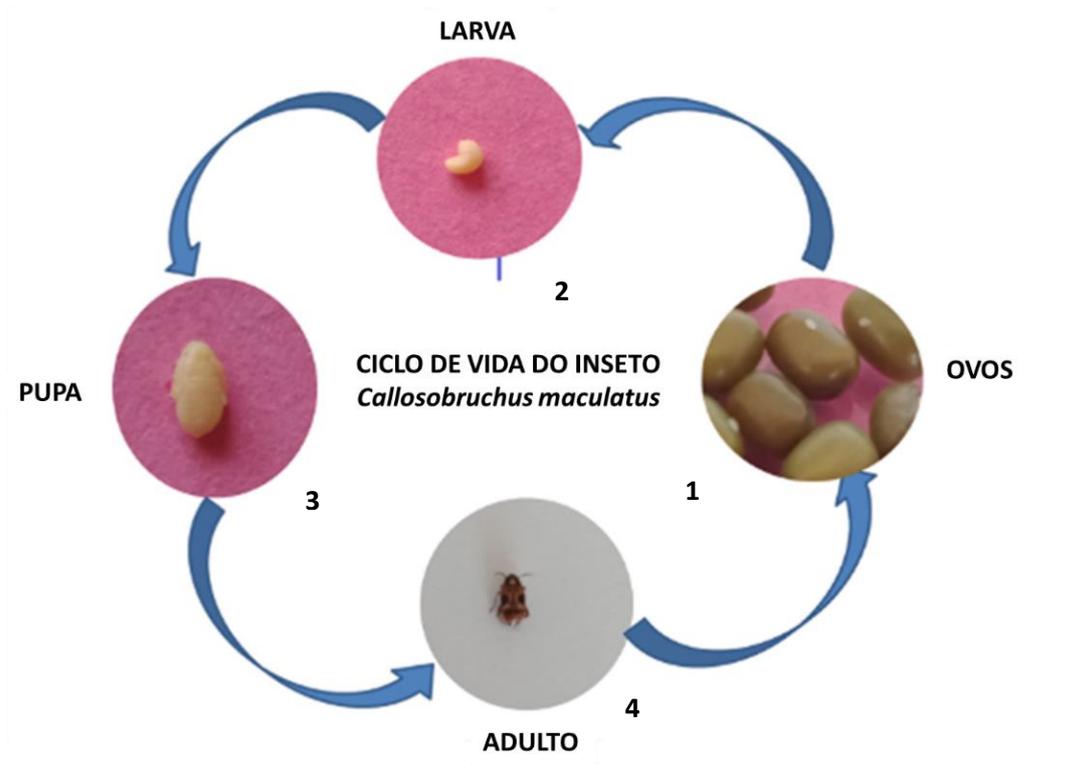
perdas econômicas em grãos armazenados (NEETHIRAJAN *et al.*, 2007). Entre essas espécies, se destacam *C. maculatus* e *C. chinensis* sendo os insetos praga primários que mais causam danos durante o armazenamento do feijão caupi, grão de bico e erva doce (ITURRALDE-GARCÍA *et al.*, 2016; BANGA *et al.*, 2018). Em especial, o bruquideo *C. maculatus*, destaca-se como a principal praga dos grãos armazenados de *Vigna unguiculata*, popularmente conhecido como feijão-de-corda, podendo comprometer até 90% do estoque entre três a seis meses de armazenamento (ONYIDO *et al.*, 2011).

### 1.2.1 *Callosobruchus maculatus*

A espécie *C. maculatus* participa dessa subfamília dos bruquídeos e é conhecida como o “gorgulho-do-feijão” e é a principal praga da semente do feijão-de-corda, espécie *V. unguiculata*. Esses insetos atacam esses grãos de feijão durante o armazenamento, prejudicando as reservas nutritivas dessas sementes. O desenvolvimento das larvas desse inseto pode levar à redução de cerca de 20% do peso da semente. A infestação das sementes de *V. unguiculata* por esse inseto pode causar perdas de até 37% da produção (SOUZA *et al.*, 2005).

As fêmeas adultas desse inseto ovopositam na superfície externa do feijão ou seja, no tegumento. Os ovos individuais podem medir 0,75 mm de comprimento e tem aparência ovais e fusiformes de aspecto claro, brilhante e firmemente aderido à superfície do grão. O desenvolvimento embrionário acontece entre 5 a 6 dias após a oviposição (BECK E BLUMER, 2011). A larva eclode e atravessa o tegumento da semente, entrando em contato com o endosperma (cotilédone). Uma vez que houve a eclosão larval, a aparência do ovo torna-se branco opaco. A larva então se alimenta do cotilédone e será o local aonde irá completar seu ciclo de vida 25 a 30 dias após a oviposição (DE SÁ *et al.*, 2014). Entre 24 e 36 horas após a emergência dos adultos, eles se tornam maduros. Os adultos podem sobreviver em média de 12 a 14 dias, onde pode ocorrer o acasalamento e posterior *oviposição* (Figura 1). Existem diferenças morfológicas que podem ser distinguidas nas fêmeas como a presença listras

escuras em cada lado do dorsal posterior do abdômen, característica não encontrada nos machos dessa espécie.



**Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do inseto *C. maculatus*.** 1- Deposição de ovos sobre o tegumento das sementes e desenvolvimento embrionário no interior do ovo; 2-Fase larval do inseto; 3 - Formação de pupa; 4-Emergência dos adultos do inseto. Adaptada de KALPNA *et al.*, 2022.

As sementes infestadas e danificadas tornam-se perfuradas e levam à perda de peso da semente. Os insetos adultos emergem após a conclusão do ciclo de crescimento larval-pupa (Figura 1). Ao decorrer do armazenamento, o inseto *C. maculatus* ataca as sementes, causando perdas significativas como é o caso do feijão-fradinho (PARK *et al.*, 2003; SANON *et al.*, 2010; ADEDIRE *et al.*, 2011). Sementes infestadas por *C. maculatus* além de diminuir de massa, tem ainda comprometido seus valores nutricionais, seu potencial germinativo e perdas nos valores de venda (MURAD *et al.*, 2006).

Como solução para o controle dessas pragas na agricultura, o uso de pesticidas tem sido o principal método para o controle de pragas desde 1960 (KUMAR E SINGH, 2015). Apesar desse método ser bem sucedido para conter essas pragas, possuem diversas desvantagens como contaminação do meio ambiente, impacto na saúde humana principalmente do agricultor e resistências de insetos praga. Como forma de atenuar os danos causados pela utilização de pesticidas, métodos alternativos para o controle de *C. maculatus* tem sido estudados (BADII *et al.*, 2014). Esses métodos naturais podem ser produzidos por outros organismos geralmente para sua própria defesa, ou são derivados de uma fonte natural, como animais, bactérias, e certos minerais e plantas.

### **1.3 Mecanismos de defesa de sementes**

Ao longo dos tempos, as plantas puderam desenvolver sofisticados mecanismos de defesa específicos contra as várias formas de estresses abióticos e bióticos. Nesse sentido, os vegetais conseguem alterar o plano de desenvolvimento e contornar situações desfavoráveis, como os ataques de pragas ou patógenos, bem como fatores abióticos desfavoráveis (YURELA *et al.*, 2015; AGRIOS *et al.*, 1997). A interação inseto-sementes apresenta grandes implicações para a ecologia e os processos evolutivos. O mecanismo de defesa de plantas contra patógenos e herbívoros envolve variedades de respostas. Enquanto os insetos vêm se adaptando para explorar seus hospedeiros, as plantas desenvolveram simultaneamente sistemas defensivos para neutralizar o ataque de herbívoros (ANDERSON E MITCHELL-OLDS, 2011; JOHNSON, 2011).

Os mecanismos de defesa das plantas se expressam como defesas constitutivas ou induzidas, podendo ter ação direta ou indireta sobre o agressor, como os insetos (KARBAN; BALDWIN, 1997). As defesas induzidas são a produção de compostos tóxicos pelas plantas devido ao ataque de herbívoros. As defesas induzidas podem ser classificadas ainda como induzidas localizada e induzidas sistêmicas. As defesas induzidas localizadas se referem a ativação da defesa no local exato que ocorreu a lesão. Por outro lado, as defesas induzidas sistêmicas, defendem as demais partes das plantas contra os ataques

(BROEKGAARDEN *et al.*, 2011). Outro tipo de mecanismo de defesa é a defesa constitutiva que define-se como compostos tóxicos ou estruturas morfológicas já presentes no desenvolvimento da planta (MACEDO *et al.*, 1993; SILVA; XAVIER-FILHO 1993; AGRAWAL, 1999).

Essas defesas constitutivas podem ser físicas ou químicas presentes na planta que interferem diretamente na capacidade de desenvolvimento do agressor. Para insetos, por exemplo, destaca-se a interferência na oviposição, penetração ou desenvolvimento do herbívoro (SCHOONHOVEN *et al.*, 2005). Essas defesas podem ser classificadas como antinutricionais e tóxicas. As defesas antinutricionais limitam o suprimento de alimentos, o que leva a uma redução na ingestão e no valor nutricional do mesmo, seja pela eliminação de nutrientes essenciais e/ou inibição da ingestão (CHEN *et al.*, 2008). As defesas constitutivas tóxicas, as plantas produzem compostos, como exemplo peptídeos e proteínas, como moléculas de defesa contra o ataque de insetos, que induz danos físicos e alterações nos insetos (CHEN *et al.*, 2007; TANJI *et al.*, 2006). As sementes quiescentes, por estarem em pausa metabólica, apresentam apenas defesas constitutivas, sejam elas químicas ou físicas.

### **1.3.1. Tegumento de sementes como barreira de defesa**

O tegumento é o primeiro tecido da espécie hospedeira ou não hospedeira contatado pelos agentes agressores como os bruquídeos (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Esse tecido desempenha um papel crucial no ciclo de vida das plantas, controlando o desenvolvimento do embrião e determinando a dormência e a germinação das sementes (MOISE *et al.*, 2005). Entre as principais funções do tegumento estão a preservação da integridade das partes da semente, regulação das trocas aquosas e gasosas entre o embrião e o meio externo, dispersão de algumas sementes e proteção do embrião contra danos mecânicos e ataques de pragas e patógenos (ZENG *et al.*, 2004).

A participação do tegumento nesses mecanismos de defesa das sementes sempre esteve relacionada à sua dureza e principalmente espessura. Estudos sugeriram que a presença de fatores bioquímicos em tegumentos de sementes

de variedades resistentes de feijão-fradinho que seriam independentemente da textura do revestimento, que causaram redução na oviposição e na sobrevivência de ovos de alguns bruquídeos (LALE E KOLO *et al.*, 1998). Tegumentos artificiais confeccionados com farinha de tegumentos de *P. vulgaris* reduziram a infestação e desenvolvimento de *C. maculatus* (DE SÁ *et al.*, 2014). Outros estudos mostraram que sementes de 73 espécies diferentes infestadas pelo inseto *C. maculatus*, indicaram a participação de compostos químicos, como proteínas do tegumento, nos mecanismos de resistência dessas sementes (JANZER, 1977). Em tegumentos dos 14 genótipos de *Vicia faba*, apenas 45 a 58% das larvas dos insetos *C. chinensis* e *C. maculatus* conseguiram atravessar os tegumentos ou morreram ao tentar perfura-lo (BOUGHADAD *et al.*, 1986, DESROCHES *et al.*, 1995).

Souza *et al* (2011) estudando as propriedades tóxicas de vários tegumentos mostraram que para algumas sementes esse tecido interrompe em 100% a penetração das larvas de *C. maculatus*. Tegumentos das sementes de *Albizia lebbek* também foram tóxicos ao inseto *C. maculatus*, afetando principalmente a fase larval do inseto. As concentrações de 2% e 3% da farinha desse tegumento causaram níveis de mortalidade larval de 91,6 % e 100% respectivamente. Do tegumento, foi isolada uma protease cisteínica da superfamília C1, com 100% de identidade com uma protease de *Jacaratia mexicana* e 78,5% de identidade com proteases cisteínicas de soja. A toxicidade dessa protease também foi relacionada com a propriedades de ligação à quitina no intestino das larvas de *C. maculatus*. (SILVA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, Silva *et al* (2018), mostrou a presença de uma quitinase no tegumento de soja (*Glycine max*) que foi tóxica para *C. maculatus*. Tegumentos artificiais confeccionados com farinha de tegumentos de *Phaseolus vulgaris* reduziram a infestação e desenvolvimento de *C. maculatus*, indicando que a interferência desses tegumentos com a infestação não está relacionada com aspectos físicos deste tecido. O desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* em sementes de *P. vulgaris* foi seguido por cinco dias e não apresentou alterações morfológicas quando comparados com desenvolvimento embrionário em tegumento da semente de *V. unguiculata*, mostrando que esse tegumento interfere e na fase larval do inseto (DE SÁ *et al.*, 2014).

Outro estudo mostrou que o tegumento de *C. ensiformis* impediu em 100% a penetração das larvas de *C. maculatus*. Embora o embrião tenha se formado sem alterações morfológicas aparentes, a larva sobrevivente apresentou drástica redução da massa corporal, diminuição dos níveis de proteínas, glicose, glicogênio, triacilglicerois e baixa atividade das enzimas digestivas (DE SÁ *et al.*, 2018).

### 1.3.2. Proteínas tóxicas de sementes para o inseto-praga

As plantas interagem com insetos há centenas de milhões de anos, levando a abordagens de defesa complexas. Durante esse tempo, elas desenvolveram interações refinadas que afetam os organismos em todos os níveis, desde os níveis bioquímicos básicos até os níveis de genética populacional. Algumas dessas relações são mutuamente benéficas, como a polinização, mas a maioria das interações envolve predação de plantas por insetos e defesa das plantas contra insetos herbívoros (SCHALLER *et al.*, 2008). Essa co-evolução de plantas e insetos herbívoros resultou na seleção de plantas que possuem os melhores arsenais de biomoléculas defensivas produzidas em resposta à agressão. Assim, as plantas podem fornecer alternativas potenciais ao controle de insetos (AGRIOS *et al.* 1997).

Dentre essas biomoléculas com potencial de defesa de sementes, destacam-se as proteínas de defesa como as lectinas, proteínas do tipo lectina (arcelinas [Arc], inibidores de  $\alpha$ -amilase [ $\alpha$ AI]), inibidores de proteinase, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPS), vicilinas, quitinases, entre outras (SHEWRY *et al.*, 1995, SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.* 2002).

#### Lectinas

As lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que lhes permitem reconhecer seletivamente e se ligar reversivelmente a açúcares especificamente livres (monossacarídeos) ou oligossacarídeos. Em leguminosas, o papel das lectinas é considerado um modelo para eventos de reconhecimento proteína-glicídio. Isto ocorre devido à sua fácil purificação e também a uma ampla especificidade para resíduos de glicídios, mesmo mantendo uma grande conservação de sequência (LIS E SHARON, 1990). Além

disso, comportam-se como proteínas de armazenamento, algumas plantas acumulam parte de sua reserva de nitrogênio como proteína de ligação a carboidratos. Várias lectinas de leguminosas podem se ligar a diversos açúcares como galactose, N-acetilgalactosamina, manose, glicose, N-acetilglucosamina (GlcNAc), ou a carboidratos mais complexos. As lectinas mais comuns possuem dois ou quatro subunidades, com pesos moleculares aproximados entre 25-30 kDa por subunidade (ABHILASH *et al.*, 2013). As lectinas que se ligam a quitina contêm um ou mais domínios de ligação a quitina, denominados domínio do tipo heveína, região composta por 43 aminoácidos (DIAZ *et al.* 1999). Estudos comprovaram o efeito tóxico das lectinas sobre o desenvolvimento de bruquídeos (OSBORN *et al.* 1988; MURDOCK *et al.* 1990). Essas proteínas quando ingeridas interagem com proteínas glicosiladas das células intestinais, ou ainda a quitina da membrana peritrófica, causando efeitos antinutricionais, sendo tóxica para larvas dos insetos que as consomem (MICHIELS *et al.*, 2010; UPADHYAY E SINGH, 2012; AL ATALAH *et al.*, 2014). Adicionalmente, essas proteínas tem a propriedade de atravessar a barreira intestinal dos insetos e alcançar à hemolinfa, causando diversos efeitos sistêmicos (PAIVA *et al.*, 2013).

### **Inibidores de $\alpha$ -amilases**

As  $\alpha$ -amilases são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases, as quais catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas têm um papel importante no metabolismo dos carboidratos em plantas, animais e outros organismos (FRANCO *et al.*, 2000). Em insetos, essas enzimas participam no desenvolvimento e na sobrevivência de larvas e adultos. Uma vez que essa enzima é inibida, a assimilação de nutrientes pelo inseto é reduzida, e conseqüentemente seu desenvolvimento é afetado. Foi demonstrada a presença de dois inibidores de  $\alpha$ -amilase conhecidos como:  $\alpha$ -AI 1 e  $\alpha$ -AI2 em feijões de diversas espécies, que diferem em suas especificidades contra diferentes amilases. O  $\alpha$ -AI-1, encontrado na maioria das variedades cultivadas de feijão comum, inibe as  $\alpha$ -amilases de mamíferos, como a amilase pancreática porcina (PPA) e as  $\alpha$ -amilases larvais dos insetos *C. chinensis*, *C. maculatus* e *B. pisorum* (ISHIMOTO *et al.*, 1996). Presume-se, portanto que o efeito tóxico do  $\alpha$ -AI-1 em pragas seja causado pela inibição de amilases digestivas (ISHIMOTO

*et al.*, 1996). O fato de *C. maculatus* não se desenvolver em sementes do feijão comum tem sido atribuído à presença desse inibidor de  $\alpha$ -amilase presente nos grãos cultivados (ISHIMOTO E KITAMURA, 1989; ISHIMOTO E CHRISPEELS, 1996, GROSSI-DE-SÁ, 1997). Concentrações de 0,5% e 1,0% de inibidores de  $\alpha$ -amilase de *Carica papaya* foram capazes de aumentar em 50% a mortalidade e também diminuir a fecundidade dos insetos e a longevidade dos adultos do inseto *C. maculatus* (FARIA *et al.*, 2007)

### **Arcelinas**

As arcelinas, assim como os inibidores de  $\alpha$ -amilases, pertencem a família das lectinas, podendo ter atividade de lectina fraca (OSBORN *et al.*, 1988). Uma análise de difração de raios X mostrou que as moléculas de arcelina-1 formam um dímero semelhante à lectina (MOUREY *et al.*, 1997). O epitélio do trato digestivo de insetos são possíveis alvos de lectinas de plantas e de proteínas do tipo lectina como as arcelinas (PEUMANS E DAMME, 1995). Estudos de Febres *et al.*, (1998), propuseram que os glicanos ligados a Asn de arcelina-1 são responsáveis por sua ligação específica no trato digestivo, responsável por sua toxicidade. Segundo PAES *et al* (2000), foram encontradas arcelinas na hemolinfa do inseto *Z. subfasciatus*, evidenciando que essas proteínas atravessaram as células epiteliais do trato intestinal. Outros estudos mostraram que a arcelina possui atividade inseticida efetiva contra outros bruquídeos e é encontrada em vários genótipos de *P. vulgaris* (MIRKOV *et al.*, 1994).

### **Proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's)**

RIP's são enzimas citotóxicas de atividade de rRNA N-glicosidase que inibe ribossomos de eucariotos (PEUMANS *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2018; MOREIRA *et al.*, 1991). Elas reconhecem uma sequência de nucleotídeos conservada de 23S rRNA de ribossomos 70S e removem um resíduo de adenina dela. Elas também podem remover adenina dos ribossomos 28S rRNA de células animais (PEUMANS *et al.*, 2001). Existem pelo menos três grupos de proteínas RIP's: RIP'S tipo 1, 2 e 3 (ENDO E TSURUGI, 1987, ENDO *et al.*, 1988). A proteína ricina se destaca dentro do grupo RIP's tipo 2, e são

encontradas em diversas famílias de plantas como em Fabaceae (GIRBER *et al* 2004).

Muitos estudos sugeriram que os RIP's possuem atividade inseticida sobre diferentes insetos, como Lepidoptera (DOWD *et al.*, 1998 , 2003 , 2006 ; ZHOU *et al.*, 2000), Coleoptera (GATEHOUSE *et al.* , 1990 ; KUMAR *et al.*, 1993 ) e Diptera (SHAHIDI-Noghabi *et al.*, 2008). Por exemplo, uma dieta artificial suplementada com diferentes concentrações de uma RIP tipo II de *Sambucus nigra*, diminuiu a fecundidade e a sobrevivência de *Acyrtosiphon pisum* ( SHAHIDI-NOGHABI *et al.*, 2008).

### **Vicilinas**

As vicilinas, também conhecidas como globulinas de armazenamento 7S, são geralmente proteínas triméricas sem ligações dissulfeto e têm graus variáveis de glicosilação (SHUTOV *et al.*, 1995). As subunidades das vicilinas que se agregam para formar trímeros tem massas moleculares variadas entre 45–53 kDa. As vicilinas são proteínas multifuncionais e são descritas como funções de fonte de energia gerando aminoácidos durante a germinação, bem como proteínas de defesa contra fungos e insetos-praga (CÂNDIDO *et al.*, 2011; MACEDO *et al.*, 1993).

A observação de que as vicilinas de leguminosas se ligam a uma matriz de quitina levou à descoberta de que as vicilinas, do caupi e de outras leguminosas, se ligam fortemente a várias estruturas contendo quitina. Entre essas estão estruturas do intestino médio de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (MACEDO *et al*, 1993; FIRMINO *et al.*, 1996) e paredes celulares ou membranas plasmáticas de fungos filamentosos e leveduras (GOMES *et al.*, 1998).

Vicilinas isoladas de sementes de feijão-caupi resistentes a *C. maculatus* e de várias outras leguminosas, retardam o desenvolvimento larval deste inseto (YUNES *et al.*, 1998). Investigações químicas e imunológicas mostraram que essas estruturas do intestino médio nas quais as vicilinas se ligam, são estruturas quitinosas (SALES *et al.*, 2001;). Sales *et al.*, (2001), relataram que vicilinas de sementes de feijão-caupi, resistentes a infestação por *C. maculatus*, também foram mais resistentes à digestão, quando comparadas com as vicilinas de sementes de feijão-caupi susceptíveis. Esses autores sugeriram que os

efeitos antimetabólicos das vicilinas do feijão-caupi resistente podem estar relacionados com as baixas taxas de digestão e/ou a sua associação com estruturas contendo quitina do intestino médio do inseto, resultando no comprometimento da absorção de nutrientes pelas células do intestino médio e uma menor taxa de desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* em sementes de *V. unguiculata* IT81D-1045.

Estudos de Oliveira *et al.*, (2014), larvas alimentadas com vicilinas de sementes resistentes e vicilinas de sementes não resistentes mostraram que as vicilinas das sementes resistentes se acumulam na superfície do epitélio do intestino médio das larvas, sugerindo que os efeitos tóxicos estão associados à interferência na fisiologia normal, afetando o desenvolvimento larval do inseto *C. maculatus*. Ferreira *et al.*, (2021) mostraram que frações ricas em vicilinas derivadas de um genótipo de feijão-caupi resistente (cv. BRS Xiquexique) tem uma forte capacidade de ligação à quitina e toxicidade ao bruquídeo *C. maculatus*.

### **Quitinases**

As quitinases são glicosil hidrolases (GH) que possuem massas moleculares que variam de 20 a 90 kDa e estão envolvidas na quebra das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas da quitina, um polímero da 1,4-N-acetil-D-glucosamina (KUMAR *et al.*, 2018). A maioria das quitinases vegetais são endoquitinases, que cortam aleatoriamente dentro do polímero de quitina. Por outro lado, as exoquitinases quebram ligações na extremidade não redutora da cadeia de quitina (COLLINGE *et al.*, 1993; SAHAI E MANOCHA, 1993; KASPRZEWSKA, 2003). As quitinases são classificadas em três principais famílias de glicosil hidrolases: GH 18, 19, e 20, e seis classes: Classe I a VI. A família GH 18 envolve principalmente quitinases das classes III e V que são encontradas em quase todos os tipos de organismos como bactérias, vírus, fungos e animais. Por outro lado, a família GH 19 envolve as classes I, II e IV que são quitinases exclusivamente vegetais. A Classe I, contém um domínio catalítico em sua extremidade N-terminal, possui massa molecular de 33 kDa e apresenta atividade antifúngica. As da classe II, com massa molecular de

aproximadamente 28 kDa, são encontrados em abundância em cotilédones e não apresenta atividade antifúngica considerável. Tanto a classe III quanto a IV, apresentam atividade de lisoenzimas (CHEN *et al.*, 1996; PATEL *et al.*, 2010). As quitinases produzidas por uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e outros animais, tem funções como nutrição, morfogênese e defesa contra organismos que possuem estruturas contendo quitina (ADRANGI *et al.*, 2010).

Em plantas, as quitinases são induzidas em respostas de defesa contra o estresse abiótico e biótico ou são expressas constitutivamente em órgãos vegetais, como sementes e são conhecidas por possuírem toxicidade bem caracterizada para microrganismos e insetos (TAIRA *et al.*, 2002; KABIR *et al.*, 2016). Uma quitinase isolada de sementes de *V. unguiculata* apresentou toxicidade para o inseto *C. maculatus* e para fungos patogênicos, como *Colletotrichum lindemuthianum* e *C. musae* (GOMES *et al.*, 1996). Outro estudo revelou que uma quitinase encontrada em tegumento de sementes quiescentes de soja (*Glycine max*) foi tóxica para o inseto *C. maculatus* quando incorporada tanto em cotilédones como em tegumentos artificiais, mostrando seu papel de defesa em ambos os tecidos (SILVA *et al.*, 2018). Portanto, as quitinases apresentam grande potencial inseticida e tem apresentando efeitos fundamentais para evitar o ataque dessas pragas (SINGH E ARYA, 2019; JALIL *et al.*, 2015).

#### **1.4 *Canavalia rosea***

O gênero *Canavalia* pertence à família Fabaceae que compreende 52 espécies, sendo que a maioria estão distribuídos nos Neotrópicos. Dentro desse gênero, a *C. rosea* é a única espécie pantropical que são muito abundantes na em praias e dunas costeiras sendo tolerantes à salinidade do solo e soterramento (BEYRA-MATOS *et al.*, 2004; GALLEGOS-FERNANDEZ E MARTINEZ, 2011). No Brasil, é encontrada em cidades litorâneas das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste e em ilhas oceânicas, como Fernando de Noronha e Trindade. Aparece nos domínios fitogeográficos da Amazônia e Mata Atlântica (BFG, 2015; SNAK, 2020).

Essa espécie é considerada uma colonizadora de sucesso porque as plantas individuais produzem propágulos abundantes que são amplamente dispersos pelo mar para novos habitats. Suas hastes são pubescentes com pêlos brancos quando jovens e depois glabros. O caule é espesso e pode crescer até 10 cm ou mais de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Além disso, o caule é bastante lenhoso na base e os ramos se irradiam formando tapetes verdes. Essa planta é capaz de trepar até 2 m de altura sobre uma outra vegetação. Suas sementes, elas são ejetadas com grande força das vagens. Uma vez na areia, as sementes podem então ser dispersas por grandes distâncias pelo oceano (VATANPARAST *et al.*, 2011). As sementes são flutuantes e podem germinar e iniciar o processo de colonização ao atingir novas margens (GROSS *et al.*, 1993).

Sementes de feijão-da-praia são consumidas tanto por humanos e animais e são uma importante fonte de alimentação proteína na África Ocidental e na Nigéria, onde é amplamente cultivada (ABBEY E IBEH, 1987). Suas sementes fornecem uma fonte alternativa de alimento por possuírem elevados níveis de proteínas, aminoácidos essenciais e baixos níveis de fatores 19 antinutricionais. A concentração de proteínas *C. rosea* foi maior do que outras *Canavalia* e outras leguminosas silvestres da Índia (GROSS *et al.*, 1993). Entre as verdadeiras proteínas (29,3%), globulinas (18,7%) foram os maiores quantidades (BEENA *et al.*, 2001). Essa semente é pouco estudada quanto a seus efeitos inseticidas, sendo assim de extrema importância o aprofundamento dessa área de estudo.

### **1.5 *Canavalia ensiformis***

A *Canavalia ensiformis* é conhecida popularmente como feijão-de-porco ou “jack bean” em inglês e é bastante distribuída e cultivada em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo como na África, Ásia, Índia e na América Latina. Pertencente à família Fabacea, é uma espécie anual ou bianual, herbácea, rústica, rasteira, apresentando um crescimento ereto podendo atingir até 1,2 m de altura. O sistema radicular possui raízes longas e profundas que permitem-lhes resistir a condições muito secas (MOLINA *et al.*, 1973). As folhas

são trifolioladas com pequenos tricomas e pecíolos geralmente mais longos que os folíolos. As estípulas estão presentes e os folhetos são ovais, arredondados na base e no ápice terminal. As flores têm 2 a 2,5 cm de comprimento e o cálice tem 2 lobos superiores e 3 lobos inferiores menores (PURSEGLOVE, 1981).

Suas sementes se encontram em vagens lenhosas que podem medir até 30 cm de comprimento e 2,5 de diâmetro. Essas vagens apresentam uma cor castanho claro quando maduras. Os cotilédones são cobertos por um tegumento espesso que chega a formar 14,4% da semente (MOLINA *et al.*, 1973). Em comparação com a maioria das leguminosas, as sementes de *C. ensiformis* são muito grandes, pesando em média cerca de 1,84 g. Já seu cotilédono pode chegar até 89,1% do peso total da semente (BRESSANI *et al.*, 1983).

Tal como acontece com várias outras leguminosas tropicais, tanto a folhagem quanto a semente dessas leguminosas possuem vários constituintes tóxicos ou antinutricionais com potenciais de defesa contra insetos praga. Trabalho realizado pelo nosso grupo identificou, nos tegumentos de *C. ensiformis*, proteínas envolvidas com o mecanismo de defesa dessa semente contra o ataque de *C. maculatus* (OLIVEIRA *et al.*, 1999). A canatoxina, uma proteína tóxica isolada de sementes de *C. ensiformis* exibiu propriedade inseticida para os insetos como barbeiro *Rhodnius prolixus*, o percevejo verde da soja *Nezara viridula* e gorgulho do feijão-caupi *C. maculatus* (CARLINI *et al.*, 2002; STANISCUASKI *et al.*, 2005). Outro estudo mostrou que o tegumento de *C. ensiformis* impediu 100% a penetração das larvas de *C. maculatus*, embora o embrião tenha se formado sem alterações morfológicas aparentes, a larva sobrevivente apresentou drástica redução da massa corporal, diminuição dos níveis de proteínas, glicose, glicogênio, triacilgliceróis e baixa atividade das enzimas digestivas (DE SÁ *et al.*, 2018). Outros trabalhos realizados pelo nosso grupo têm mostrado que os tegumentos de sementes podem ser fontes de proteínas tóxicas para insetos, incluindo proteínas com afinidade a quitina (SOUZA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Por serem espécies não domesticadas, e conseqüentemente não terem passado por processos de co-evolução contínuo com o inseto *C. maculatus*, as sementes do gênero *Canavalia*, podem ser uma importante fonte de proteínas tóxicas, com potencial para o controle e manejo dessa praga. Assim nesse

trabalho foram estudados tegumentos de duas espécies desse gênero, *C. ensiformis* e *C. rosea*.

## 2. OBJETIVOS

Estudar a toxicidade dos tegumentos de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia rosea* para o inseto *Callosobruchus maculatus*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos tegumentos naturais de *C. ensiformis* e *C. rosea* sobre desenvolvimento do inseto *C. maculatus*;
- Identificar, por proteômica comparativa, as proteínas presentes nos tegumentos das sementes;
- Isolar e caracterizar as proteínas com afinidade a quitina dos tegumentos das sementes;
- Analisar a toxicidade das proteínas com afinidade a quitina sobre o desenvolvimento do inseto *C. maculatus*;
- Identificar a presença de vicilinas e quitinases nas frações retidas em quitina isoladas dos tegumentos de *C. ensiformis*;
- Avaliar a toxicidade do composto calcofluor (inibidor da síntese de quitina) para o inseto *C. maculatus*;
- Identificar a presença de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina no transcriptoma de embriões, larvas, pupas e adultos de *C. maculatus*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Material Vegetal

As sementes de *C. ensiformis* foram obtidas de plantios realizados pelo nosso grupo, no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, a partir de matrizes obtidas na Universidade Federal do Ceará. As sementes foram armazenadas em freezer a -20°C até a utilização.

As sementes de *C. rosea* foram coletadas no litoral da Praia de Manginhos, São Francisco do Itabapoana, RJ. Todas as sementes foram acondicionadas em frascos de vidro, fechados e mantidos à temperatura de -70 °C. As sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho) foram obtidas comercialmente no mercado central da Cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

#### 3.2. Insetos

O inseto *C. maculatus* foi obtido a partir de uma colônia, mantida no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

A colônia de insetos foi produzida através da infestação de sementes de *V. unguiculata* (cv. fradinho) com fêmeas de dois dias de idade, durante o período 24h. As sementes são mantidas em frascos de vidro transparente com tampas furadas em câmaras de crescimento do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), à temperatura de 28°C e umidade relativa de 65%. Os insetos emergidos em cada ciclo são usados para a infestação de novas sementes para a manutenção da colônia e para a infestação das sementes artificiais.

### **3.3. Confeção de sementes artificiais com tegumentos naturais de *C. ensiformis* e *C. rosea***

Sementes artificiais contendo tegumentos íntegros de *C. ensiformis* e *C. rosea* foram confeccionadas segundo metodologia descrita por De Sá *et al.* (2014). Os cotilédones artificiais foram confeccionados utilizando 400 mg de farinha de cotilédones de *V. unguiculata* (feijão-fradinho). O pedaço de tegumento natural foi colocado na parte inferior de um molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm), sendo recoberto pelos 400 mg da farinha de fradinho. A semente foi prensada utilizando-se uma prensa manual de botão. Como controle, foram utilizadas sementes artificiais confeccionadas apenas com farinha de cotilédones de *V. unguiculata*. As partes das sementes que não continham tegumento foram envoltas com microfilme e as sementes foram infestadas por 24h, com fêmeas de 48h de idade. Para o controle foram utilizadas sementes artificiais contendo exclusivamente farinha de cotilédones de *V. unguiculata* com massa de 400 mg.

Após o período de oviposição, os ovos foram contados e o excesso retirado deixando-se apenas 3 ovos por semente, todos sobre o tegumento. Os experimentos foram incubados à 28 °C, umidade relativa entre 60-80% em estufa do tipo B.O.D. A eclosão larval foi monitorada pelo período máximo de 7 DAO (Dias Após a Oviposição). No 20º DAO as sementes foram abertas e as larvas existentes foram retiradas para verificação da massa larval e da sobrevivência.

### **3.4. Análise proteômica comparativa dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea***

#### **3.4.1. Extração proteica**

As proteínas das farinhas dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea* foram extraídas pelo método ácido tricloroacético (TCA)/acetona (DAMERVAL *et al.*, 1986). As amostras foram ressuspensas em 1 mL de tampão contendo 10% (p/v) TCA em acetona com 20 mM de ditioneitol (DTT) e agitadas no vórtex

por 5 min a 8°C. Logo após, a mistura foi mantida a -20 °C por 1 h e depois centrifugada a 16.000 g por 30 min a 4 °C. Os pellets foram lavados três vezes com acetona e DTT 20 mM e centrifugados por 5 min/lavagem. Logo depois, os pellets foram secos e ressuspensos em tampão contendo 7 M de ureia, 2 M de tioureia, 2% de Triton X-100, 1% de DTT e Fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF), agitando em vórtex por 30 min a 8 °C e centrifugado por 20 min a 16.000 g. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteína foram determinadas usando um Kit Quant 2-D. As análises foram realizadas em três réplicas biológicas para cada farinha.

### 3.4.2. Digestão proteica

As proteínas foram precipitadas com metanol/clorofórmio de acordo com NANJO *et al.*, (2012) para remover qualquer contaminante do detergente de amostras. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em solução de 7 M e 2 M Tioureia, as amostras foram preparadas de acordo com REIS *et al.*, (2021) utilizando filtro (FASP). A integridade dos filtros foi verificada de acordo com Hernandez-Valladares *et al.*, (2016). Alíquotas das amostras foram adicionadas às unidades de filtro Microcon-30 kDa (Millipore) (LIPECKA *et al.*, 2016), lavadas com 200 µL de bicarbonato de amônio 50 mM (solução A), centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 25°C e adicionados 100 µL de DTT 50 mM refrigerado (solução A). As amostras foram agitadas e incubadas por 20 min a 60°C, adicionados 200 µL de ureia 8 M e bicarbonato de amônio 50 mM e centrifugadas por 15 min. As proteínas foram alquiladas com 100 µL de iodoacetamida 50 mM refrigerado (solução B), agitadas e incubadas por 20 min a 25°C no escuro, em seguida foram adicionados 200 µL de solução B e centrifugados por 15 min (repetindo-se essa etapa duas vezes). Para a digestão, 50 µL da solução das proteínas foram misturadas com 25 µL de RapiGest 0,2 % (v/v) (Waters, Milford, CT, EUA) e 25 µL de solução de tripsina (1:100 enzimas: proteína).

As misturas foram agitadas suavemente e incubadas por 16 h a 37°C. Para a eluição dos peptídeos os filtros foram transferidos para novos microcubos e centrifugados durante 10 min, adicionados 50 µL de solução A e centrifugados por 15 min. A precipitação do RapiGest e a inibição da tripsina, foram feitos com 5 µL de ácido trifluoroacético 15 %, sob agitação e incubação por 30 min a 37°C.

As amostras foram centrifugadas durante 15 min, os sobrenadantes foram recolhidos e secos a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em 100  $\mu$ L de bicarbonato de amônio 50 mM, acetonitrila 5 % e ácido fórmico 0,1 %. Os peptídeos foram quantificados utilizando o NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

### **3.4.3. Análise das proteínas por espectrometria de massas**

A espectrometria de massa foi realizada usando um UPLC nanoAcquity conectado a um instrumento Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters, Manchester, Reino Unido). As execuções consistiram em três réplicas biológicas de 2,5  $\mu$ g de proteína digeridas para cada amostra. Durante a separação, as amostras foram carregadas em um nanoAcquity UPLC M-Class Symmetry em coluna C18 de 5  $\mu$ m (180  $\mu$ m  $\times$  20 mm) a 5  $\mu$ L min<sup>-1</sup> durante 3 min e depois em uma coluna analítica de fase reversa nanoAcquity M-Class T3 1,8  $\mu$ m (75  $\mu$ m  $\times$  150 mm) a 400 nL min<sup>-1</sup>, com uma temperatura da coluna de 45 °C. Um gradiente binário para eluição dos peptídeos foi usado com a fase móvel A água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e fase móvel B consistindo de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição começou em 5% de B, aumentando para 43,8% até 101,12 min, e de 43,8% B para 99% B até 105,12 min, sendo mantido em 99% até 109,12 min, então diminuindo para 5% B até 111,12 min e mantido em 5% B até o final do experimento em 127,00 min.

A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e modo de resolução (modo V), com 35.000 de largura total na metade máximo (FWHM) e mobilidade de íons, e no modo de aquisição independente de dados (DIA). A separação por mobilidade iônica (IMS) usou uma velocidade de onda IMS de 800 ms<sup>-1</sup> (HDMSE) e terminando com 500 ms<sup>-1</sup>. A energia de colisão de transferência aumentou de 19 para 55 V no modo de alta energia; as tensões do cone e do capilar foram de 30 V e 3000 V, respectivamente; e a fonte de temperatura era de 100°C. Para os parâmetros de tempo de luta (TOF), o tempo de varredura foi definido para 0,5 s no modo contínuo, e a faixa de massa foi de 50-2000 Da. Fbrinopeptídeo B humano [Glu1] (Sigma-Aldrich) a 100 fmol  $\mu$ L<sup>-1</sup>

foi usado como um calibrador externo, e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s. A aquisição do espectro de massa foi executado pelo software MassLynx (versão 4.0, Waters).

#### **3.4.4. Análise dos dados da proteômica**

O processamento dos espectros e banco de referência foram realizados utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters) e o workflow foi com o software ISOQuant (Distler et al., 2014, 2016). Na análise do PLGS foram utilizados os seguintes parâmetros: Apex3D de 150 contagens como limite de baixa energia, 50 contagens como limite de energia elevada e 750 contagens como limite de intensidade; uma clivagem perdida; no mínimo três fragmentos de íon por peptídeos; no mínimo sete fragmentos de íon por proteína; no mínimo dois peptídeos por proteína; modificações fixas como carbamidometil (C) e modificações variáveis como oxidação (M) e fosforil (STY); a taxa de falsas descobertas (FDR) para 40 identificação de peptídeos e proteínas foi ajustada para um máximo de 1 %, com um comprimento mínimo de seis aminoácidos. Os dados proteômicos foram processados no banco de dados *Glycine max* UNIPROT (<https://www.uniprot.org>).

A quantificação foi realizada usando o software ISOQuant v.1.8 usando configurações e algoritmos descritos anteriormente (DISTLER *et al.*, 2014, 2016). Foi utilizada uma normalização multidimensional que corrige as intensidades de pico com base nos domínios de intensidade e tempo de retenção, resumidamente, a análise incluiu alinhamento no tempo de retenção, e o exato tempo de retenção de massa (EMRT). A quantificação sem marcação foi estimada usando a abordagem de quantificação TOP3. Seguido pelo processo de normalização multidimensional implementado no ISOQuant (DISTLER *et al.*, 2014). Depois da análise dos dados no ISOQuant, para assegurar a qualidade dos resultados, definimos os parâmetros de refinamento: apenas proteínas presentes nas três repetições biológicas foram consideradas para análise. Proteínas com um valor  $p < 0,05$  foram consideradas up-regulated se o valor  $\log_2$  da mudança de dobra (FC) foi maior que 0,60 e down-regulated

se o valor  $\log_2$  do FC foi menor que - 0,60. A análise de enriquecimento funcional foi realizada usando o software OmicsBox 1.2.4

### **3.5. Isolamento das proteínas com afinidade a quitina**

#### **3.5.1. Extração proteica**

Sementes de *C. ensiformis* e *C. rosea* foram descascadas e foram separados os tegumentos do embrião (cotilédones + eixo). Os tegumentos foram triturados em um moinho, peneirados e pesados. As farinhas foram submetidas a extração em uma proporção de 1:20 em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6. As misturas foram agitadas em um agitador magnético por cerca de 1 hora a 4°C. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes utilizados para o fracionamento das proteínas.

#### **3.5.2. Isolamento das proteínas por cromatografia de afinidade a quitina**

Na preparação da coluna foi utilizada uma suspensão de aproximadamente 50 mL de quitina (Sigma-Aldrich) em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 6. O sobrenadante obtido da extração do tegumento (180 mL) de cada uma das espécies, foi incubado com a quitina por cerca de 1 h sob agitação lenta. Logo em seguida, a mistura da amostra e quitina foi adicionada a um tubo de vidro para a montagem da coluna. A coluna foi empacotada através da ação de uma bomba peristáltica, no fluxo 1,3 mL/min. A fração não-retida foi eluída da coluna através da lavagem com o tampão acetato de sódio 0,1M, pH 6. A fração retida foi obtidas através da eluição com HCl 0,1 M. Frações de 4 mL/tubo foram coletadas e a absorbância lida a 280 nm. A fração retida foi dialisada contra água e liofilizada.

### **3.5.3. Separação das proteínas por diferença de solubilidade em água**

Esse processo objetivou a separação de proteínas com afinidade a quitina não solúveis em água, como as vicilinas, das proteínas solúveis em água, como as quitinases e foi feito segundo descrito por FERREIRA *et al.*, (2021). O pó obtido da fração retida em quitina do tegumento de *C. ensiformis* foi diluído em água (1mg/mL) e centrifugado durante 20 min, 4 °C, a 10.000 x g. Este processo foi repetido por 2 vezes e o sobrenadante final foi liofilizado. Assim o sobrenadante, parte solúvel em água, foi denominada a fração rica em quitinases, FRQ.

## **3.6. Caracterização das proteínas com afinidade a quitina**

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

A eletroforese foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida 12% contendo SDS segundo a metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970). Foi preparado um volume de 5 mL do gel de separação com seguintes soluções: 3,3 mL de H<sub>2</sub>O; 4 mL de bis-acrilamida; 2,5 mL Tris-HCl 1.5 M, pH=8,8; 100 µL SDS 10%; 250 µL persulfato de amônio 10 %; 2 µL de TEMED. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado um volume de 5 mL de gel de empacotamento (stack) pela mistura de 3,4 mL de H<sub>2</sub>O; 830 µL de acrilamida mix; 630 µL Tris-HCl 0,1 M pH=6,8; 50 µL SDS 10 %; 50 µL persulfato de amônio 10 %; 5 µL TEMED.

Após a polimerização dos géis, 2 mg da fração retida em quitina dos tegumentos *C. ensiformis* foram dissolvidas em 200 µL de tampão de amostra 4x (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, azul de bromofenol 1 %, pH 6,8) e um volume de 30 µL foi aplicado no gel de empacotamento. A eletroforese foi efetuada em ambiente de tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) por aproximadamente 2 h com uma voltagem de 60 V para corrida no gel de empacotamento e 100 V no gel de separação.

O gel foi corado com uma solução corante (0,4 g de azul Brilhante de Coomassie R 250, 160 mL de metanol e 40 mL de ácido acético) e descorado por uma solução descorante (35 % de metanol e 10 % de ácido acético).

Outro gel de eletroforese similar, feito com a fração retida em quitina de tegumento de *C. ensiformis*, não foi submetido a coloração e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para o procedimento de imunodeteção de proteínas por *Western Blotting*.

### **3.6.2. *Western blotting* para detecção de vicilinas e quitinases na fração retida em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis***

Após a eletroforese, as proteínas do gel não corado foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a realização do *Western blotting*, de acordo com metodologia de TOWBIN *et al.*, (1979). O sanduíche de transferência foi montado em sistema semi-seco usando-se 2 pedaços de papel de filtro grosso. Os papéis de filtros, o gel e a membrana foram equilibrados por 20 min com tampão de transferência (Tris 0,25 M, glicina 1,92 M e metanol 20 %, pH 8,0). O sanduíche foi montado na seguinte ordem, uma folha de papel, seguido da membrana, o gel e a outra folha de papel de filtro. O sistema foi fechado e a transferência ocorreu em uma voltagem de 20 V por 3 horas.

Ao término da transferência, a membrana foi lavada com água destilada e corada com uma solução de Ponceau para verificar a transferência. Logo em seguida, a membrana foi lavada com água destilada e incubada em tampão PBS-bloqueador (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6 contendo 2 % de leite em pó desnatado), overnight a 4° C.

Para a detecção de vicilinas foi utilizado como anticorpo primário um anti-vicilina de *Vigna unguiculata* em uma diluição 1:1000 µL por 2 h à temperatura ambiente.

Para a detecção de quitinase foi utilizado como anticorpo primário um anti-quitinase de *Adenantha pavonina* em uma diluição 1:1000 µL por 2 h à temperatura ambiente.

Após a incubação com o primeiro anticorpo, a membrana foi lavada com tampão PBS e adicionado o segundo anticorpo, anti-IgG de coelho complexado a peroxidase 1:1000, por 1 hora, seguido de lavagens com tampão PBS. A solução reveladora (4,9 mL H<sub>2</sub>O destilada; 100 µL Tris-HCl 2 M, pH 7,5; 300 µL Imidazol 0,1 M; 10 mg DAB e 20 µL peróxido de hidrogênio) foi colocado para a revelação das bandas. Após o aparecimento das bandas a membrana foi lavada com água, seca com papel de filtro e fotografada.

### 3.6.2. Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Uma banda proteica de aproximadamente 25 kDa, responsiva ao anticorpo anti-quitinase na fração retida em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* foi recortada de um gel SDS-PAGE e submetida a caracterização através de espectrometria de massas. Esses experimentos foram realizados no laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ-RJ em colaboração com o Dr<sup>o</sup> André Teixeira da Silva Ferreira e Dr<sup>o</sup> Jonas Perales. Os fragmentos de gel contendo a banda foram descoloridos por lavagem com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min.

O gel foi desidratado com acetonitrila, seco por centrifugação a vácuo, reduzido com DTT (ditiotretol), alquilado com iodoacetamida e desidratado novamente com acetonitrila. A proteína foi tripsinizada durante 16 h a 37 °C (SHEVCHENKO et al., 1996). e os peptídeos resultantes foram dessalinizados em ziptip C18. Uma nanocromatografia de fase reversa acoplada a um espectrômetro de massas nanoeletrospray de alta resolução foram usados para a identificação dos peptídeos. Um volume de 3 µL da solução foi usado para as análises. Os peptídeos eluidos da cromatografia foram introduzidos no espectrômetro LTQ XL/Orbi/Trap MS (Thermo, USA).

Picos de massa com sinal de 20 ou acima (noise ratio) foram usados para pesquisa em bancos de dados (NCBI) usando-se o programa MASCOT versão 2.1 e 2.2. e o programa Scaffold. Os dados foram considerados válidos quando mostravam score superior a 40. Os peptídeos identificados foram submetidos a análise por BLASTp 2.8.1 para confirmar as similaridades.

### **3.7. Análises ds toxicidade das frações para o inseto *C. maculatus***

#### **3.7.1. Confeção de sementes artificiais contendo frações retidas em quitina de tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea***

A fração retida em quitina de cada de ambos os tegumentos foi liofilizada, dialisada e submetida a avaliação da toxicidade sobre o desenvolvimento do inseto *C. maculatus*. As sementes artificiais foram confeccionadas utilizando a metodologia descrita por Macedo *et al.*, (1993), incorporando as frações em concentração de 1%, *C. rosea* misturadas à farinha de cotilédones de *V. unguiculata* perfazendo um total de 400 mg. A mistura foi prensada de acordo com o item 3.3. Para o controle foram utilizadas sementes artificiais contendo exclusivamente farinha de cotilédones de *V. unguiculata* com massa de 400 mg.

Cada semente foi infestada com três fêmeas, de 2 dias de idade, por 24 h. O excesso de ovos depositados foi removido, deixando-se em cada semente três ovos. As sementes foram armazenadas em câmaras de crescimento do tipo B.O.D. a 28 °C, sendo observadas em diferentes horas após a oviposição (HAO) e dias após a oviposição (DAO). A oviposição foi observada em 24 HAO, a eclosão larval 7 DAO e massa larval foi determinada 20 DAO.

#### **3.7.2. Sementes artificiais contendo a fração rica em quitinases (FRQ) do tegumento de *C. ensiformis***

Para avaliar a toxicidade da FRQ *C. ensiformis* foram confeccionadas sementes artificiais contendo 1% dessa amostra como descrito no item 3.7.1. A mistura de farinha foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e colocada em molde cilíndrico (2,7 x 1,3 cm) e prensada para a confecção da semente como descrito no item 3.3. Para o controle foram utilizadas sementes artificiais contendo exclusivamente farinha de cotilédones de *V. unguiculata* com massa de 400 mg. Cada semente foi infestada com três fêmeas, de 2 dias de idade, por 24 h. O excesso de ovos depositados foi removido, deixando-se em cada semente três ovos. As sementes foram armazenadas em câmaras de

crescimento do tipo B.O.D. a 28 °C, sendo observadas em diferentes horas após a oviposição (HAO) e dias após a oviposição (DAO). A oviposição foi observada em 24 HAO, a eclosão larval 7 DAO e massa larval foi determinada 20 DAO.

### **3.8. Efeitos do calcofluor sobre o desenvolvimento de *C. maculatus***

Calcofluor é um composto que se liga a quitina, podendo interferir com a síntese e função de estruturas quitinosas. Desta forma foi usado nesse trabalho para averiguar os efeitos da interferência no metabolismo de quitina para o desenvolvimento do inseto, mimetizando as possíveis ações de proteínas com afinidade a quitina. As sementes artificiais, contendo calcofluor nos tegumentos, foram confeccionadas de acordo com DE SÁ *et al.*, (2014). Concentrações de 0,5 e 1 % de calcofluor (Sigma-Aldrich) foram adicionadas em farinha de *V. unguiculata* para a confecção dos tegumentos artificiais com massa total de 30 mg. Essa mistura foi adicionada na parte inferior do molde cilíndrico e sobre ela, foram adicionados 400mg de farinha de *V. unguiculata* para a confecção dos cotilédones artificiais. Todos os demais experimentos de confecção das sementes, prensagem, infestação e acompanhamento do desenvolvimento foram feitos de acordo com os itens 3.3 e 3.7.

### **3.9. Análise bioquímicas dos conteúdos das reservas e enzimas digestivas das larvas desenvolvidas nas sementes contendo calcofluor**

#### **3.9.1. Extração das larvas**

As larvas de 20 DAO, retiradas de experimentos de sementes artificiais contendo tegumentos com 0,5% de calcofluor, foram maceradas e extraídas em solução salina (NaCl 0,15 M), na proporção de 50 µl de solução por larva. Durante 30 min, o material foi submetido à agitação constante a temperatura de 4 °C. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C para posterior dosagens de glicose, proteínas e atividades das enzimas. O precipitado obtido

da extração após centrifugação, foi utilizado para determinação de triacilgliceróis e colesterol. Adicionou-se ao precipitado um volume de 12,5 µL/larva de Tween 20 0,1%, mantendo agitação constante pelo período de 30 min a 4°C. O material obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para determinação de triacilgliceróis e colesterol.

### **3.9.2. Determinação de glicose**

Utilizou-se o kit Glicose Monoreagente do fabricante Bioclin para a quantificação da concentração de glicose presente nas larvas. O kit é composto por um reagente enzimático (reagente N° 1), composto por: Tampão < 36 mmol/L, Fenol < 20 mmol/L, 4- aminoantipirina < 5 mmol/L, Glicose Oxidase > 10.000 U/L, Peroxidase > 700 U/L, estabilizante, surfactante e conservante; e por um reagente padrão (reagente N° 2) 29 composto por: Glicose (100,0 mg/dL) e conservante. Os procedimentos seguiram as instruções indicadas pelo fabricante. O ensaio foi realizado em microtubos de 1,5 mL, utilizando-se 2 µl do extrato das larvas (extraído em solução salina) adicionados a 200 µl do reagente enzimático. O ensaio foi feito em microtubos utilizando 2 µL do extrato das larvas (extraído em solução salina) + 200 µL do Reagente 1 e para a preparação do Branco, 2 µL de solução salina (NaCl 0,15 M) + 200 µL do Reagente 1 2 (enzimático). O padrão do kit foi feito utilizando-se 2 µL do Reagente 2 + 200 µL do Reagente 1 e foi utilizado para o cálculo de determinação de glicose. O ensaio foi encubado por 10 min em banho-maria a 37 °C. Em seguida, 200 µl da amostra foram transferidos para uma microplaca para Elisa de 96 poços e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 492 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções indicadas pelo kit do ensaio.

### **3.9.3. Determinação de triacilglicerol**

Para determinar a concentração de triacilgliceróis presente nas larvas foi utilizado o kit Triglicérides Monoreagente da Bioclin, seguindo suas instruções de uso do fabricante. O kit é composto pelos reagentes: Reagente N° 1 (reagente

enzimático) constituído por tampão, 4-clorofenol, lipase lipoprotéica, glicerol kinase, peroxidase, glicerol-3-fosfato oxidase, 4-aminoantipirina, ATP, ativador, estabilizante, surfactante e conservante; e Reagente Nº 2 (Padrão) que contém triglicérides e diluente. O ensaio foi feito em microtubos utilizando 1 µL de extrato (extraído do precipitado em Tween 20 0,1%) + 1 µL de Tween 20 0,1% + 200 µL do Reagente 1 e para o Branco, 2 µL Tween 20 0,1% + 200 µL do Reagente 1. O padrão do kit foi feito utilizando 2 µL do Reagente 2 + 200 µL do Reagente 1 e foi utilizado para o cálculo de determinação de triacilglicerois. O período de incubação do ensaio foi de 10 min em banho-maria a 37 °C. Em seguida, 200 µL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda a 500 nm. O ensaio foi feito em triplicata e os cálculos foram feitos seguindo o método indicado pelo kit do ensaio.

#### **3.9.4. Determinação de colesterol**

Para determinação de colesterol presente nas larvas foi utilizado o kit Colesterol Monoreagente da Bioclin, de acordo com as instruções de uso do fabricante. O kit é composto pelos reagentes: Reagente Nº 1 (reagente enzimático) constituído de tampão, fenol, 4-aminoantipirina, colesterol oxidase, lipoproteína lipase, peroxidase, quelante, surfactantes, estabilizantes e conservantes; Reagente Nº 2 (Padrão) que contém colesterol, solubilizantes, surfactante e estabilizante. O ensaio foi feito em microtubos utilizando 2 µL de extrato (extraído do precipitado em Tween 20 0,1%) + 200 µL do Reagente 1 e para o Branco, 2 µL Tween 20 0,1% + 200 µL do Reagente 1. O padrão do kit foi feito utilizando 2 µL do Reagente 2 + 200 µL do Reagente 1 e foi utilizado para o cálculo de determinação de colesterol. O período de incubação do ensaio foi de 10 min em banho-maria a 37 °C. Em seguida, 200 µL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda a 500 nm. O ensaio foi feito em triplicata e os cálculos foram feitos seguindo o método indicado pelo kit do ensaio.

#### **3.9.5. Determinação de proteínas totais**

Para dosagem de proteínas totais solúveis foi utilizado o método do ácido bicinconínico BCA (Sigma Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) na proporção de 1 mg para 1 mL de água destilada foi feita para o cálculo de quantidade de proteínas totais presentes nas amostras. A curva foi feita em quantidades crescentes (2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$ ) do estoque de BSA + 200  $\mu\text{L}$  da solução de BCA + água destilada para completar o volume final de 210  $\mu\text{L}$ . O ensaio foi feito em microplaca de 96 poços e para as amostras foram colocados 1  $\mu\text{L}$  dos extratos (extraído em solução salina) + 10  $\mu\text{L}$  de água destilada + 200  $\mu\text{L}$  da solução de BCA. O ensaio foi incubado por 30 min em estufa a 37° C. A leitura foi feita em comprimento de onda a 540 nm. O ensaio foi feito em triplicata e os cálculos de quantidade de proteínas totais foram feitos de acordo com os dados da curva padrão.

### **3.9.6. Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase**

Para determinar a atividade de  $\alpha$ -amilase nas larvas foi utilizado o kit Amilase Monoreagente da Bioclin, seguindo as instruções de uso do fabricante. O kit é composto pelos reagentes: Reagente N° 1 (Substrato) que contém: amido, tampão fosfato (pH 7,0), estabilizante e conservante; e Reagente N° 2 (Reagente de Cor) que é uma solução estoque de Iodo. O reagente N° 2 foi usado para preparar o reagente de trabalho constituído de 5 mL do reagente N° 2 + 45 ml de água destilada. Para o ensaio foram colocados 100  $\mu\text{L}$  do reagente 1 em todos os tubos a serem utilizados. Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 12 min. Após esse período, foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do extrato larval (extraído em solução salina) nos tubos referente às amostras e 2  $\mu\text{L}$  de solução salina (NaCl 0,15 M) no tubo referente ao padrão. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C por 7,5 min e em seguida adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho + 800  $\mu\text{L}$  de água destilada. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda de 630 nm. O ensaio foi feito em triplicata. Os cálculos foram feitos seguindo o método indicado pelo kit do ensaio.

### **3.9.7. Determinação da atividade de lipases**

Para determinar a atividade de lipases das larvas foi utilizado o kit Lipase Monoreagente da Bioclin, seguindo as instruções de uso do fabricante. O kit é composto pelos reagentes: Reagente N° 1 (Tampão) – que contém Tris (hidroximetilamino metano) pH 8,5; Reagente N° 2 (Inibidor Enzimático) constituído de fenilmetil sulfonil fluoreto e solubilizante; Reagente N° 3 (Reagente de Cor) que contém DTNB (ácido ditionitrobenzóico), acetato de sódio e estabilizador; Reagente N° 4 (substrato) contendo tiobutirato ditiopropanol e surfactante; e Reagente N°5 constituído de acetona P.A. O ensaio foi feito em microtubos de 1,5 µL utilizando 5 µL do extrato larval (extraído em solução salina) + 100 µL do Reagente 1 + 5 µL do Reagente 2 + 10 µL do Reagente 3. O Branco foi composto de 5 µL de NaCl 0,15 M + 100 µL do Reagente 1 + 5 µL do Reagente 2 + 10 µL do Reagente 3. O controle foi feito utilizando 5 µL do extrato larval + 100 µL do Reagente 1 + 10 µL do Reagente 3 e foi utilizado para o cálculo de determinação de lipase. Ensaio foi incubado em banho-maria a 37 °C por 2 min. Após foram adicionados 10 µL do Reagente 4 nos tubos ensaio e 10 µL de salina no tubo referente ao controle. Em seguida, o material foi incubado novamente em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após o tempo, foram colocados 200 µL do Reagente 5 em todos os tubos, deixado em repouso por 3 min e centrifugado a 3500 x g por 5 min. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi feita em comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi feito em triplicata. Os cálculos foram feitos seguindo o método indicado pelo kit do ensaio.

### **3.9.8. Determinação da atividade de proteases cisteínicas**

Para verificação da atividade de protease cisteínica nas larvas, realizou-se ensaio enzimático segundo metodologia descrita por MICHAUD *et al.* (1994). Utilizou-se azocaseína como substrato para a enzima, preparada na concentração de 1% em tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio monobásico 100 mM, Triton X-100 0,1%, DTT 1,5 mM, pH 5,6). O cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se uma curva padrão de

papaína, na proporção de 1 mg para 2 mL de tampão citrato-fosfato. A curva foi feita em quantidades crescentes (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22) de papaína adicionadas a 80 µL da solução de 33 µL azocaseína + tampão citrato fosfato até que se completasse 120 µL de volume final. Adicionou-se 10 µL dos extratos das larvas (extraído em solução salina) a 30 µL de tampão citrato-fosfato e 80 µL de azocaseína em tubos de ensaio. A incubação do ensaio foi realizada por 1 h em banho-maria a 37° C. Após o período de incubação, foram adicionados 43 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para possibilitar a pausa da reação. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 min a 10.000 x g e 350 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos, adicionando-se 43 µL de NaOH 1 M. Uma alíquota de 100 µL foi transferida para uma microplaca de Elisa de 96 poços e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 440 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os cálculos de atividade de protease cisteínica foram feitos utilizando-se como parâmetro os valores de absorbância da curva padrão.

### **3.10. Experimentos *in silico***

As sequências dos peptídeos obtidos por espectrometria de massas a partir da banda de 25 kDa da fração retida em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis*, foram alinhadas no BLASTp com proteínas armazenadas no PDB (Protein Data Bank). A proteína de maior identidade para vicilina, foi a 2EA7.A, uma vicilina de *V. angularis*. Por outro lado, a proteína de maior identidade para quitinase foi a IDJX, uma quitinase de *C. ensiformis*.

#### **3.10.1. Sítios de ligação à quitina**

Buscas na literatura foram feitas no intuito de comparar regiões da sequência de vicilinas e quitinases prováveis de se ligarem ao tetrâmero de N-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>. Os sítios de ligação da vicilina à quitina previamente identificados nos trabalhos de MIRANDA *et al.* (2020) foram buscados manualmente na sequência dos peptídeos obtidos na espectrometria de massas.

A identificação dos sítios de ligação da quitinase à quitina, foi feita de acordo com o trabalho de Hanh *et al.*, (2000).

### **3.10.2. Docking da vicilina e quitinase com o tetrâmero de N-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>**

O docking da vicilina e da quitinase com (NAG)<sub>4</sub> foi feito usando o programa DockThor v.2 (SANTOS *et al.*, 2020). A estratégia utilizada do encaixe usava um espaço definido por um cubo de 40 Å x 40 Å x 40 Å, direcionando o cubo para uma região específica, que incluía o sítio de ligação da vicilina com à quitina previamente identificado por MIRANDA *et al.*, (2020) e para a quitinase, os sítios de ligação à quitina foram identificados por HAHN *et al.*, (2000). O modelo do foi criado a partir do PyMol, com o plug-in Azahar para projetar oligossacarídeos.

Todas as rotações do ligante foram livres para girar enquanto os átomos da proteína foram mantidos rígidos. O algoritmo de busca padrão do site foi usado com 1.000.000 de avaliações e 24 execuções por experimento. Os melhores complexos vicilina-ligante e quitinase-ligante foram avaliados pelo valor de energia de afinidade e submetido ao programa PLIP Web Tool, (SALENTIN *et al.*, 2015) e ao programa LigPlot + v. 2.2.4, (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). O programa LigPlot+ v. 2.2.4 indica apenas as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio e fornece dados de distância apenas das ligações de hidrogênio.

### **3.11. Análise de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina no transcriptoma de embriões, larvas pupas e adultos de *C. maculatus***

A expressão de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina foi investigada no transcriptoma em embriões de *C. maculatus* publicado anteriormente por BENTON *et al.*, (2016).

A busca de transcritos relacionados ao metabolismo de quitina em larvas, pupas e adultos de *C. maculatus* foi realizada através da análise dos dados de transcriptoma previamente publicado por SAYADI et al (2016).

Sequências publicamente disponíveis do inseto *Tribolium castaneum*, obtidas do Genbank, foram usadas como iscas para encontrar transcritos relacionados nos transcriptomas montados de *C. maculatus*.

Este conjunto de dados do transcriptoma foi utilizado então para realizar uma avaliação dos níveis de expressão diferencial de transcritos para quitina sintase, quitina desacetilase e quitinases em dois tempos de desenvolvimento de embriões de *C. maculatus*, 0-7 h e 7-24 horas após a fertilização (haf). Além de detectar a presença de transcritos para quitina sintase, quitina desacetilase e quitinases em larvas, pupas e adultos desse inseto.

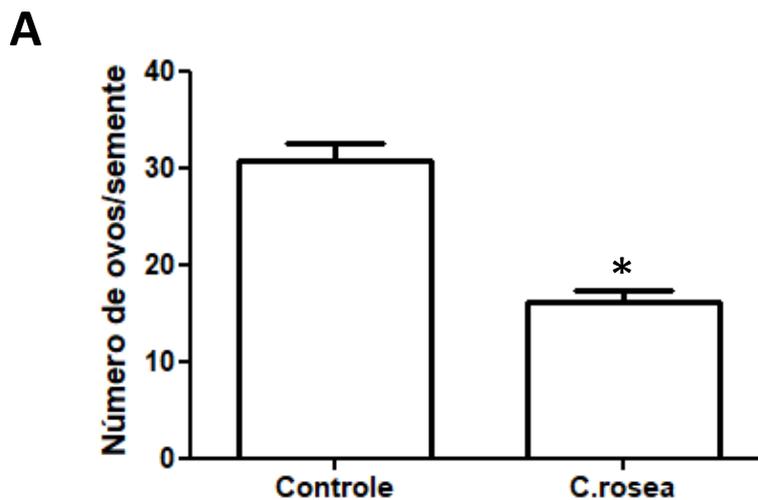
### **3.12. Análise estatística dos dados**

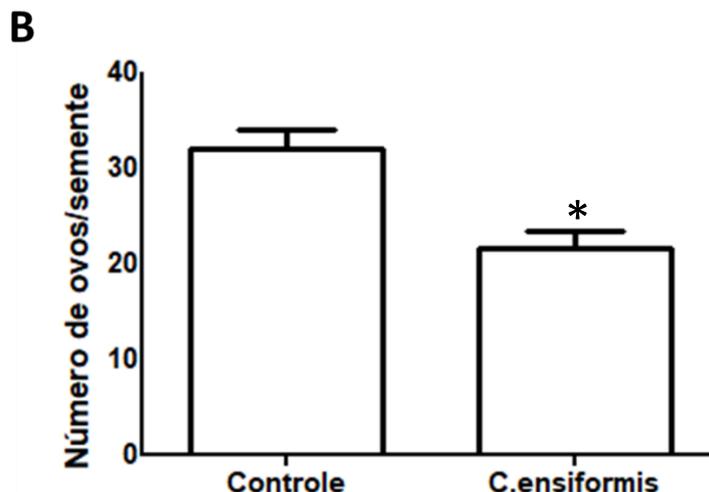
Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas independentes. As médias, o desvio padrão e o tratamento estatístico foram feitos utilizando o software 37 GraphPad Prism 5.0. As análises de variância (ANOVA) e análises do teste Tukey (Teste T) foram realizadas segundo Bridge e Sawilowsky (1999). Resultados foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Influência dos tegumentos naturais das sementes de *C. ensiformis* e *C. rosea* sobre o desenvolvimento do inseto *C. maculatus*

A análise da toxicidade dos tegumentos naturais das sementes de *C. rosea* para o inseto mostrou que houve cerca de 52% de inibição da oviposição sobre esses tegumentos (16,2 ovos por semente) quando comparado com a oviposição nas sementes controle de *V. unguiculata* (31,2 ovos por semente) (Figura 2-A). Nos tegumentos naturais de *C. ensiformis* foi observada uma média de 22,3 ovos por semente, foi uma inibição de cerca de 30% em relação a oviposição nas sementes controle (32 ovos por semente) (Figura 2-B).

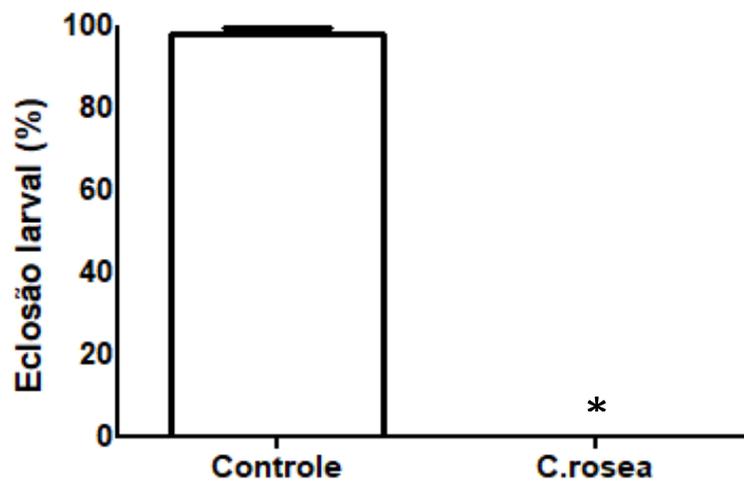




**Figura 2. Avaliação da interferência dos tegumentos naturais de *C. rosea* e *C. ensiformis* sobre a oviposição de fêmeas de *C. maculatus*.** Número de ovos sobre as sementes de *V. unguiculata* e sobre os tegumentos naturais de *C. rosea* (A) e *C. ensiformis* (B) após 24 horas após a oviposição (HAO). Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle, de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

A taxa de eclosão larval 6 dias após a oviposição (DAO) também foi avaliada e foi observada que houve cerca de 100% da inibição da eclosão larval tanto nos ovos sobre os tegumentos de *C. rosea* (Figura 3A) quanto de *C. ensiformis* (Figura 3-B), enquanto nas sementes controle a eclosão foi de 97,2% e 96,5% respectivamente. Como não houve eclosão larval, consequentemente também não houve emergência de insetos adultos nas sementes contendo os tegumentos, enquanto nas sementes controle foi observado que mais de 90% dos insetos emergiram (Figura 4-A e 4-B).

A



B

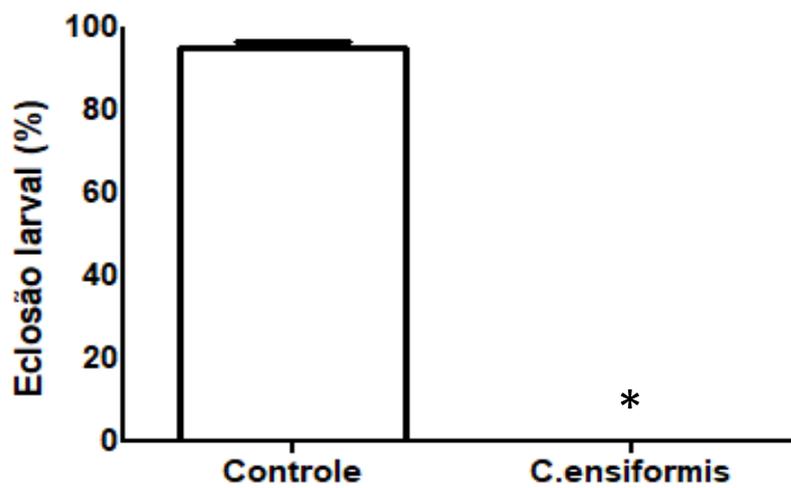
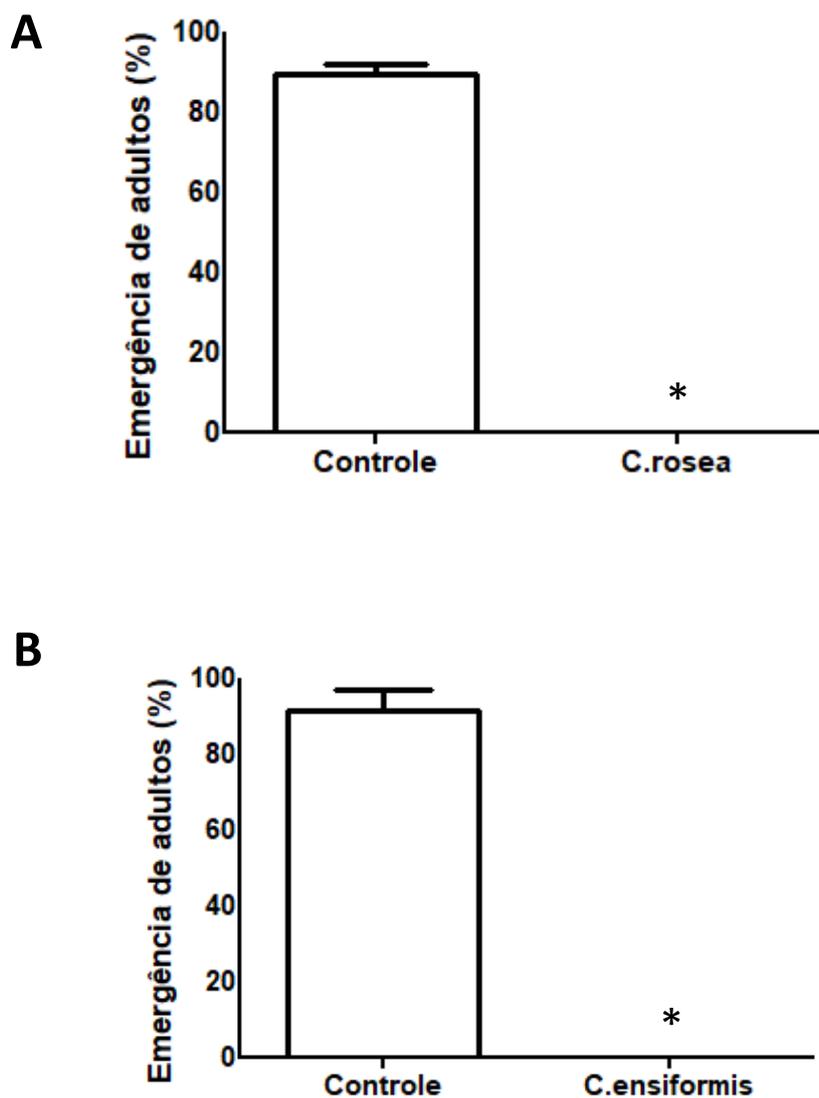


Figura 3. Avaliação da interferência dos tegumentos naturais de *C. rosea* e *C. ensiformis* sobre a eclosão larval de *C. maculatus*. Percentual de eclosão

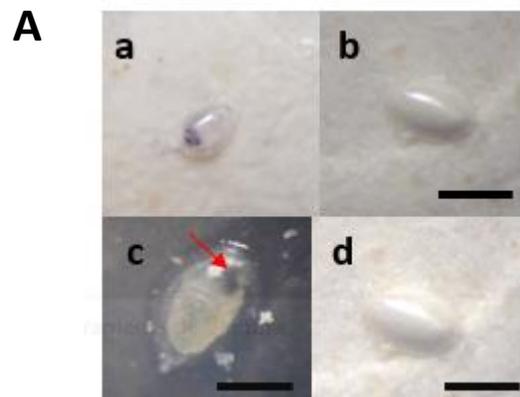
larval de *C. maculatus* em sementes contendo tegumentos de *C. rosea* (A) e de *C. ensiformis* (B) e das sementes controle 6 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

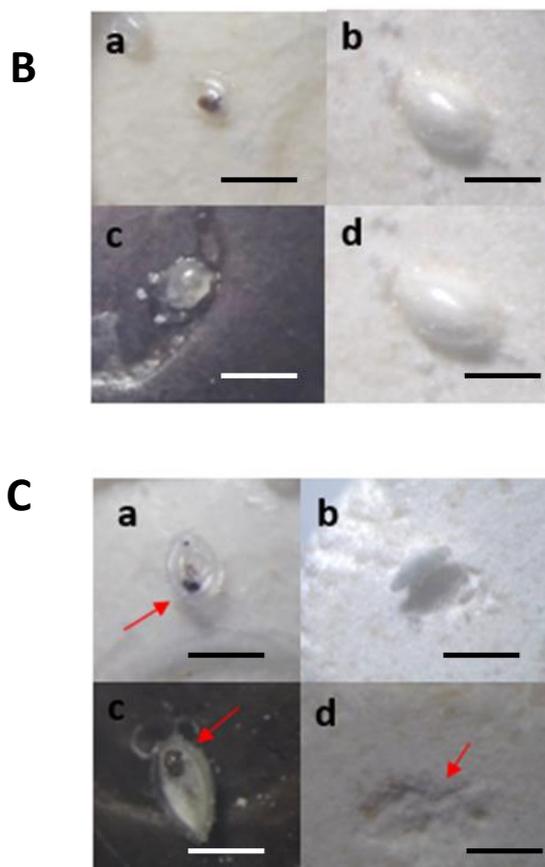


**Figura 4. Avaliação da interferência dos tegumentos naturais de *C. rosea* e *C. ensiformis* sobre a emergência de insetos adultos de *C. maculatus*.** Percentual de emergência em sementes contendo tegumentos de *C. rosea* (A) e de *C. ensiformis* (B) e dos respectivos controles. Os valores representam a

média de 3 experimentos independentes. Valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Na figuras 5A observa-se o perfil dos ovos 6 DAO, onde é possível ver que as larvas já se encontram formadas dentro dos ovos ovipositados sobre os tegumentos de *C. ensiformis* (Figura 5-Aa) e de *C. rosea* (Figura 5-Ac). Já nas sementes controle, os ovos já estão com aspectos brancos, indicando que as larvas eclodiram e os ovos já estão preenchidos com farinha, resultado da escavação (Figuras 5-Ab e 5-Ad). Aos 14 DAO (Figura 5-B) e aos 20 DAO (Figura 5-C) os ovos foram levantados com o auxílio de uma agulha e foi possível observar as larvas mortas presas aos ovos, algumas com o corpo completamente dentro do ovo e outras com parte do corpo dentro do ovo e parte atravessando o tegumento. Entretanto foi confirmado que nenhuma larva conseguiu atravessar completamente os tegumentos das sementes de *C. ensiformis* e *C. rosea*.





**Figura 5. Visualização em estereomicroscópio dos ovos de *C. maculatus* ovipositados sobre os tegumentos das sementes de *C. rosea* e *C. ensiformis* e sobre as sementes controle nos períodos de 6, 14 e 20 DAO.**

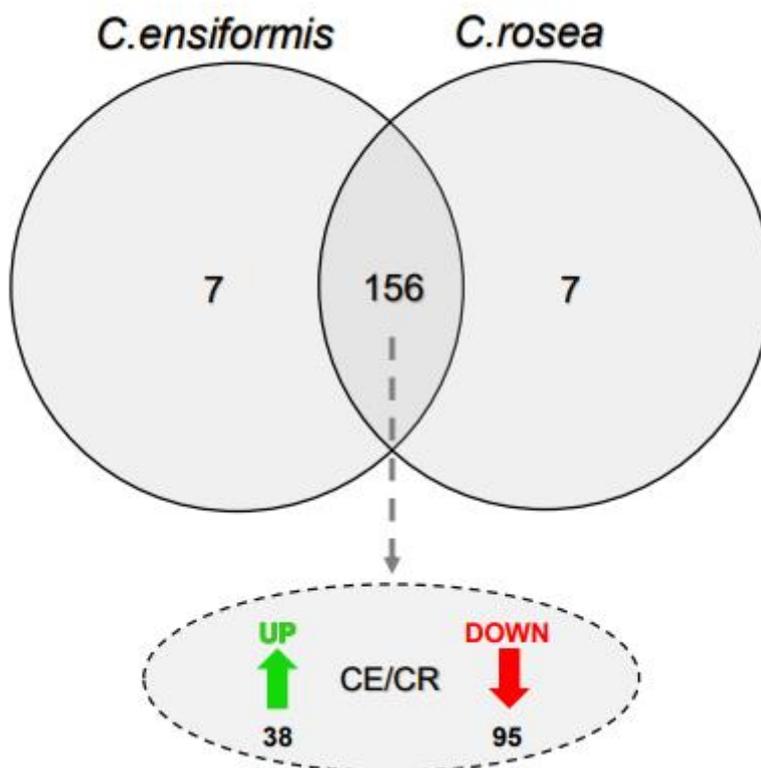
**A:** Ovos sobre os tegumentos de *C. rosea* e *C. ensiformis* 6 DAO. **a:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. ensiformis*. **b:** Ovo de *C. maculatus* sobre a semente controle. **c:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. rosea*. **d:** Ovo de *C. maculatus* sobre a semente controle. **B:** Ovos de *C. maculatus* sobre os tegumentos de *C. rosea* e *C. ensiformis* 14 DAO. **a:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. ensiformis*. **b:** Ovo de *C. maculatus* sobre a semente controle. **c:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. rosea*. **d:** Ovo de *C. maculatus* sobre a semente controle. **C:** Ovos sobre os tegumentos de *C. rosea* e *C. ensiformis* 20 DAO. **a:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. ensiformis*. **b:** Ovo de *C. maculatus* sobre a semente controle. **c:** Ovo de *C. maculatus* sobre o tegumento de *C. rosea*. **d:** Ovo de *C. maculatus* sobre a

semente controle. Cavidade de aproximadamente 0,1 mm que indica a tentativa de perfuração da larva (20 DAO). Barras pretas indicam escala de 0,1mm.

#### **4.2. Análise proteômica comparativa dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea***

As análises proteômicas foram realizadas comparativamente entre os tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea*. A acumulação diferencial foi determinada comparando CE/CR (*C. ensiformis*/*C. rosea*), proteínas classificadas como UP estão aumentadas nos tegumentos de CE e proteínas classificadas como DOWN estão diminuídas em tegumentos de CE. Para proteínas diferentemente expressas foram considerados  $p \leq 0,05$  e diferenças de expressão de pelo menos 1,4 x (Log2 do fold change  $\geq$  a 0.5 UP e Log2 do fold change  $\leq$  -0.5 DOWN).

Os resultados dessa análise deram um total de 308 proteínas identificadas. Dentre esse total de proteínas, 7 foram encontradas unicamente para tegumentos de *C. ensiformis* (CE) e a mesma quantidade unicamente para *C. rosea* (CR). Além disso, 156 proteínas não mostraram uma expressão diferencial entre os tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rósea*, ou seja, estavam expressas nas mesmas concentrações em ambos. Quando analisadas as expressões, foi observado que 38 proteínas estavam aumentadas (UP) no tegumento de *C. ensiformis* e 95 proteínas estavam diminuídas (DOWN) (Figura 6).



**Figura 6. Diagrama de venn representando a distribuição das proteínas identificadas durante a análise proteômica comparativa.** O total de proteínas encontradas foi de 308, sendo que 7 eram únicas em tegumentos de *C. ensiformis* e em tegumentos de *C. rosea*, 38 são aumentadas (UP) em tegumentos de *C. ensiformis*, 95 são diminuídas (DOWN) em tegumentos de *C. ensiformis* e 156 proteínas não diferiram em expressão nos tegumentos de *C. ensiformis* e nos tegumentos de *C. rosea*.

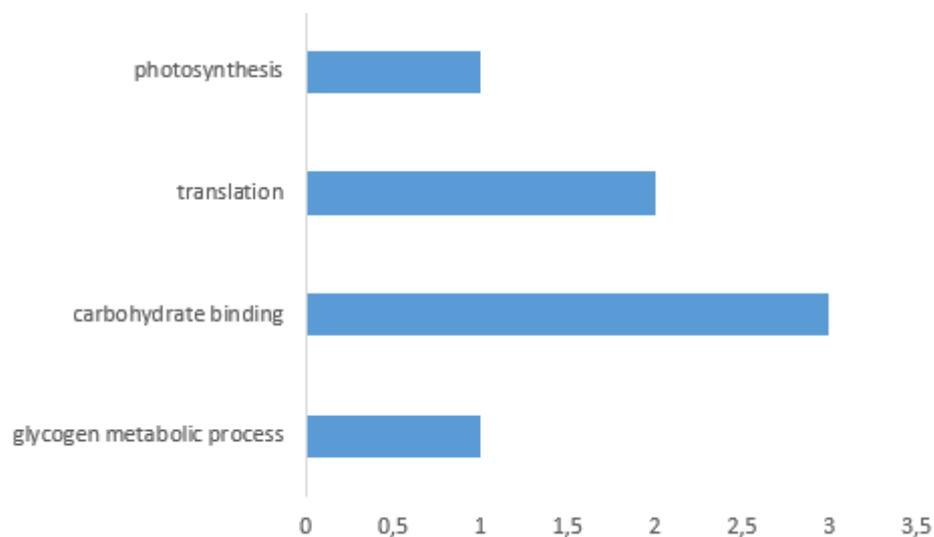
Quando analisadas as 7 proteínas encontradas unicamente em tegumentos de *C. ensiformis* (Tabela 1), podemos destacar 3 proteínas de acesso I1MN42, I1J8K1 e A0A0R0HQX5 podem estar relacionadas a processos biológicos como ligação de carboidratos e K7L722 e I1LZ10 relacionados a processos de síntese proteica (Figura 7). Analisando as 7 proteínas únicas para *C. rosea* (Tabela 2), observa-se que elas estão relacionadas principalmente aos processos biológicos de metabolismo energético (Figura 8). Nenhuma dessas proteínas analisadas está diretamente relacionada a função de defesa.

**Tabela 1. Proteínas unicamente identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**

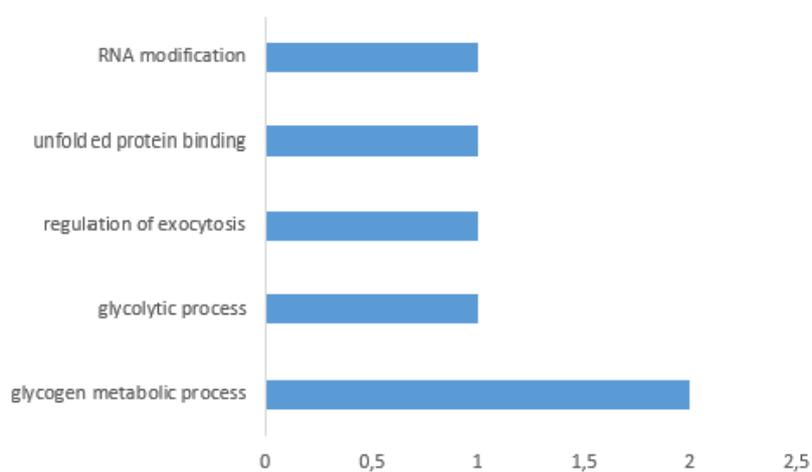
Description	Accession	IEP	mw	max score	reported peptides	sequence coverage	Average		Teste T		Log2 Fold Change	Diferential accumulation
							CE	CR	Ens/Ros	Ens/Ros	Ens/Ros	
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	AOA0R0LOW8	5,07	49380,71	5481,30	12	37,92	0	3728	-	-	-	UNIQUE ROS
Alpha-mannosidase	I1MN42	7,00	114672,38	3933,51	11	16,30	0	5733	-	-	-	UNIQUE ROS
Alpha-mannosidase	I1J8K1	8,02	113581,77	2113,37	5	6,57	0	31519	-	-	-	UNIQUE ROS
40S ribosomal protein SA	K7L722	6,34	33790,15	1149,68	3	19,87	0	4130	-	-	-	UNIQUE ROS
40S ribosomal protein S23	I1LZ10	10,81	15247,79	903,89	2	12,50	0	15441	-	-	-	UNIQUE ROS
Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme	Q02909	5,57	111142,72	507,71	6	9,31	0	14795	-	-	-	UNIQUE ROS
Beta-galactosidase	AOA0R0HQX5	6,17	85973,22	420,48	2	2,56	0	27379	-	-	-	UNIQUE ROS

**Tabela 2. Proteínas unicamente identificadas nos tegumentos de *C. rosea* (CR) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**

Description	Accession	IEP	mw	max score	reported peptides	sequence coverage	Average		Teste T		Log2 Fold Change	Diferential accumulation
							CE	CR	Ens/Ros	Ens/Ros	Ens/Ros	
Heat shock protein 70 family	AOA0R0GRW1	9,70	33672,85	5261,86	3	12,54	4145	0	-	-	-	UNIQUE ENS
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	I1K135	8,20	36633,91	3409,44	5	20,18	13375	0	-	-	-	UNIQUE ENS
Ras-related protein RABE1c-like	AOA0R0F5U2	7,96	24075,25	3061,42	2	12,50	11514	0	-	-	-	UNIQUE ENS
Heat shock protein 90	AOA0R0IGH3	9,42	52142,81	2059,81	6	21,04	9375	0	-	-	-	UNIQUE ENS
Glutamate decarboxylase	A8C8H5	5,47	57590,90	1360,08	6	25,45	13108	0	-	-	-	UNIQUE ENS
DYW_deaminase domain-containing protein	K7L6W2	7,58	30214,61	675,58	2	6,37	52388	0	-	-	-	UNIQUE ENS
Carboxypeptidase	I1LTM9	4,95	54749,85	429,53	2	8,21	45914	0	-	-	-	UNIQUE ENS



**Figura 7.** Análise dos processos biológicos das proteínas únicas identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.



**Figura 8.** Análise dos processos biológicos das proteínas únicas identificadas nos tegumentos de *C. rosea* (CR) durante a análise

**proteômica.** Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.

As proteínas aumentadas (UP) e diminuídas (DOWN) nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) estão mostradas nas tabelas 3 e 4. A determinação da classificação dos processos biológicos dos quais essas proteínas participam, mostrou que houve uma repetição de proteínas entre os diferentes processos biológicos. Dentre as 38 proteínas aumentadas (UP), proteínas relacionadas com processos do metabolismo de carboidratos, respostas a estresses e processos celulares foram as mais numerosas (Figura 9). Em relação as funções biológicas, se destacaram atividades como de hidrolases, proteínas de ligação e formação de estrutura ribossomal. Os acessos A0A0R0IJW2, K7NKE1, A0A0R0IVM8 (urease, quitinase e lipoxigenase respectivamente) estão relacionadas à defesa, vale ressaltar a presença de uma quitinase, clássica proteína de defesa, entre essas proteínas UP (acesso K7NKE1). Nas análises das 95 proteínas diminuídas (DOWN) nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) foi possível destacar algumas que participam em eventos biológicos como processos celulares e metabolismo de outras proteínas (Figura 10). Pode-se destacar os acessos I1LC49 e A0A0R0GHM2 sendo relacionados à defesa. Analisando as 156 proteínas identificadas em ambos os tegumentos e que não diferiram em expressão, também destacaram funções de respostas ao estresse, metabolismo de carboidrato e envolvidas em processos celulares e de organização (Tabela 5).

**Tabela 3. Proteínas UP identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**

Description	Accession	IEP	mw	max score	reported peptides	sequence coverage	Average		Teste T	Log2 Fold Change	Differential accumulation
							CE	CR			
Heat shock cognate 70 kDa protein	AOA0R4J4D6	4,91	71480,76	13108,00	25	45,92	45487	25250	0,0049	0,85	UP
Heat shock protein 70 family domain-containing protein	I1MT10	5,09	71264,90	12708,65	21	34,73	132819	54319	0,0001	1,29	UP
Actin	I1K9V8	4,47	29244,70	11394,53	15	62,55	76423	33526	0,0022	1,19	UP
Phosphopyruvate hydratase	C6T7Y1	5,16	41924,99	8349,18	19	59,95	200756	75379	0,0006	1,41	UP
Urease	I1JPW5	5,35	47943,49	6555,70	16	42,12	57338	35549	0,0105	0,69	UP
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	AOA0R0IJW2	5,03	70278,75	5225,59	8	13,84	136599	56297	0,0475	1,28	UP
Pectinesterase	I1JRI7	5,57	15349,84	4634,47	2	15,13	86484	10411	0,0009	3,05	UP
Fructose-bisphosphate aldolase	I1MK76	7,64	55139,13	3686,66	8	21,34	136981	39652	0,0000	1,79	UP
Heat shock protein 90-1	I1JH86	7,34	38492,60	3587,13	10	35,75	55873	29176	0,0030	0,94	UP
Chitinase	I1L314	4,76	80674,54	3300,14	17	29,33	30232	5882	0,0005	2,36	UP
Late embryogenesis abundant protein	K7KNE1	9,59	33042,57	3082,77	3	7,72	170281	82838	0,0499	1,04	UP
60S ribosomal protein L11	Q39871	6,29	50643,91	2706,46	4	10,15	122113	75820	0,0037	0,69	UP
EF1_GNE domain-containing protein	I1MIK9	10,36	19659,72	2614,05	2	14,20	41638	19812	0,0002	1,07	UP
WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	AOA0R0JI98	4,22	25089,27	2458,86	4	26,52	29114	9540	0,0041	1,61	UP
5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate--homocysteine S-methyltransferase	C6TJD3	7,62	36147,62	2418,45	9	39,38	225650	59601	0,0003	1,92	UP
EF1_GNE domain-containing protein	AOA0R4JSZ8	5,92	84442,58	2203,66	11	19,79	42546	20001	0,0322	1,09	UP
Calmodulin-2	I1LWB8	4,31	24315,31	2035,74	4	34,82	19285	6878	0,0005	1,49	UP
Fn3_like domain-containing protein	P62163	3,91	16888,76	2015,82	2	22,82	39012	13818	0,0096	1,50	UP
Annexin	K7LBP9	8,32	84906,58	1966,33	6	11,50	269491	101655	0,0166	1,41	UP
Cell division cycle protein 48 homolog	AOA0R4J4L3	7,96	36048,82	1855,08	4	26,92	21337	13102	0,0100	0,70	UP
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	I1JPP3	4,95	90479,27	1561,00	21	35,77	6581	2442	0,0004	1,43	UP
60S acidic ribosomal protein P0	I1M2F5	6,10	21125,93	1356,41	4	24,75	38931	11082	0,0001	1,81	UP
Non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase	C6TGA6	4,81	34246,37	1295,84	4	20,69	75452	49398	0,0005	0,61	UP
40S ribosomal protein S19-3	I1JMY1	5,79	74404,74	1244,38	7	10,50	13927	3028	0,0000	2,20	UP
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	C6SVR8	10,60	16020,46	1154,56	2	16,78	19794	8802	0,0033	1,17	UP
Calnexin homolog	AOA0R4J3V9	6,10	21760,88	1078,51	3	20,49	52009	17275	0,0038	1,59	UP
	AOA0R0K6C1	4,61	61889,33	1017,37	5	14,79	22187	7447	0,0011	1,57	UP

<b>Chaperonin Cpn</b>	I1NHW4	5,58	61591,76	1012,20	9	23,13	24535	12670	0,0013	0,95	<b>UP</b>
<b>NAD(P)H dehydrogenase (quinone)</b>	AOA0ROH7E5	6,10	20421,37	1006,98	3	26,56	30389	9730	0,0237	1,64	<b>UP</b>
<b>Beta-galactosidase</b>	AOA0ROGTD1	8,13	88968,66	818,67	3	4,30	17785	6914	0,0038	1,36	<b>UP</b>
<b>Calreticulin</b>	AOA0ROEJA3	4,28	48673,52	757,39	5	13,98	18287	7575	0,0005	1,27	<b>UP</b>
<b>UDP-glucose 6-dehydrogenase</b>	I1J5Y9	6,34	53556,33	745,57	2	4,58	13358	3362	0,0298	1,99	<b>UP</b>
<b>60S ribosomal protein L3</b>	I1LDE9	10,60	44670,11	710,28	5	11,83	25085	15833	0,0370	0,66	<b>UP</b>
<b>Lipoxygenase OS=Glycine max</b>	AOA0ROIVM8	6,85	93103,23	661,70	4	5,45	75760	37470	0,0000	1,02	<b>UP</b>
<b>Chaperonin Cpn</b>	I1LAL4	5,88	61432,60	597,69	6	12,70	16345	10248	0,0036	0,67	<b>UP</b>
<b>Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase</b>	I1K775	4,60	48722,69	571,94	3	10,24	29138	7058	0,0054	2,05	<b>UP</b>
<b>Lysosomal beta A mannosidase</b>	AOA0ROHTJ4	6,05	#####	202,28	2	2,35	17538	9976	0,0060	0,81	<b>UP</b>
<b>Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase</b>	I1K775	4,60	48722,69	571,94	3	10,24	29138	7058	0,0054	2,05	<b>UP</b>
<b>Lysosomal beta A mannosidase</b>	AOA0ROHTJ4	6,05	#####	202,28	2	2,35	17538	9976	0,0060	0,81	<b>UP</b>

**Tabela 4. Proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**

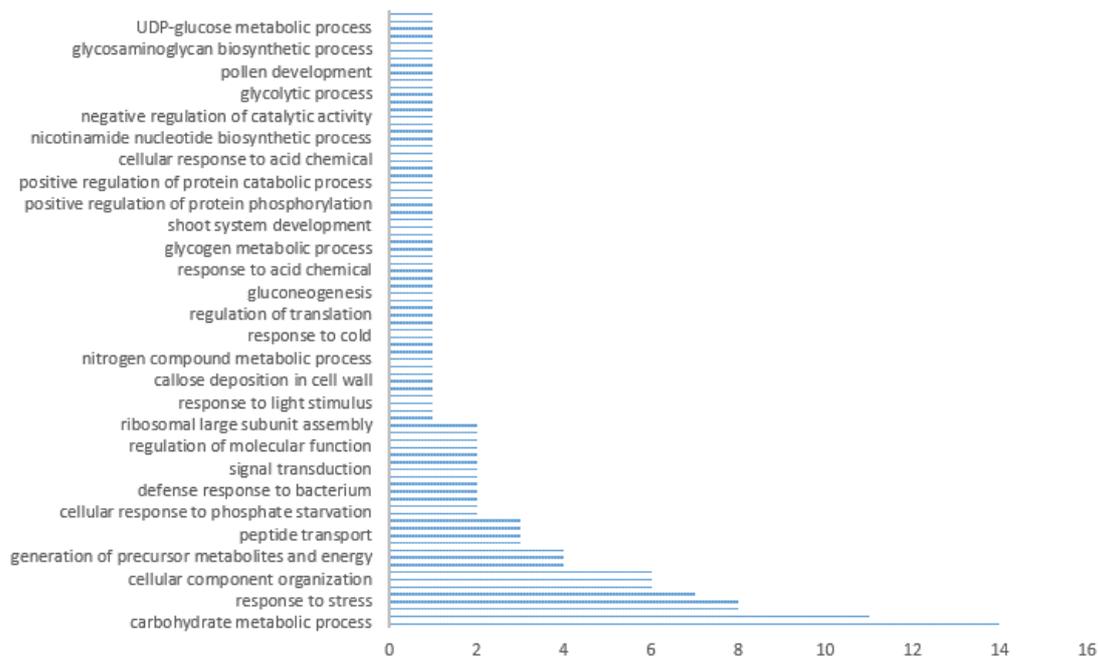
Description	Accession	IEP	mw	max score	reported peptides	sequence coverage	Average		Teste T	Log2 Fold	Diferential accumulation
							CE	CR			
Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	AOA0R0IAF2	5,55	17509,23	12103,90	6	47,53	84936	178987	0,0020	-1,08	DOWN
Malate dehydrogenase	H2D5S3	5,87	35546,81	11690,67	9	39,33	80650	134003	0,0276	-0,73	DOWN
Heat shock protein 70 family O	I1JGR5	5,01	72025,53	11605,43	22	39,42	73216	132546	0,0010	-0,86	DOWN
Glucose and ribitol dehydrogenase	AOA0R4J681	7,25	32074,31	11542,95	6	31,06	82887	163564	0,0001	-0,98	DOWN
Nudix hydrolase domain-containing protein	AOA0R0EI08	4,85	29129,23	10516,62	6	25,97	92100	141443	0,0134	-0,62	DOWN
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AOA0R0KA84	7,45	36955,26	9887,19	10	47,34	39529	83662	0,0031	-1,08	DOWN
Actin	I1MDT4	5,16	41823,85	8462,52	19	58,09	8036	17541	0,0396	-1,13	DOWN
Peroxiredoxin	I1KRJ7	6,51	24557,20	8407,02	7	37,16	70785	222745	0,0000	-1,65	DOWN
HSP90-1	D6C4Z9	4,75	80665,61	7370,91	21	37,61	53445	106693	0,0000	-1,00	DOWN
Phosphopyruvate hydratase	I1NAI7	5,24	47958,46	7272,12	14	38,96	35137	65242	0,0195	-0,89	DOWN
Ni-binding urease accessory protein UreG	Q9XGS2	5,91	30316,84	6820,72	4	27,01	16917	116936	0,0004	-2,79	DOWN
Heat shock protein 70 family ]	K7L2A2	5,67	69685,43	5675,07	6	15,97	14475	23969	0,0080	-0,73	DOWN
Cyanate hydratase ]	C6SX1	7,45	18722,45	5659,16	4	30,91	6962	86404	0,0000	-3,63	DOWN
Heat shock protein 70 family	AOA0R0FY49	7,85	72048,56	5508,88	5	13,57	5659	12495	0,0020	-1,14	DOWN
Triosephosphate isomerase, cytosolic	AOA0R0G6T3	5,82	27426,24	5273,67	5	21,34	23343	60959	0,0018	-1,38	DOWN
Heat shock protein 70 family	AOA0R0FEK6	6,79	67652,19	5257,08	6	14,12	5323	13570	0,0131	-1,35	DOWN
Glucose and ribitol dehydrogenase	AOA0R0I4F6	7,13	32170,38	5213,40	5	21,84	24959	59504	0,0016	-1,25	DOWN
Alpha-mannosidase	I1JCF7	6,63	114513,08	5181,04	16	20,16	186731	395979	0,0031	-1,08	DOWN
C1_2 domain-containing protein	K7K753	6,92	101012,70	4686,92	5	8,74	10986	22368	0,0008	-1,03	DOWN
UDP-arabinopyranose mutase	AOA0R0FDT6	5,51	40681,65	4579,99	10	34,84	23712	51815	0,0015	-1,13	DOWN
Alcohol dehydrogenase	I1KAJ5	5,72	37485,45	4283,25	6	27,30	80006	171657	0,0007	-1,10	DOWN
Glutathione S-transferase 3	P46417	5,44	26129,14	4266,43	3	11,87	25759	119186	0,0021	-2,21	DOWN
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	I1N6A5	5,18	110911,70	3989,02	26	37,21	36678	82815	0,0125	-1,17	DOWN
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	AOA0R0H9T5	7,85	18354,72	3798,33	3	25,00	17060	47955	0,0237	-1,49	DOWN
Nudix hydrolase domain-containing protein	AOA0R0GRC9	4,93	72939,26	3738,35	11	21,13	70409	307209	0,0001	-2,13	DOWN
Phosphopyruvate hydratase	I1MQ89	6,03	48260,94	3457,24	11	27,64	77045	123977	0,0013	-0,69	DOWN
ATP synthase subunit beta	AOA0R4J4C8	5,74	59950,31	3434,55	11	30,95	77333	121059	0,0035	-0,65	DOWN
Malic enzyme	AOA0R0K5X0	7,31	54954,31	3408,49	4	16,53	3810	14334	0,0048	-1,91	DOWN
Tubulin alpha chain	I1J9I1	4,74	50326,43	3378,64	4	13,75	6485	11108	0,0258	-0,78	DOWN

40S ribosomal protein S16	I1KQE3	10,55	17597,56	3365,46	2	16,13	22130	38638	0,0189	-0,80	<b>DOWN</b>
Aldose 1-epimerase	I1N4B8	9,67	40846,77	3354,62	5	16,17	43740	110764	0,0030	-1,34	<b>DOWN</b>
Peroxidase	I1NH45	6,97	39485,80	3314,84	2	8,99	50213	84743	0,0383	-0,76	<b>DOWN</b>
UDP-arabinopyranose mutase	I1KD37	5,89	41358,35	3251,38	6	19,06	46810	71422	0,0096	-0,61	<b>DOWN</b>
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	I1LWR4	5,41	110609,47	3115,85	24	30,88	67961	169196	0,0001	-1,32	<b>DOWN</b>
Proteasome subunit alpha type	C6TG97	5,49	27550,29	3103,96	4	22,49	20469	35746	0,0056	-0,80	<b>DOWN</b>
Cell division cycle protein 48 homolog	I1JXA0	4,93	91624,57	3002,96	22	40,66	30397	52600	0,0011	-0,79	<b>DOWN</b>
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	I1JWK3	6,41	89120,78	2956,00	13	23,03	41375	63848	0,0064	-0,63	<b>DOWN</b>
Poly [ADP-ribose] polymerase	I1LKS7	5,16	78952,32	2884,52	9	22,14	38966	66181	0,0178	-0,76	<b>DOWN</b>
Peptidase A1 domain-containing protein	AOA0ROJPL6	8,16	50870,74	2879,96	4	19,66	101228	245755	0,0052	-1,28	<b>DOWN</b>
Alcohol dehydrogenase 1	I1MA91	6,33	41177,82	2842,74	8	23,72	61121	140246	0,0025	-1,20	<b>DOWN</b>
Tubulin beta chain (Fragment)	P28551	5,55	46378,55	2486,68	11	38,73	18776	34760	0,0029	-0,89	<b>DOWN</b>
Fructose-bisphosphate aldolase	I1JPX8	6,37	38853,03	2362,58	9	32,12	7526	34632	0,0008	-2,20	<b>DOWN</b>
Cip R domain-containing protein	AOA0R0K0U9	5,87	101562,96	2335,70	11	21,51	23190	50028	0,0165	-1,11	<b>DOWN</b>
UDP-glucose 4-epimerase	I1KP71	8,34	39426,85	2148,82	6	22,29	15676	40254	0,0010	-1,36	<b>DOWN</b>
Formate--tetrahydrofolate ligase	I1NJ85	6,53	68007,84	1929,68	7	16,51	11056	22336	0,0117	-1,01	<b>DOWN</b>
GTP-binding protein SAR1A	C6SZI8	6,63	22176,56	1859,87	2	12,44	17467	29114	0,0032	-0,74	<b>DOWN</b>
Aldose 1-epimerase	I1L522	9,63	40877,82	1837,82	4	13,21	15086	54839	0,0002	-1,86	<b>DOWN</b>
Proteasome subunit alpha type	I1KTZ5	8,90	25047,69	1832,69	4	31,88	12268	21905	0,0011	-0,84	<b>DOWN</b>
Xylose isomerase	AOA0R0F8Z5	6,35	54325,82	1788,02	7	18,24	16166	57802	0,0000	-1,84	<b>DOWN</b>
Fn3_like domain-containing protein	I1MGH2	8,05	84986,53	1779,85	5	8,90	615	27183	0,0003	-5,47	<b>DOWN</b>
Carboxypeptidase	AOA0R0E5C1	6,45	49608,72	1770,41	5	12,05	58989	119417	0,0012	-1,02	<b>DOWN</b>
Malic enzyme	I1MM08	5,66	65479,88	1713,19	5	11,17	786	14320	0,0072	-4,19	<b>DOWN</b>
Proteasome subunit beta	I1JXI9	5,71	29438,27	1663,41	2	15,81	14849	27641	0,0301	-0,90	<b>DOWN</b>
Beta-hexosaminidase	I1LFD4	7,95	61867,52	1632,39	4	9,58	13524	37122	0,0010	-1,46	<b>DOWN</b>
Carboxypeptidase	K7NOR3	6,61	50159,40	1611,09	2	5,39	53872	144112	0,0000	-1,42	<b>DOWN</b>
Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	I1KL47	4,83	50109,48	1605,37	6	17,98	14626	27255	0,0022	-0,90	<b>DOWN</b>
Voltage-dependent anion-selective channel	I1LWIS	9,48	29762,67	1544,41	2	11,59	17193	26710	0,0246	-0,64	<b>DOWN</b>
Formate--tetrahydrofolate ligase	I1LFG6	7,24	68195,22	1478,26	6	13,68	11458	33466	0,0001	-1,55	<b>DOWN</b>
Alpha-galactosidase	K7KQU3	8,32	67770,84	1466,70	3	6,37	33689	90509	0,0021	-1,43	<b>DOWN</b>

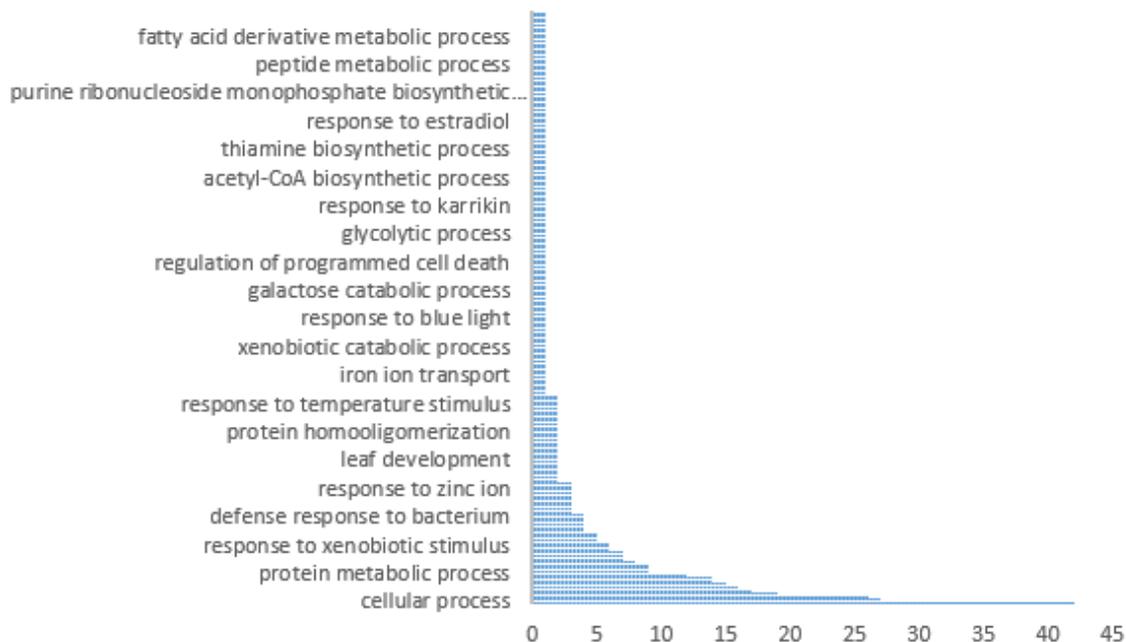
40S ribosomal protein S16	I1KQE3	10,55	17597,56	3365,46	2	16,13	22130	38638	0,0189	-0,80	DOWN
Aldose 1-epimerase	I1N4B8	9,67	40846,77	3354,62	5	16,17	43740	110764	0,0030	-1,34	DOWN
Peroxidase	I1NH45	6,97	39485,80	3314,84	2	8,99	50213	84743	0,0383	-0,76	DOWN
UDP-arabinopyranose mutase	I1KD37	5,89	41358,35	3251,38	6	19,06	46810	71422	0,0096	-0,61	DOWN
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	I1LWR4	5,41	110609,47	3115,85	24	30,88	67961	169196	0,0001	-1,32	DOWN
Proteasome subunit alpha type	C6TG97	5,49	27550,29	3103,96	4	22,49	20469	35746	0,0056	-0,80	DOWN
Cell division cycle protein 48 homolog	I1JXA0	4,93	91624,57	3002,96	22	40,66	30397	52600	0,0011	-0,79	DOWN
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	I1JWK3	6,41	89120,78	2956,00	13	23,03	41375	63848	0,0064	-0,63	DOWN
Poly [ADP-ribose] polymerase	I1LKS7	5,16	78952,32	2884,52	9	22,14	38966	66181	0,0178	-0,76	DOWN
Peptidase A1 domain-containing protein	AOA0R0JPL6	8,16	50870,74	2879,96	4	19,66	101228	245755	0,0052	-1,28	DOWN
Alcohol dehydrogenase 1	I1MA91	6,33	41177,82	2842,74	8	23,72	61121	140246	0,0025	-1,20	DOWN
Tubulin beta chain (Fragment)	P28551	5,55	46378,55	2486,68	11	38,73	18776	34760	0,0029	-0,89	DOWN
Fructose-bisphosphate aldolase	I1JPX8	6,37	38853,03	2362,58	9	32,12	7526	34632	0,0008	-2,20	DOWN
Clp R domain-containing protein	AOA0R0K0U9	5,87	101562,96	2335,70	11	21,51	23190	50028	0,0165	-1,11	DOWN
UDP-glucose 4-epimerase	I1KP71	8,34	39426,85	2148,82	6	22,29	15676	40254	0,0010	-1,36	DOWN
Formate--tetrahydrofolate ligase	I1NJ85	6,53	68007,84	1929,68	7	16,51	11056	22336	0,0117	-1,01	DOWN
GTP-binding protein SAR1A	C6SZI8	6,63	22176,56	1859,87	2	12,44	17467	29114	0,0032	-0,74	DOWN
Aldose 1-epimerase	I1LSZ2	9,63	40877,82	1837,82	4	13,21	15086	54839	0,0002	-1,86	DOWN
Proteasome subunit alpha type	I1KTZ5	8,90	25047,69	1832,69	4	31,88	12268	21905	0,0011	-0,84	DOWN
Xylose isomerase	AOA0R0F8Z5	6,35	54325,82	1788,02	7	18,24	16166	57802	0,0000	-1,84	DOWN
Fn3_like domain-containing protein	I1MGH2	8,05	84986,53	1779,85	5	8,90	615	27183	0,0003	-5,47	DOWN
Carboxypeptidase	AOA0R0E5C1	6,45	49608,72	1770,41	5	12,05	58989	119417	0,0012	-1,02	DOWN
Malic enzyme	I1MM08	5,66	65479,88	1713,19	5	11,17	786	14320	0,0072	-4,19	DOWN
Proteasome subunit beta	I1JXI9	5,71	29438,27	1663,41	2	15,81	14849	27641	0,0301	-0,90	DOWN
Beta-hexosaminidase	I1LFD4	7,95	61867,52	1632,39	4	9,58	13524	37122	0,0010	-1,46	DOWN
Carboxypeptidase	K7NOR3	6,61	50159,40	1611,09	2	5,39	53872	144112	0,0000	-1,42	DOWN
Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	I1KL47	4,83	50109,48	1605,37	6	17,98	14626	27255	0,0022	-0,90	DOWN
Voltage-dependent anion-selective channel	I1LW15	9,48	29762,67	1544,41	2	11,59	17193	26710	0,0246	-0,64	DOWN
Formate--tetrahydrofolate ligase	I1LFG6	7,24	68195,22	1478,26	6	13,68	11458	33466	0,0001	-1,55	DOWN
Alpha-galactosidase	K7KQU3	8,32	67770,84	1466,70	3	6,37	33689	90509	0,0021	-1,43	DOWN

Expansin	I1LK21	9,90	24839,09	1466,20	2	13,18	20290	50062	0,0062	-1,30	DOWN
Lyase_1 domain-containing protein	I1JV69	5,24	37898,23	1455,63	2	6,53	14092	30810	0,0052	-1,13	DOWN
Pectin acetylesterase	I1MMH6	8,25	44986,66	1439,21	3	10,53	10927	33194	0,0121	-1,60	DOWN
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	AOA0R0G869	5,30	38256,55	1408,06	3	10,76	13884	21176	0,0353	-0,61	DOWN
Peptidase A1 domain-containing protein	I1LC49	8,20	47908,81	1363,11	2	5,18	18545	72920	0,0178	-1,98	DOWN
Thiamine thiazole synthase, chloroplastic	Q9SLR8	5,73	36685,15	1303,00	5	18,26	5576	25997	0,0028	-2,22	DOWN
PPM-type phosphatase domain-containing protein	I1LT76	6,40	26721,37	1284,84	4	20,66	13686	31921	0,0070	-1,22	DOWN
Protein disulfide-isomerase	C6T9F8	4,96	30890,76	1275,37	3	11,23	12466	19090	0,0017	-0,61	DOWN
CBS domain-containing protein	I1MCF0	5,96	45652,41	1216,92	2	5,33	18559	66618	0,0012	-1,84	DOWN
Aldedh domain-containing protein	I1KXG9	7,32	58729,93	1199,79	5	12,50	24383	43108	0,0162	-0,82	DOWN
Fructose-bisphosphate aldolase	I1LEQ9	7,73	32805,38	1183,99	2	14,05	10139	16354	0,0318	-0,69	DOWN
Malate dehydrogenase	I1JZP0	6,52	43933,98	1166,10	3	14,53	11401	17917	0,0131	-0,65	DOWN
Alpha-galactosidase	I1N3A6	6,82	46145,52	1153,18	4	8,29	12171	60216	0,0020	-2,31	DOWN
Alpha-mannosidase	AOA0R0EK76	6,00	113335,09	1140,24	6	7,50	32835	71043	0,0067	-1,11	DOWN
Beta-galactosidase	I1M4L8	5,96	70923,07	1108,26	6	10,68	18882	59122	0,0003	-1,65	DOWN
Germin-like protein	C7S8D5	9,44	22960,44	1061,80	2	13,30	5841	30899	0,0002	-2,40	DOWN
Beta-galactosidase	I1KGC4	8,32	94719,21	1050,27	3	4,14	13268	31997	0,0076	-1,27	DOWN
Clp R domain-containing protein	I1KD00	6,16	83563,25	1050,12	9	15,27	20566	33942	0,0072	-0,72	DOWN
Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	I1K5M9	5,19	63741,92	1027,88	11	22,85	19840	30943	0,0061	-0,64	DOWN
Lipoxygenase	AOA0R0GHM2	5,84	80845,63	1015,81	4	7,67	26840	41551	0,0310	-0,63	DOWN
Alpha-galactosidase	I1KB92	5,77	48107,24	989,63	4	10,21	24022	43897	0,0012	-0,87	DOWN
Ferritin	C6TCN5	5,65	28249,85	968,29	4	17,60	27659	62062	0,0345	-1,17	DOWN
Carboxypeptidase	AOA0R0EBE6	9,06	33193,00	889,17	3	8,03	5343	21069	0,0017	-1,98	DOWN
Catalase-3	O48560	6,81	57253,34	802,77	4	11,59	13357	42940	0,0050	-1,68	DOWN
TENA_THI-4 domain-containing protein	AOA0R0JD77	7,79	34115,12	740,20	2	6,46	19768	50341	0,0469	-1,35	DOWN
Non-specific phospholipase C3	I1MM42	5,72	48003,13	724,49	3	10,17	11129	29417	0,0171	-1,40	DOWN
Lactoylglutathione lyase	Q9ZS21	5,51	21016,76	713,05	3	15,14	14631	31330	0,0278	-1,10	DOWN
Aldo_ket_red domain-containing protein	I1LAJ3	7,72	36861,01	624,37	3	13,11	9542	17756	0,0229	-0,90	DOWN
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	K7N100	5,12	111541,67	606,57	6	5,15	5101	14415	0,0465	-1,50	DOWN

<b>UDP-glucose 4-epimerase</b>	I1JAE4	6,65	35369,28	592,36	3	13,35	9808	16014	0,0134	-0,71	<b>DOWN</b>
<b>Phosphoenolpyruvate carboxylase</b>	I1KEN4	5,39	110846,35	563,52	5	7,45	8661	16387	0,0148	-0,92	<b>DOWN</b>
<b>Allene-oxide cyclase</b>	F6KBT4	8,76	27898,48	533,60	2	10,28	14231	21748	0,0237	-0,61	<b>DOWN</b>
<b>Oligopeptidase A</b>	I1L4U3	5,88	88836,13	529,05	3	5,72	12188	23759	0,0244	-0,96	<b>DOWN</b>
<b>Glyco_transf_5 domain-containing protein</b>	A0A0R0HUM4	9,01	50678,97	527,39	3	7,96	16883	46187	0,0126	-1,45	<b>DOWN</b>
<b>Harpin binding protein 1</b>	Q5QJB6	8,62	28488,56	490,48	3	14,72	9064	14116	0,0207	-0,64	<b>DOWN</b>
<b>Ligase_CoA domain-containing protein</b>	I1L0Q8	6,43	49570,82	455,12	4	11,79	7367	11589	0,0341	-0,65	<b>DOWN</b>
<b>Ketol-acid reductoisomerase</b>	I1LUL9	6,93	63726,48	380,63	2	4,27	10930	29805	0,0052	-1,45	<b>DOWN</b>



**Figura 9. Análise dos processos biológicos das proteínas UP identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**



**Figura 10. Análise dos processos biológicos das proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox.**

**Tabela 5. Proteínas DOWN identificadas nos tegumentos de *C. ensiformis* (CE) durante a análise proteômica. Os dados foram gerados automaticamente pelo software OmicsBox**

Description	Accession	IEP	mw	max score	reported peptides	sequence coverage	Average		Teste T	Log2 Fold Change	Diferential accumulation
							CE	CR			
Heat shock cognate 70 kDa protein	I1JPC5	4,78	67981,82	11404,00	24	42,65	39449	50894	0,1209	-0,37	UNCHANGED
Malate dehydrogenase	Q9SPB8	8,23	36369,91	11302,51	9	32,75	107066	134290	0,0073	-0,33	UNCHANGED
Heat shock cognate 70 kDa protein	AOA0ROFH00	4,90	71632,08	11118,90	26	50,08	10192	12130	0,1717	-0,25	UNCHANGED
Histone H4	POCG89	11,88	11409,40	10185,98	6	57,28	71824	63425	0,5026	0,18	UNCHANGED
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C6TD56	7,35	37128,43	10002,63	13	45,59	155603	205931	0,1210	-0,40	UNCHANGED
ADP-ribosylation factor	I1J585	9,14	17692,51	9468,96	9	64,71	57764	25540	0,0566	1,18	UNCHANGED
Luminal-binding protein 5	I1KPN3	4,89	73705,52	8870,23	22	39,88	84388	57223	0,3859	0,56	UNCHANGED
Luminal-binding protein 5	I1KPN5	4,95	78400,88	8800,01	20	37,01	170516	123201	0,5282	0,47	UNCHANGED
Actin	I1KUG6	5,16	41793,82	8498,83	22	62,60	988559	939026	0,7871	0,07	UNCHANGED
Alcohol dehydrogenase 1	I1LXD1	7,85	39382,86	7839,64	7	27,73	113476	75984	0,2869	0,58	UNCHANGED
Oleosin	C3VHQ8	8,43	17473,87	7523,38	2	6,67	361184	295077	0,0458	0,29	UNCHANGED
Elongation factor 1-alpha	AOA0ROESZ8	9,41	49622,26	7410,48	15	43,18	262361	241002	0,5196	0,12	UNCHANGED
Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	I1JYL5	5,39	16033,31	6933,10	4	45,00	50052	35192	0,0242	0,51	UNCHANGED
Actin	I1KBG2	5,24	37264,75	6863,98	16	56,33	21277	23988	0,4224	-0,17	UNCHANGED
Desiccation-related protein PCC13-62	K7LYD9	7,67	33584,77	6702,39	2	8,04	334887	436440	0,0468	-0,38	UNCHANGED
Superoxide dismutase	A5JVZ7	9,06	26706,49	6656,73	3	27,80	208205	151838	0,3444	0,46	UNCHANGED
Glucose and ribitol dehydrogenase-like	AOA0ROJ965	6,47	35014,75	6635,56	4	13,79	66182	108739	0,1622	-0,72	UNCHANGED
GTP-binding nuclear protein	AOA0ROJJA1	6,42	25474,85	6436,60	6	41,18	49961	59422	0,1065	-0,25	UNCHANGED
Histone H2B	AOA0ROH449	10,55	14683,30	6337,19	3	26,32	63518	47266	0,0424	0,43	UNCHANGED
HATPase_c domain-containing protein	I1JJL6	4,77	80614,55	6241,86	16	29,63	92108	85897	0,1880	0,10	UNCHANGED
Urease	I1K3K3	5,64	91022,62	6192,19	11	17,04	202337	180510	0,1653	0,16	UNCHANGED
Seed maturation protein PM22	Q9XER5	4,96	16745,40	5936,63	3	26,97	86466	134515	0,0914	-0,64	UNCHANGED
Ubiquitin-like domain-containing protein	C6T4R9	10,15	17895,70	5898,09	6	45,81	110409	86447	0,0945	0,35	UNCHANGED
GUB_WAK_bind domain-containing protein	AOA0ROI158	7,42	41090,07	5717,79	6	21,61	13299	8929	0,0033	0,57	UNCHANGED
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	I1LM73	5,16	52073,66	5514,07	13	43,58	29451	47533	0,1201	-0,69	UNCHANGED
14_3_3 domain-containing protein	AOA0ROJ4X0	4,50	29161,79	5094,81	9	28,02	48111	35179	0,0008	0,45	UNCHANGED

Late embryogenesis abundant protein D-34-like	I1LE41	4,55	26296,07	4727,87	3	18,75	77820	100559	0,2293	-0,37	UNCHANGED
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	I1MBR7	5,03	51586,10	4674,71	15	46,91	85832	113817	0,1264	-0,41	UNCHANGED
Phosphoglycerate kinase	AOAOR0IRH4	6,29	42392,00	4670,44	8	30,17	144689	80562	0,2616	0,84	UNCHANGED
40S ribosomal protein S14	AOAOR0FZ23	11,44	16379,80	4409,96	5	49,33	18425	14834	0,3578	0,31	UNCHANGED
Malic enzyme	K7KRR3	6,37	65764,19	4131,53	6	15,23	395035	610748	0,1049	-0,63	UNCHANGED
Lactoylglutathione lyase	I1KZT2	5,64	32524,01	4104,48	7	27,87	65113	82618	0,2028	-0,34	UNCHANGED
Peroxygenase (Fragment)	AOAOR0HVK7	6,05	22235,18	3886,91	2	12,69	109947	124380	0,0707	-0,18	UNCHANGED
Low-temperature-induced cysteine proteinase-like	I1MXL3	5,43	53313,12	3807,17	7	22,48	126567	166265	0,0332	-0,39	UNCHANGED
GTP-binding protein YPTM2-like	I1KOU9	6,88	20934,72	3612,27	3	24,73	28905	26377	0,0206	0,13	UNCHANGED
14_3_3 domain-containing protein	AOAOR0JEI9	4,61	28479,18	3397,09	6	30,00	19535	15688	0,0010	0,32	UNCHANGED
Tubulin alpha chain	I1K3X9	4,82	50289,57	3373,64	5	20,04	24813	18929	0,4732	0,39	UNCHANGED
synthase subunit alpha, mitochondrial	Q01915	6,20	55615,84	3325,24	13	34,45	57528	79022	0,0672	-0,46	UNCHANGED
40S ribosomal protein SA	AOAOR0J3D8	5,48	31057,40	3286,68	10	50,36	54342	49463	0,6371	0,14	UNCHANGED
Tr-type G domain-containing protein	I1KU21	5,72	95012,98	3276,41	18	34,88	49535	73648	0,0662	-0,57	UNCHANGED
PHB domain-containing protein	I1LW13	4,93	31836,12	3162,19	6	27,62	44867	30919	0,0728	0,54	UNCHANGED
Adenosylhomocysteinase	I1K3S5	5,50	53760,61	3113,43	13	30,93	42850	43859	0,8537	-0,03	UNCHANGED
Eukaryotic initiation factor 4A-11	AOAOR0K474	5,12	47021,65	3039,23	14	38,98	57622	70682	0,0597	-0,29	UNCHANGED
SKP1-like protein	AOAOR0HM17	4,35	17665,84	3022,00	2	18,06	21523	15042	0,3416	0,52	UNCHANGED
Fn3_like domain-containing protein	I1LVZ8	7,56	86453,02	2912,65	13	16,58	114307	93729	0,3216	0,29	UNCHANGED
GTP-binding protein SAR1A	CGT7H0	5,92	22141,58	2828,36	5	44,04	19671	19568	0,9666	0,01	UNCHANGED
Proteasome subunit beta	AOAOR4J321	5,00	25185,37	2811,90	3	14,16	16500	14153	0,4412	0,22	UNCHANGED
Eukaryotic initiation factor 4A-11	AOAOR4J3M1	5,20	46988,57	2799,86	11	34,62	22024	16429	0,0118	0,42	UNCHANGED
UDP-arabinopyranose mutase	I1J637	5,40	42281,28	2712,49	14	35,33	72133	65169	0,2728	0,15	UNCHANGED
Glutamine synthetase	AOAOR4J3P1	5,16	39319,14	2687,85	6	33,15	27688	29088	0,7957	-0,07	UNCHANGED
50S ribosomal protein L23, chloroplastic	C6S2Q3	10,65	17232,45	2645,70	3	19,21	28617	21203	0,0450	0,43	UNCHANGED
Fructose-bisphosphate aldolase	I1MB71	7,34	38581,78	2471,20	9	28,49	34768	29278	0,3611	0,25	UNCHANGED
Heat shock protein 70 family	K7K7B4	6,21	31045,88	2464,18	2	9,25	44936	49139	0,6757	-0,13	UNCHANGED
H(+)-exporting diphosphatase	AOAOR0IQF0	5,92	70178,95	2449,01	5	10,79	56750	27052	0,0728	1,07	UNCHANGED
UBC core domain-containing protein	I1LV61	6,14	16605,29	2427,09	2	22,97	10611	17778	0,0720	-0,74	UNCHANGED

14_3_3 domain-containing protein	I1KSE0	4,84	27998,49	2400,47	6	20,41	32204	26482	0,0166	0,28	UNCHANGED
Histone H2A	C6TMV8	11,11	15602,46	2200,54	2	21,62	59105	31043	0,1481	0,93	UNCHANGED
Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	I1NB77	11,55	14943,41	2199,96	2	18,66	47724	47424	0,9582	0,01	UNCHANGED
Protein disulfide-isomerase	I1KAB7	4,69	56400,26	2153,91	6	16,90	110745	103672	0,3346	0,10	UNCHANGED
Alpha-xylosidase 1	I1KWV4	6,16	103561,43	2101,57	8	12,63	51977	68843	0,0551	-0,41	UNCHANGED
EF1_GNE domain-containing protein	C6T034	4,33	24390,44	2088,67	4	28,25	26449	21590	0,3714	0,29	UNCHANGED
Glutathione transferase	K7KBB0	5,87	24951,66	2053,85	5	24,65	30272	39420	0,0957	-0,38	UNCHANGED
Protein ADP-ribosyltransferase PARP3	Q9SWB4	5,26	92829,84	2052,62	13	26,01	52348	71794	0,3397	-0,46	UNCHANGED
Lea protein	Q39873	7,40	49513,78	2044,80	5	8,52	71075	69606	0,8769	0,03	UNCHANGED
Glutamate decarboxylase	I1L3Z2	5,46	56341,66	2002,86	6	15,46	68202	63168	0,5325	0,11	UNCHANGED
Cell division cycle protein 48 homolog	I1LTL9	5,00	90586,40	1991,25	22	40,15	20038	24809	0,0090	-0,31	UNCHANGED
Pectinesterase	K7KZN7	7,86	130885,51	1981,64	5	4,56	21686	18013	0,0225	0,27	UNCHANGED
Aspartic proteinase	I1KZU7	5,19	56131,53	1944,34	3	6,51	12616	13383	0,7072	-0,09	UNCHANGED
Aldehyde dehydrogenase (NAD(+))	A0A0ROGC36	7,72	38929,75	1921,34	6	24,86	26761	19231	0,0092	0,48	UNCHANGED
Ribosomal_L6e_N domain-containing protein	A0A0R0ISR2	10,79	21148,98	1916,46	2	13,76	17407	19420	0,7198	-0,16	UNCHANGED
Annexin	A0A0ROGF16	8,95	33947,82	1900,40	5	16,22	50020	56896	0,5390	-0,19	UNCHANGED
Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	I1JB54	9,70	12115,04	1863,59	2	26,17	18959	19722	0,8239	-0,06	UNCHANGED
Aspartic proteinase	I1KNG0	6,48	56483,02	1862,58	4	14,40	26350	19307	0,5791	0,45	UNCHANGED
Alpha-xylosidase 1	A0A0R0I6K1	5,80	95862,67	1800,91	9	11,54	62830	56704	0,3918	0,15	UNCHANGED
Aldehyde dehydrogenase (NAD(+))	I1L1Q8	5,69	55157,94	1772,63	6	17,09	33898	23254	0,0032	0,54	UNCHANGED
Urease	Q949H4	5,73	91451,71	1765,06	7	9,32	481859	426219	0,3733	0,18	UNCHANGED
NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	I1K6M7	8,08	26269,88	1739,85	4	21,65	22810	18430	0,2213	0,31	UNCHANGED
60S ribosomal protein L35a-1	C6SXC3	10,94	12883,04	1728,51	2	23,21	15564	19073	0,3444	-0,29	UNCHANGED
UDP-arabinopyranose mutase	C6TAB7	5,37	41143,13	1696,72	6	16,53	12139	17215	0,0054	-0,50	UNCHANGED
CN hydrolase domain-containing protein	C6T972	5,20	38291,49	1682,78	2	9,14	45797	55274	0,0381	-0,27	UNCHANGED
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 5	C6T871	6,23	40442,65	1649,21	2	6,20	41184	55402	0,5704	-0,43	UNCHANGED
Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	I1KSQ3	6,20	33567,43	1616,60	6	30,30	8816	8724	0,8927	0,02	UNCHANGED

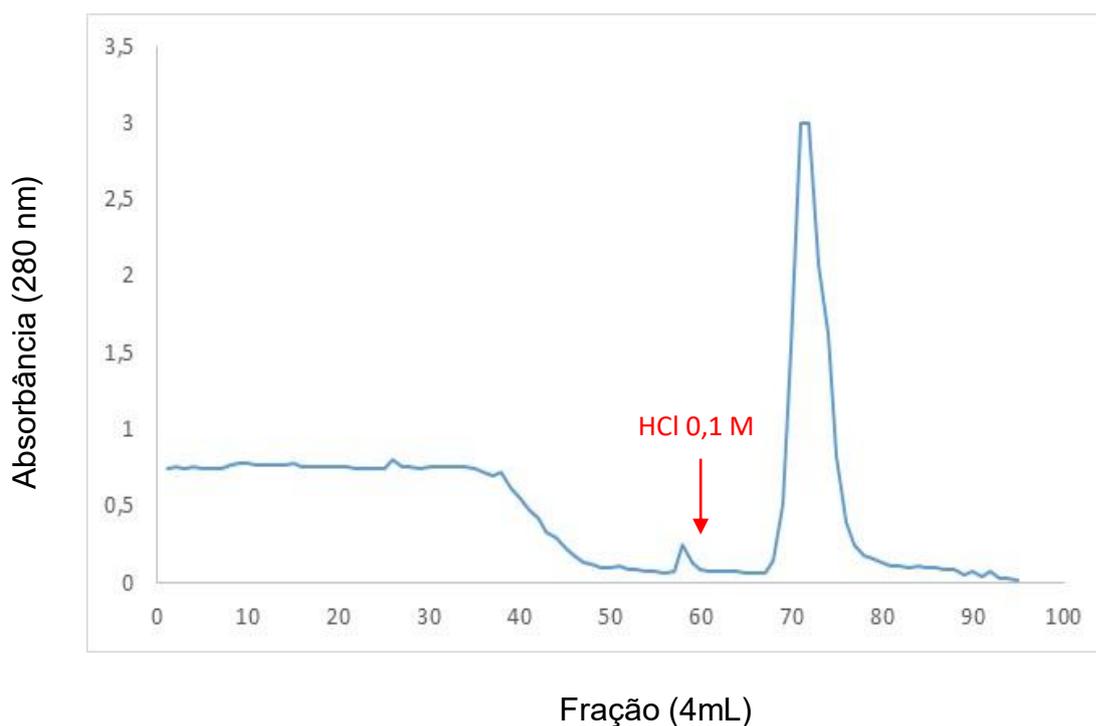
Vacuolar proton pump subunit B	K7MUJ9	5,25	48835,01	1592,09	10	35,91	36869	30494	0,5278	0,27	UNCHANGED
GTP-binding protein YPTM2	I1MJT7	4,67	20661,63	1571,14	2	14,84	12158	9677	0,1977	0,33	UNCHANGED
40S ribosomal protein S6	B2BF98	11,15	28259,89	1558,84	3	22,27	36913	24811	0,0080	0,57	UNCHANGED
40S ribosomal protein S3a	C6TLT3	10,24	29898,66	1538,37	4	17,24	19720	22889	0,3082	-0,22	UNCHANGED
Peptidase A1 domain-containing protein	A0A0R0G0P5	8,94	45712,78	1533,57	2	6,56	69050	99807	0,0270	-0,53	UNCHANGED
Late embryogenesis abundant protein LEA	I1L9S7	6,04	48795,62	1532,58	4	10,69	56251	46397	0,2337	0,28	UNCHANGED
Beta-hexosaminidase	I1JDS6	5,54	63364,89	1530,26	4	9,01	15753	13156	0,1806	0,26	UNCHANGED
V-type proton ATPase catalytic subunit A	I1KG34	5,18	69064,75	1505,69	13	35,47	30833	41435	0,0967	-0,43	UNCHANGED
EF1Bgamma class glutathione S-transferase	C6TNT2	5,84	47815,79	1475,26	6	17,42	114861	81543	0,0003	0,49	UNCHANGED
CYTOSOL_AP domain-containing protein	I1N7G4	6,38	61234,00	1460,01	5	12,54	33150	31496	0,7244	0,07	UNCHANGED
40S ribosomal protein S3a	I1NGJ0	10,61	26985,62	1458,71	4	15,88	11652	16799	0,1549	-0,53	UNCHANGED
Adenosylhomocysteinase	I1LN30	5,80	53959,73	1441,22	8	22,47	34849	49470	0,0444	-0,51	UNCHANGED
Phosphoglycerate kinase	A0A0R0GFW6	8,75	50066,77	1413,45	4	14,91	79456	63412	0,0408	0,33	UNCHANGED
Ribosomal_L16 domain-containing protein	A0A0R4J2Q7	10,77	25520,53	1413,25	5	29,28	23467	19660	0,4176	0,26	UNCHANGED
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	I1LXY2	8,04	69832,70	1397,44	9	18,50	13496	16944	0,0737	-0,33	UNCHANGED
Beta-conglycinin alpha subunit	I1NGH2	4,81	63572,49	1321,82	2	3,69	138173	115127	0,0788	0,26	UNCHANGED
60S ribosomal protein L12-3-like	C6TMB5	9,50	17947,79	1315,40	3	22,29	23806	19429	0,2210	0,29	UNCHANGED
Serine hydroxymethyltransferase	A0A0R4J3C9	6,96	52175,16	1311,68	6	16,35	27480	36105	0,0021	-0,39	UNCHANGED
Tubulin beta chain	I1K7J4	4,59	51093,16	1250,24	8	23,88	6692	9539	0,0377	-0,51	UNCHANGED
40S ribosomal protein S8	A0A0R0F0G7	10,89	22527,63	1203,14	2	15,23	27147	34187	0,3321	-0,33	UNCHANGED
CYTOSOL_AP domain-containing protein	I1JGP8	6,75	60076,83	1180,93	8	20,18	180906	146148	0,1511	0,31	UNCHANGED
Aspartate aminotransferase	I1K999	9,00	38898,35	1129,87	7	31,09	36295	25829	0,0480	0,49	UNCHANGED
Non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase	I1N8L6	5,08	74516,59	1103,65	5	7,10	27002	18072	0,0224	0,58	UNCHANGED
Ribosomal_S7 domain-containing protein	I1JFW7	9,64	21890,29	1079,56	3	18,97	21173	19175	0,4175	0,14	UNCHANGED
Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	I1LZ03	10,91	44718,90	1078,64	7	23,95	32289	45611	0,0362	-0,50	UNCHANGED
Arginase 1, mitochondrial	I1MUR2	5,92	36978,31	1059,97	3	8,88	91806	64067	0,0675	0,52	UNCHANGED
Thioredoxin-dependent peroxiredoxin	A0A0R0HQQ2	5,70	28473,28	1025,01	4	27,91	19035	16978	0,5623	0,17	UNCHANGED
PfkB domain-containing protein	I1MD61	4,89	35624,78	964,12	5	21,21	38350	36427	0,5257	0,07	UNCHANGED
60S ribosomal protein L7-4-like	I1KVR2	10,33	28322,12	960,31	4	18,11	21624	24405	0,4780	-0,17	UNCHANGED

40S ribosomal protein S15-4	C6SWG3	10,85	17401,57	959,66	2	23,23	11040	9517	0,4805	0,21	UNCHANGED
Pectinesterase	I1JKR6	7,31	54810,77	936,32	3	5,71	78790	66929	0,7232	0,24	UNCHANGED
PAP_fibrillin domain-containing protein	I1MFL4	5,57	33352,18	924,26	3	16,67	17803	12562	0,0048	0,50	UNCHANGED
51 kDa seed maturation protein	Q39801	6,74	51096,35	915,36	4	10,36	39275	30235	0,2424	0,38	UNCHANGED
Glyco_hydro_3_C domain-containing protein	AOA0R0K4H0	5,30	31168,53	908,23	2	8,19	10209	18410	0,0569	-0,85	UNCHANGED
Calnexin homolog	Q39817	4,60	62308,73	898,89	4	13,74	50612	36414	0,2690	0,48	UNCHANGED
Proteasome subunit alpha type	I1KKK1	5,83	24595,97	896,20	2	11,50	17594	17518	0,9564	0,01	UNCHANGED
Ribosomal_L14e domain-containing protein	I1L7F3	10,91	15411,34	892,58	2	16,67	16681	23732	0,0347	-0,51	UNCHANGED
Phosphoenolpyruvate carboxylase	P51061	6,02	111216,95	839,69	6	9,10	9674	6344	0,0641	0,61	UNCHANGED
Calreticulin	A0A762	4,24	48344,96	824,74	5	13,81	20367	21236	0,7864	-0,06	UNCHANGED
Aldedh domain-containing protein	I1JZW5	5,10	53556,32	815,17	7	25,00	23335	23162	0,9772	0,01	UNCHANGED
Pyruvate kinase	I1N5N0	7,41	55928,81	805,38	3	12,16	17163	14671	0,4079	0,23	UNCHANGED
40S ribosomal protein S18	AOA0R4J2Q0	10,91	17670,57	804,58	4	32,24	21147	21080	0,9880	0,00	UNCHANGED
Aldedh domain-containing protein	I1J5A5	6,39	58821,04	751,81	4	9,85	12171	17701	0,0750	-0,54	UNCHANGED
Uncharacterized protein	AOA0R0FBT0	4,94	75841,64	714,08	6	14,12	14609	14220	0,8348	0,04	UNCHANGED
Glycerophosphodiester phosphodiesterase	I1KYF2	6,83	84207,30	657,81	3	5,78	36097	47302	0,2738	-0,39	UNCHANGED
Ribosomal_S4 domain-containing protein	I1JWW7	10,58	21539,76	648,61	2	10,38	23541	24215	0,8568	-0,04	UNCHANGED
PCI domain-containing protein	C6T763	4,86	31091,34	648,00	2	12,36	12759	11412	0,4983	0,16	UNCHANGED
BAG family molecular chaperone regulator 7	AOA0R0GZS9	9,88	45846,44	640,41	2	4,52	315246	384889	0,0751	-0,29	UNCHANGED
Alanine transaminase	I1MK75	6,42	45891,91	636,63	3	9,00	13816	11222	0,1488	0,30	UNCHANGED
Gamma aminobutyrate transaminase 3, chloroplastic-like	AOA0R0HCZ0	7,76	50219,45	632,01	3	9,21	9252	13530	0,0414	-0,55	UNCHANGED
Proteasome subunit alpha type	I1MXX5	4,89	31260,88	622,62	2	9,51	14322	13980	0,8614	0,03	UNCHANGED
Protein disulfide-isomerase	I1MA56	4,93	48561,81	619,70	2	5,32	13663	17238	0,1305	-0,34	UNCHANGED
HATPase_c domain-containing protein	I1MC34	4,59	83812,94	592,25	5	9,63	22611	24540	0,5314	-0,12	UNCHANGED
Aconitate hydratase	AOA0R0H3C7	6,75	98660,37	587,75	6	10,56	16251	24022	0,0514	-0,56	UNCHANGED
Adenosine kinase	I1JPN5	5,67	30056,03	578,87	2	9,33	13930	13475	0,8734	0,05	UNCHANGED
Plug_translocon domain-containing protein 1	C6TBU3	8,94	52492,43	562,28	3	6,30	20848	18797	0,5989	0,15	UNCHANGED

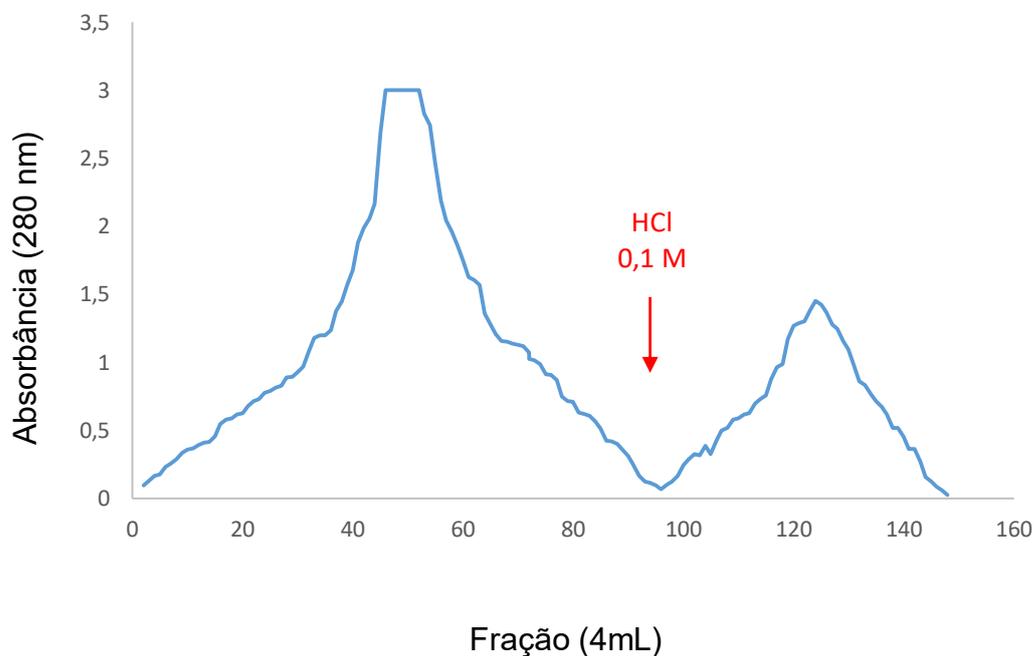
Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	I1M2K9	5,53	72599,20	557,20	5	10,98	10186	14357	0,0293	-0,50	UNCHANGED
Proteasome subunit alpha type-5	Q9M4T8	4,50	26151,39	555,85	3	19,83	19969	15993	0,2587	0,32	UNCHANGED
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Q06197	5,82	46391,95	551,84	5	14,53	19961	14734	0,1403	0,44	UNCHANGED
Serine protease EDA2	A0A0R0FX0	5,09	55869,41	515,74	2	4,69	35615	37944	0,5654	-0,09	UNCHANGED
SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1-like	A0A0R0KY12	6,17	48300,72	508,03	2	5,42	19417	18838	0,7767	0,04	UNCHANGED
ADP/ATP translocase	I1LUH6	10,09	39634,67	499,34	2	5,18	67802	57438	0,4584	0,24	UNCHANGED
Pyruvate kinase	A0A0R0KSL9	5,27	44832,30	487,18	3	12,32	25075	18027	0,0274	0,48	UNCHANGED
VWFA domain-containing protein	I1J8K3	4,41	42377,33	473,78	2	8,02	18379	14095	0,0382	0,38	UNCHANGED
Protein DJ-1 homolog B-like	I1M322	6,51	47064,48	467,65	2	7,78	36692	44332	0,4272	-0,27	UNCHANGED
Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A	I1JDU8	4,91	65799,34	443,90	2	5,00	15693	11960	0,1597	0,39	UNCHANGED
Ribosomal_L2_C domain-containing protein	I1MN72	11,13	28357,50	443,81	2	11,54	25002	26323	0,7589	-0,07	UNCHANGED
Aconitate hydratase	I1J8H1	5,46	99092,61	431,39	5	9,21	11759	16196	0,3218	-0,46	UNCHANGED
Protein TolB	I1KAD3	6,18	80386,84	425,88	2	4,15	102449	59787	0,1417	0,78	UNCHANGED
Transaldolase	I1KZJ1	5,19	43284,87	421,16	3	8,93	11309	14561	0,1610	-0,36	UNCHANGED
Plasma membrane ATPase	I1L1A4	6,36	105514,40	344,18	3	4,92	12304	11052	0,4856	0,15	UNCHANGED
Clathrin heavy chain	I1M754	5,21	181016,51	305,77	2	2,15	28754	25942	0,5951	0,15	UNCHANGED
Plasma membrane ATPase	A0A0R0KAU1	6,38	101621,64	299,00	3	5,64	10094	9109	0,5522	0,15	UNCHANGED
Cyanogenic beta-glucosidase-like	A0A0R0HPQ5	6,04	42325,64	283,86	2	4,85	18466	16506	0,4455	0,16	UNCHANGED
Pectinesterase	I1LYB7	7,14	56903,60	269,01	2	3,29	46170	31840	0,0385	0,54	UNCHANGED

### 4.3. Isolamento das proteínas com afinidade a quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea*

Para investigar a presença dessas proteínas nos tegumentos das sementes foi realizada uma cromatografia de afinidade a quitina. Nos perfis cromatográficos de ambos os tegumentos (Figuras 11 e 12) é possível observar a presença de frações retidas na coluna que foram eluídas com HCL 0.1M. Esse resultado indica a presença de proteínas com afinidade a quitina no tegumento de *C. ensiformis* (Figura 11) e no tegumento de *C. rosea* (Figura 12). Contudo, a alta absorvância obtida nas leituras pode indicar interferência de pigmentos presentes nas amostras.



**Figura 11. Perfil cromatográfico das proteínas de tegumentos de *C. ensiformis* isoladas por cromatografia em coluna de afinidade a quitina. As proteínas retidas foram eluídas com HCl 0,1 M. Foram coletadas frações de 4 mL/tubo sobre um fluxo de 1,3 mL/min. As absorvâncias foram lidas a 280 nm.**



**Figura 12. Perfil cromatográfico das proteínas de tegumentos de *C. rosea* isoladas por cromatografia em coluna de afinidade a quitina.** As proteínas retidas foram eluídas com HCl 0,1 M. Foram coletadas frações de 4 mL/tubo sobre um fluxo de 1,3 mL/min. As absorbâncias foram lidas a 280 nm.

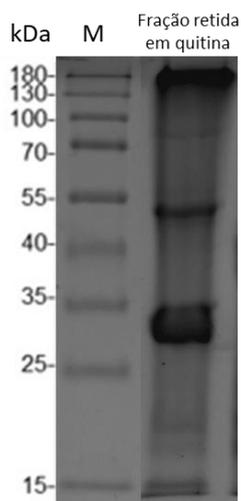
#### 4.4. Visualização do perfil proteico das frações com afinidade à quitina

O perfil eletroforético das frações retidas em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea* foi visualizado em gel de poliacrilamida 12%. Os resultados para as frações retidas dos tegumentos de *C. rosea* apresentou bandas majoritárias com massas moleculares de aproximadamente 180 kDa, abaixo de 55 kDa e abaixo de 35 kDa. Duas bandas próximas a 15 kDa também podem ser observadas (Figura 13).

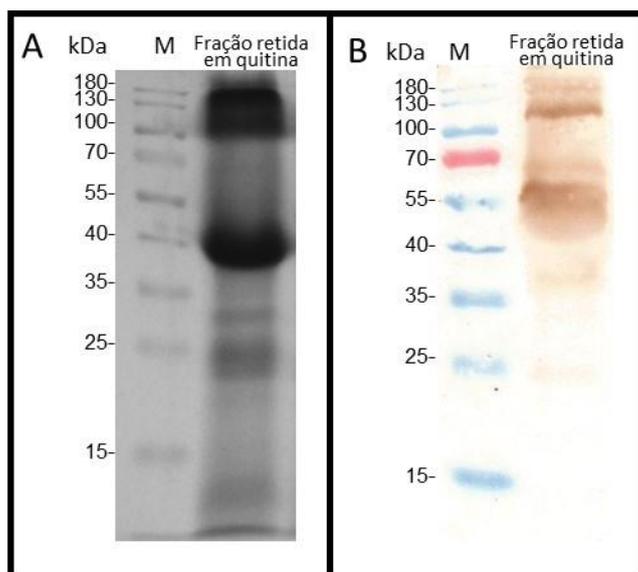
Para os resultados da fração retida de tegumento de *C. ensiformis*, observa-se bandas majoritárias entre 100 e 130 kDa, próxima a 40 kDa, uma banda abaixo a 35 kDa e uma próxima a 25 kDa. (Figura 14-A). Essas proteínas

majoritárias com massas moleculares acima de 40 kDa reagiram com o anticorpo de anti-vicilinas de cotilédones de *V. unguiculata* (Figura 14-B).

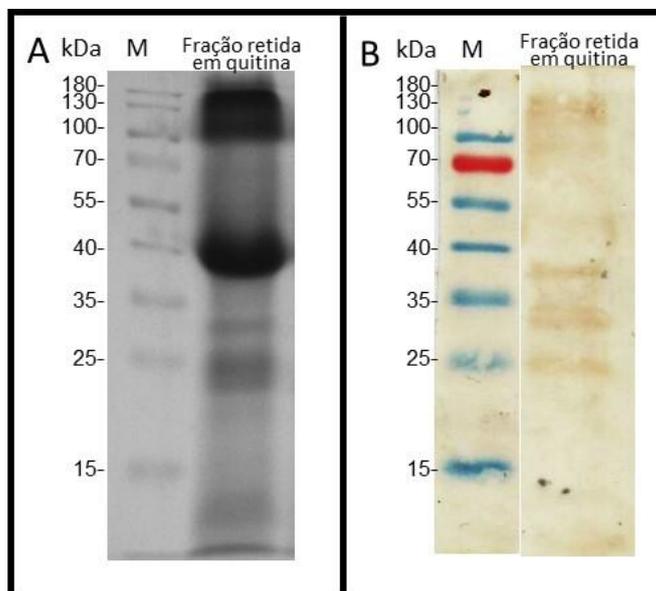
Pelo menos quatro bandas visualizadas no gel (Figura 15-A) também reagiram com o anticorpo anti-quitinase no ensaio de *Western blotting* (Figura 15-B), uma banda próxima a 130 kDa e três bandas entre 40 e 25 kDa.



**Figura 13. Visualização do perfil proteico em gel de eletroforese 12% das frações retidas dos tegumentos de *C. rosea* através de cromatografia. M: Marcador molecular (kDa).**



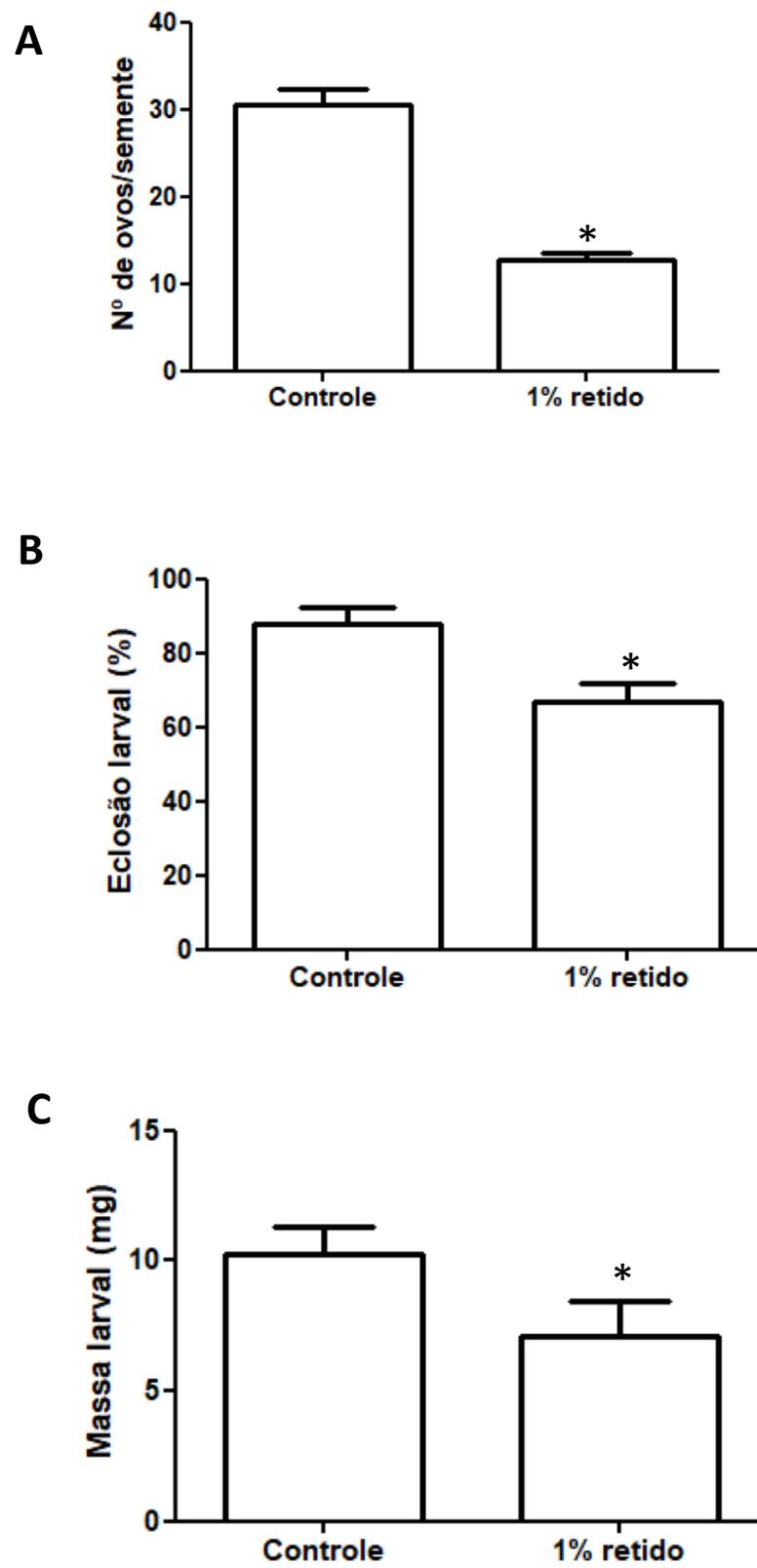
**Figura 14. Perfil proteico da fração retida em quitina em gel de eletroforese 12% (A) e Western Blotting para detecção de vicilinas (B).** M: marcador de massa molecular (kDa).

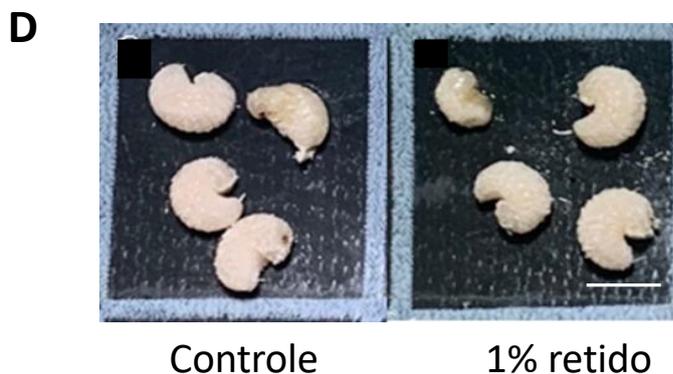


**Figura 15. Perfil proteico da fração retida em quitina em gel de eletroforese 12% (A) e Western Blotting para detecção de quitinases (B).** M: marcador de massa molecular (kDa).

#### 4.5. Avaliação da toxicidade das frações retidas em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea* para o inseto *C. maculatus*

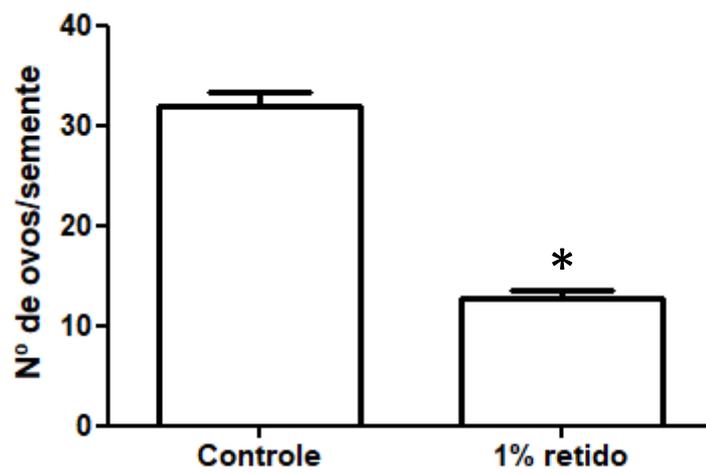
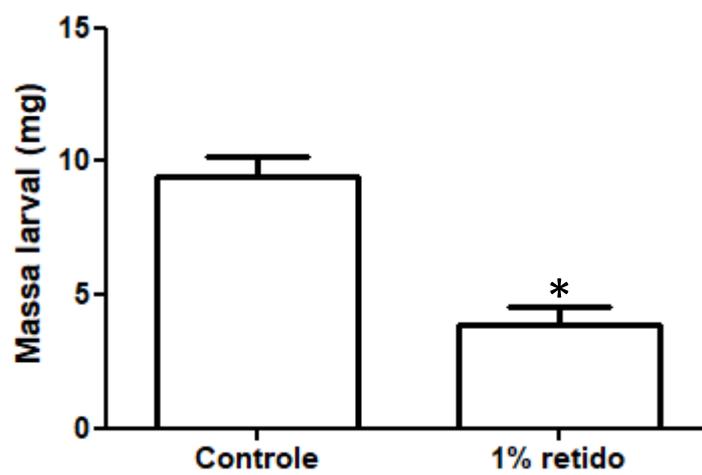
Com o intuito de investigarmos se as proteínas retidas em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* e de *C. rosea* são tóxicas para *C. maculatus*, foram confeccionadas sementes artificiais contendo 1% das frações. Nossos resultados mostraram que houve diminuição na oviposição, eclosão e na massa das larvas em relação ao controle (Figura 16). Para larvas de 20 DAO dias, foram observadas massas das larvas controle de 10 mg, enquanto as larvas do tratamento tiveram uma média de massa larval de 7 mg (Figura 16-C). A figura 16-D, mostra as larvas de 20 DAO das sementes controle e contendo 1% da fração retida.





**Figura 16. Avaliação da toxicidade de 1% da fração retida em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* sobre os parâmetros de oviposição, eclosão larval e massa larval de *C. maculatus*. A:** Número de ovos em sementes artificiais contendo 1% da fração retida em quitina e em seu respectivo controle. **B:** Percentual de eclosão larval de *C. maculatus* nessas sementes 6 DAO. **C:** Massa da larva (mg) 20 DAO. **D:** Morfologia larval de *C. maculatus* 20 DAO. Barra = 1 cm. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Os resultados para as sementes artificiais contendo 1% da fração retida de tegumentos de *C. rosea* mostraram efeitos bem mais acentuados, quando comparados com *C. ensiformis*. A oviposição e a massa larval foram reduzidas em aproximadamente 59,6% (Figura 17-A) e 51,1% (Figura 17-B) respectivamente, quando comparados com as larvas das sementes controle. Figura 17-C mostra as larvas de 20 DAO das sementes controle e contendo 1% da fração retida.

**A****B****C**

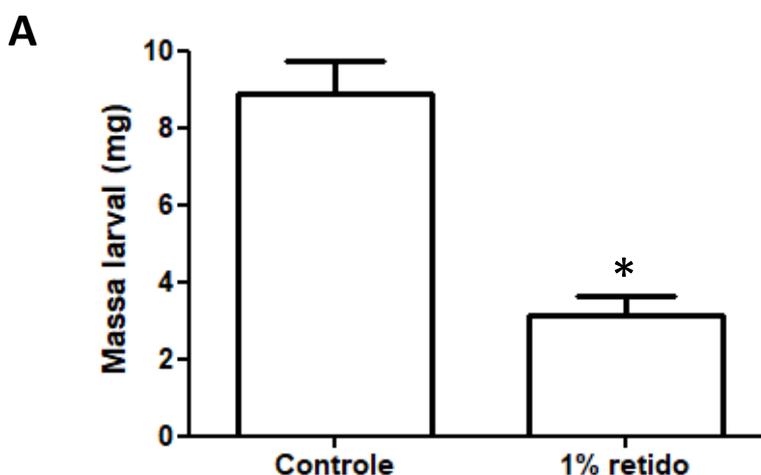
Controle

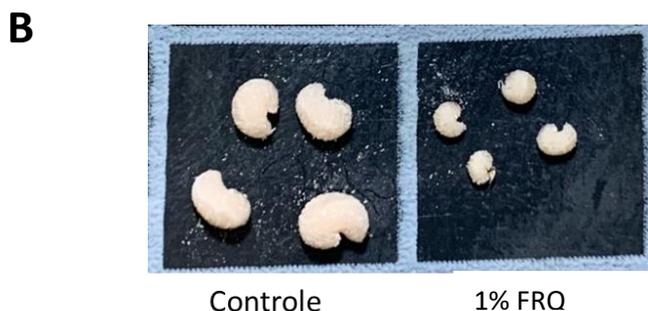
1% retido

**Figura 17. Avaliação da toxicidade de 1% da fração retida em quitina dos tegumentos de *C. rosea* sobre os parâmetros de oviposição, penetração larval e massa larval de *C. maculatus*. A:** Número de ovos em sementes artificiais contendo 1% da fração retida em quitina e seu respectivo controle. **B:** Massa da larva (mg) 20 DAO. **C:** Morfologia larval de *C. maculatus* 20 DAO. Barra = 1 cm Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Avaliação da toxicidade da fração rica em quitinase (FRQ) dos tegumentos de *C. ensiformis*

Para a avaliação da toxicidade, 1% da fração FRQ foi incorporada na dieta artificial de *C. maculatus*. Foi verificado que quando as larvas se alimentaram dessa fração sofrem alterações no desenvolvimento, com redução de 64,4% na massa das larvas 20 DAO, quando comparadas com as larvas controle (Figura 18-A). A figura 20-B mostra a morfologia e a massa larval 20 DAO.





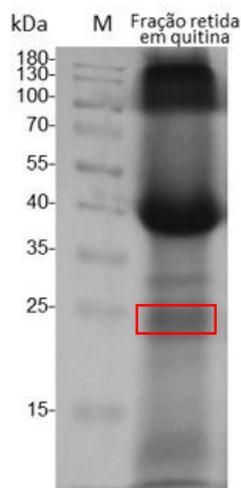
**Figura 18. Avaliação da toxicidade de 1% da fração FRQ de tegumentos de *C. ensiformis* sobre a massa larval de *C. maculatus*. A: Massa das larva (mg) 20 DAO. B: Morfologia larval de *C. maculatus* 20 DAO. Barra = 1 cm. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).**

#### **4.7. Identificação, por espectrometria de massas, das proteínas com afinidade à quitina dos tegumentos de *C. ensiformis***

Para confirmar a presença de quitinase nos tegumentos de *C. ensiformis*, a banda de aproximadamente 25 kDa (Figura 19) reativa ao anticorpo anti-quitinase, foi recortada do gel e enviada para a FIOCRUZ para identificação por espectrometria de massas. Os resultados mostraram que essa banda gerou um número considerável de peptídeos. Um total de 45 peptídeos originados da hidrólise da banda proteica de 25 kDa apresentou similaridade com uma quitinase de *C. ensiformis* (tr|O81934|O81934\_CANEN) com uma cobertura de 62 % (Figura 20-A). 29 desses peptídeos alinharam com uma endoquitinase de *Cajanus cajan* (tr|A0A151THL7|A0A151THL7\_CAJCA) com cobertura de 46% (Figura 20-B); 8 desses peptídeos alinharam com uma quitinase de classe III de *Canavalia gladiata* (tr|A0A173FZM8|A0A173FZM8\_CANGL) dando 22% de cobertura (Figura 20-C). Portanto, esses resultados evidenciaram a existência de quitinases no tegumento de *C. ensiformis*.

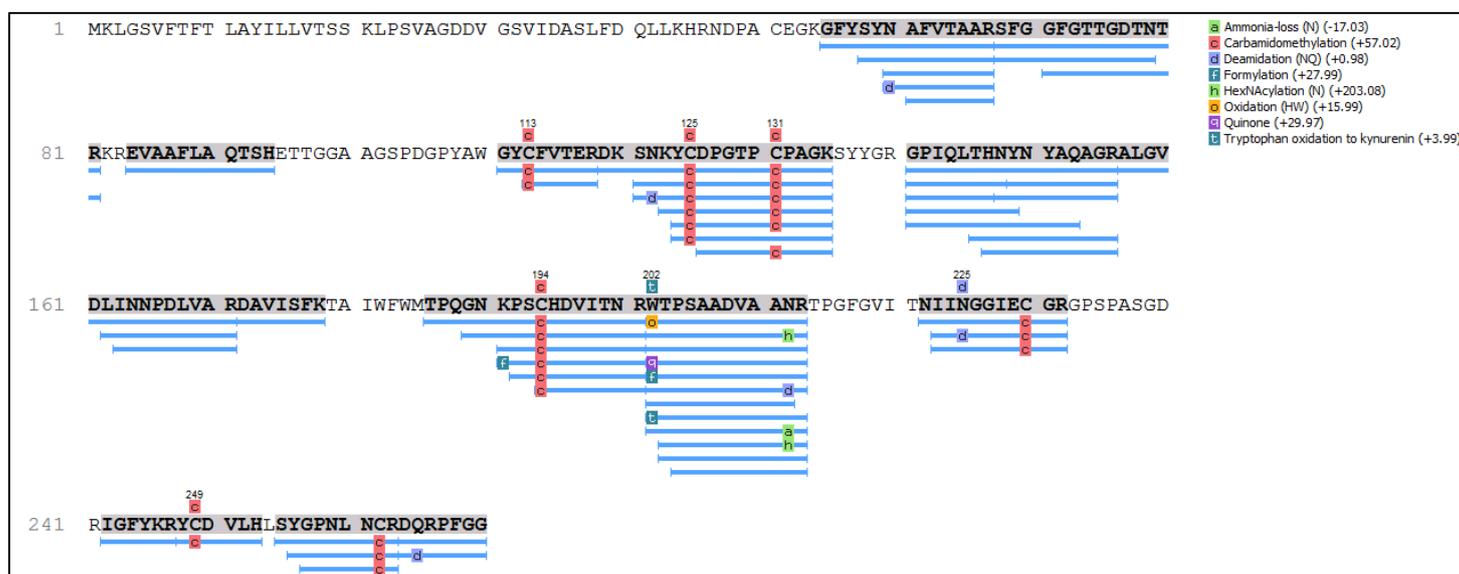
Entretanto, outros peptídeos, também originados dessa mesma banda, deram similaridade com proteínas do tipo vicilina, mostrando que a banda enviada para sequenciamento não estava homogênea, ou seja, existia mais de

uma proteína nessa fração do gel. Um número de 20 peptídeos alinharam com uma vicilina de *V. unguiculata* (tr|Q8H0C9|Q8H0C9\_VIGUN), dando uma cobertura de 47% (Figura 21A) e desses peptídeos, 9 alinharam com a canavalina (vicilina de *C. ensiformis* P50477|CANA\_CANEN) dando 17% de cobertura (Figura 21-B).

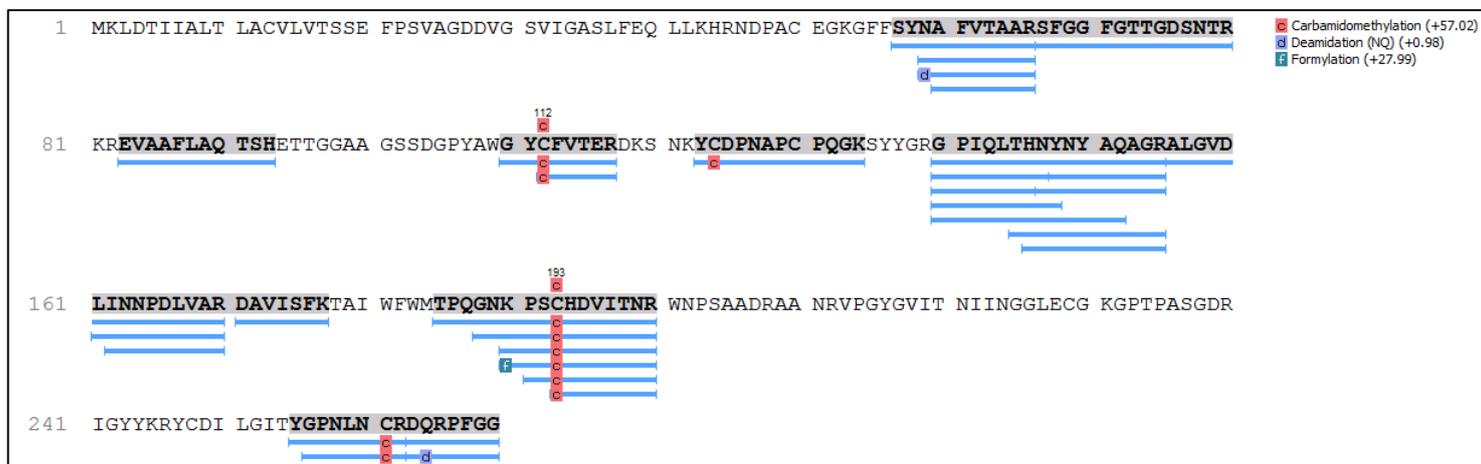


**Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da fração retida em quitina do tegumento de *C. ensiformis*, mostrando a banda proteica de 25 kDa, reativa ao anticorpo anti-quitinase. Retângulo vermelho marcando a banda submetida ao experimento de espectrometria de massas.**

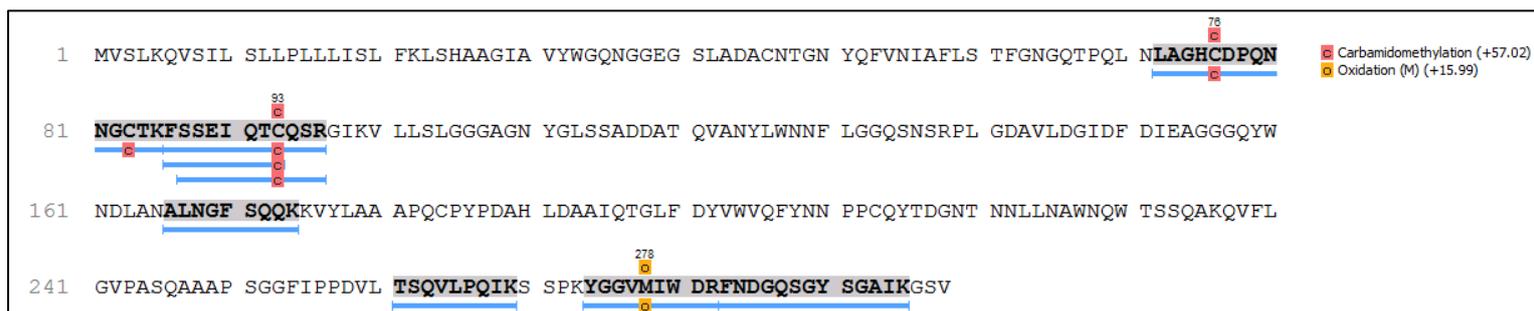
**A**



B

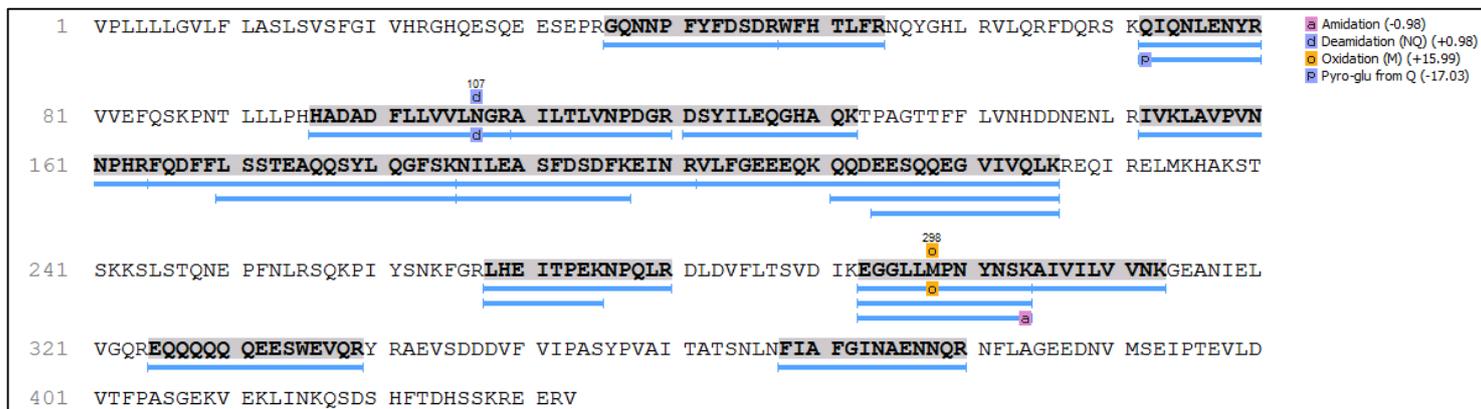


C

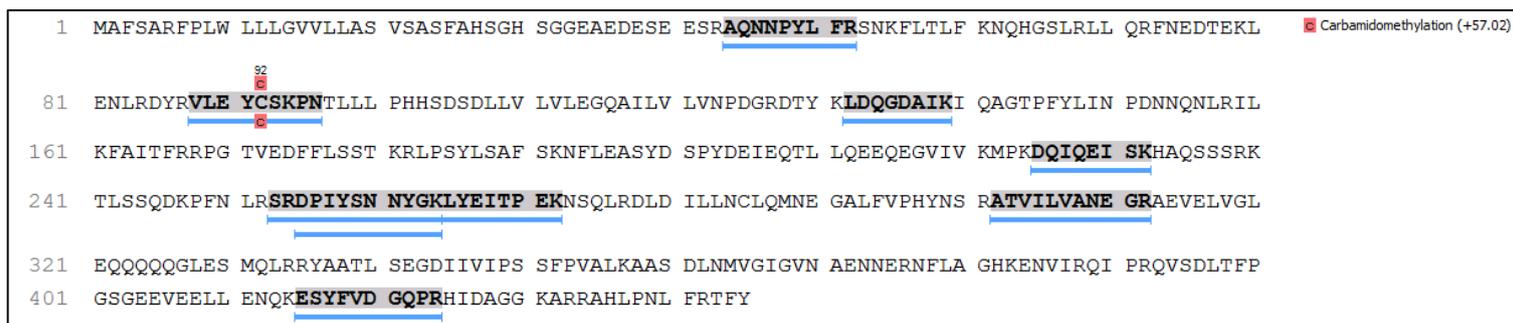


**Figura 20. Alinhamento dos peptídeos obtidos da banda retida em quitina do tegumento de *Canavalia ensiformis*. A:** 45 peptídeos alinharam com uma quitinase de *Canavalia ensiformis*, dando uma cobertura de 62 % (tr|O81934|O81934\_CANEN). **B:** 29 peptídeos alinharam com uma endoquitinase de *Cajanus cajan* (tr|A0A151THL7|A0A151THL7\_CAJCA) com cobertura de 46%. **C:** 8 peptídeos alinharam com uma quitinase da classe III de *Canavalia gladiata* (tr|A0A173FZM8|A0A173FZM8\_CANGL) dando 22% de cobertura.

A



B



**Figura 21. Alinhamento dos peptídeos obtidos da banda retida em quitina de tegumento de *C. ensiformis*. A: 20 peptídeos alinharam com uma vicilina de *Vigna unguiculata* (tr|Q8H0C9|Q8H0C9\_VIGUN), dando uma cobertura de 47 %. B: 9 peptídeos alinharam com canavalina (vicilina de *Canavalia ensiformis* P50477|CANA\_CANEN) dando 17% de cobertura.**

#### 4.8. *Docking* molecular da vicilina com o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>

As sequências das proteínas obtidas por espectrometria de massas, foram alinhados, usando o BLASTp, com proteínas armazenadas no banco de dados do PDB. De acordo com as buscas, a proteína que apresentou maior similaridade e cobertura com essa sequência obtida foi uma vicilina de *V. angularis* (cadeia A) [PDB: 2EA7]. A figura 22 mostra o alinhamento da sequência dos peptídeos obtidos da banda com a proteína 2EA7.A.

A estrutura da vicilina foi submetida a um *docking* com o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub> usando um espaço definido por um cubo de 40 Å x 40 Å x 40 Å e direcionando o cubo para incluir a  $\alpha$ -hélice descrita por MIRANDA *et al.*, 2020 onde estaria possivelmente o sítio de ligação à quitina. O melhor modelo apresentou valores negativos de energia de afinidade (-7,58 kcal / mol), indicando uma ligação espontânea (Figura 23-A). Os resíduos ASN59, ASP116, ASP116, GLU185, LYS187, ARG188, GLU189 e GLN192 formam ligações de hidrogênio com (NAG)<sub>4</sub> (Figura 23-B e figura 23-C). As interações hidrofóbicas dos resíduos da vicilina ASP116, GLU189 e GLN192 com (NAG)<sub>4</sub> foram identificadas pelo programa LigPlot + v 2.2.4 (Figura 23-D). A tabela 6 mostra o resumo de todas as interações presentes entre o ligante e o receptor.

2EA7 **IVHREHHESR** EEVSVSS**GKN NPFYFNSDRW** FRTLYRNEW**G HIRVLQRFDQ** 50  
**VHRGHQESQ** **GQN NPFYFNPD** **RWFHTLFRNQYG HIRVLQRFDQ**

2EA7 **RSKQMQNLEN** YRVVEFKSKP **NTLLPHHAD** AD**FLLVVLNG** TAVLTLVNPD 100  
**RSKQIQNLEN** YRVVEFQSKP **NTLLPHHAD** **FLLVVLNG** RAPLTVNPD

2EA7 SR**DSYILEQG** **HAQKIPAGTT** **FFLVNPDDNE** **NLRIIKLAI**P VN**NPHRFQDF** 150  
**DSYILEQG** **HAQKTPAGTT** **FFLVNHDDNE** **NLRIIKLAV** **NPHRFQDF**

2EA7 FL**SSTEAQQS** YLRGFS**KNIL EASFD**SDFKE I **NRVLFGEER** **QQ**QQGEE**SRE** 200  
**SSTEAQQS** **YLQGF****SKNIL EASFD** **RVLFGEER** **QQ**DEESQ**EEG**

2EA7 **EGVIVELKRE** **QIQELMK**HAK SSSR**KELSSQ** DE**PFNLRNSK** P**Y**SNK**FGRW** 250  
**EGVIVQLKRE** **QIRELMK** **K** STTK**SL** **PFNLRN** **YSKFGRL**

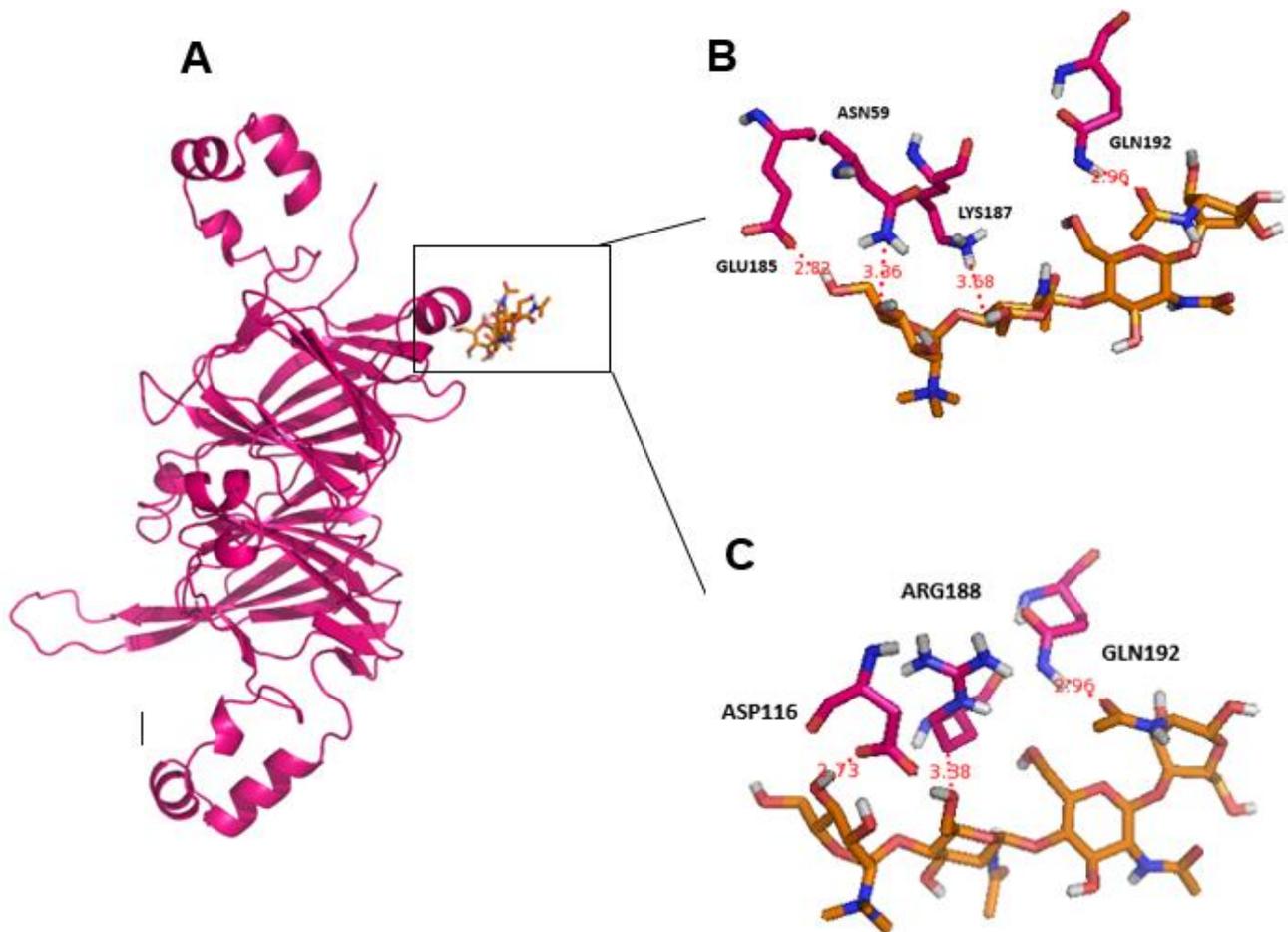
2EA7 YEM**TPEKNPQ** LK**DLDVFISS** **VD**MKEGALLL **PHYSSKAIVI** MVINEGEAKI 300  
**TPEKNPQ** **DLDVF** **VDIK** **PNYSKAIVI**

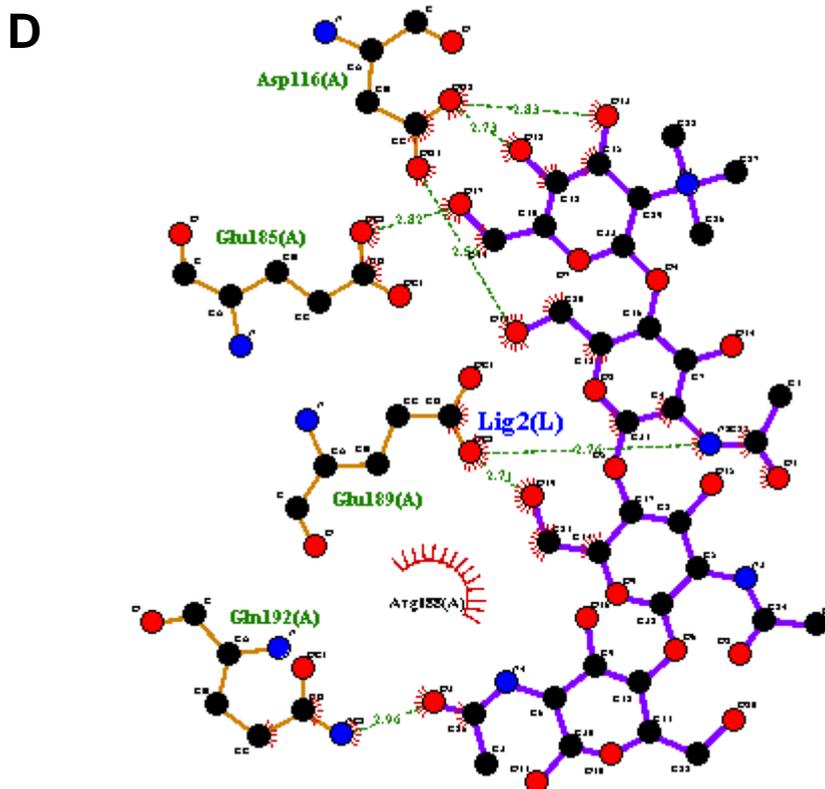
2EA7 EL**VG**LSD**QQQ** QKQ**Q**EE**S**LEV QRYRAELSED DV**F**V**IP**AAYP VAINATSNLN 350 |  
**VGQRQQQ** **Q**EE**S**WEV **VIPA**

2EA7 **FFAFGINA**EN NRRNFLAG**GK** **DNVMSE**IPTE VLEVS**F****PASG** **KKV**EKL**IKKQ** 400  
**FIAFGINA** **GEE** **DNVMSE** **PASG** **EKV**

2EA7 SES**HFVDA**QP **EQ**Q**RE**EG**HK** GRKGSLSSIL G**SLY** 450  
**HEVDA** **RESG**

**Figura 22. Alinhamento da sequência das proteínas com vicilina de *V. anguularis*.** Código de acesso PDB: 2EA7. Destaques em cinzas representam as regiões de similaridades. O retângulo vermelho indica o sitio de ligação a quitina previamente identificado por Miranda *et al.*, (2020).





**Figura 23. Potencial sítio de ligação à quitina na estrutura do monômero de vicilina.** **A:** Estrutura tridimensional do monômero da proteína 2EA7.A. Imagem criada a partir do PyMol. **B e C:** Interações entre resíduos de vicilina e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas amarelas=pontes salinas. Linhas tracejadas pretas=interações hidrofóbicas. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio. **D:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos de vicilina com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio.

**Tabela 6. Interações entre o monômero de vicilina e (NAG)<sub>4</sub>.** \* Distância entre átomos de carbono nas interações hidrofóbicas. Distância entre H e átomos aceptores nas ligações de hidrogênio. Distância entre os centros de carga nas pontes salinas. Dados obtidos através do programa PLIP Web Tool e LigPlot+ v. 2. 2. 4.

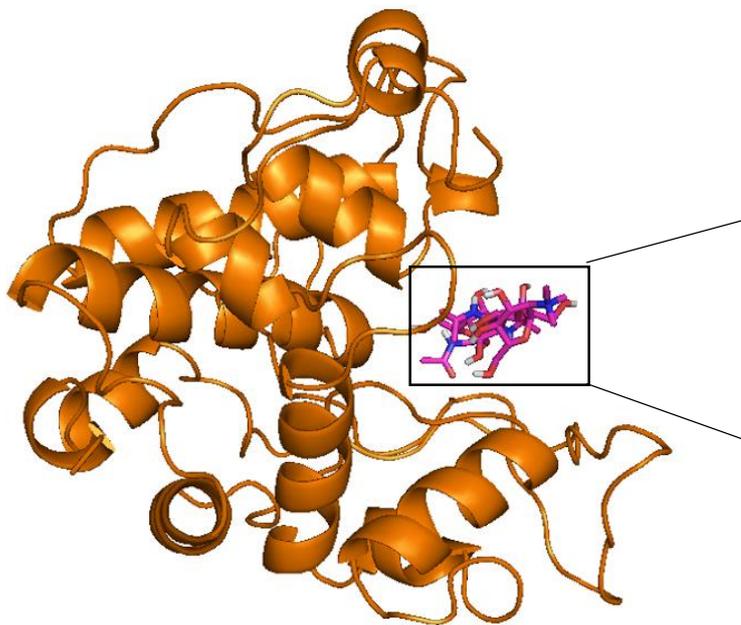
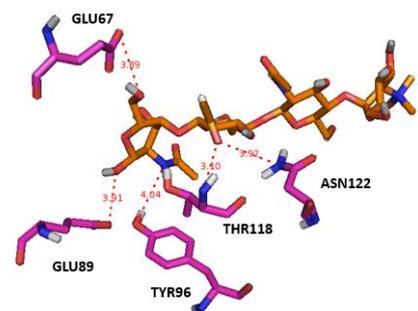
RESÍDUO (AA)	DISTÂNCIA (Å)	TIPOS DE INTERAÇÃO	INTERAÇÃO HIDROFÓBICA
ASN59	3.36	Ligação de Hidrogênio	
ASP116	2.73		X
ASP116	2.83		X
GLU185	2.82		
LYS187	3,67		
ARG188	3,65		
GLU189	2.76		X
GLN192	2,96		X
LYS187	3,67	Pontes salinas	

#### 4.9. *Docking* molecular da quitinase com o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina (NAG)<sub>4</sub>

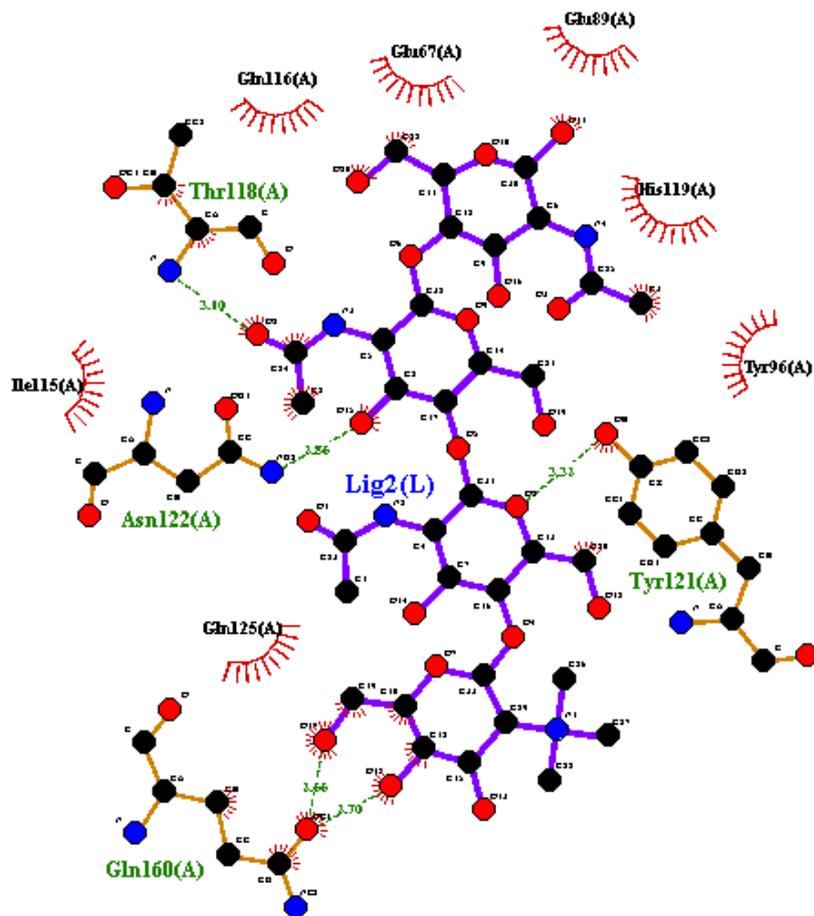
As sequências das proteínas obtidas por espectrometria de massas, foram alinhados, usando o BLASTp, com proteínas armazenadas no banco de dados do PDB. De acordo com as buscas, a proteína que apresentou maior similaridade e cobertura com essa sequência obtida foi uma quitinase de *C. ensiformis* [PDB: 1DXJ]. Na estrutura tridimensional da quitinase, definida por HAHN *et al.*, (2000), o sitio de ligação à quitina é identificado na região GLU 68 a THR 119. Para averiguar a afinidade dessa região pela quitina, a estrutura da quitinase foi submetida a um *docking* com (NAG)<sub>4</sub>, usando um espaço definido por um cubo de 40 Å x 40 Å x 40 Å e direcionando o cubo para a região específica.

O resultado do *docking* indicou uma ligação espontânea, com valores negativos de energia (-8,795 kcal / mol) (Figura 24-A). Os resultados mostraram que os aminoácidos GLU67, GLU89, TYR96, THR118, ASN 122, GLN125, GLN160, LYS163 formam ligações de hidrogênio com (NAG)<sub>4</sub>, destacando os

aminoácidos GLU67 e GLU89 do sítio de ligação da quitina descrito por HAHN *et al.*, (2000) (Figura 24-B). TYR96 e PHE155 também interagem com (NAG)<sub>4</sub> por interações hidrofóbicas (Figura 24-C). A tabela 7 mostra o resumo de todas as interações presentes entre o ligante e o receptor.

**A****B**

C



**Figura 24. Potencial sítio de ligação à quitina da quitinase. A:** Estrutura tridimensional do monômero da proteína IDJX. Imagem criada a partir do PyMol.

**B:** Interações entre resíduos de quitinase e (NAG)<sub>4</sub> obtidas através do programa PLIP Web Tool. Linhas azuis=ligações de hidrogênio. Linhas tracejadas amarelas=pontes salinas. Linhas tracejadas pretas=interações hidrofóbicas. Sticks em azul escuro=átomos de nitrogênio. Sticks em vermelho=átomos de oxigênio.

**C:** Diagrama 2D representando as interações entre resíduos de quitinase com (NAG)<sub>4</sub> estabelecidas através do programa LigPlot+ v. 2.2.4. Arcos tracejados pretos=interações hidrofóbicas. Linhas pontilhadas azuis=ligações de hidrogênio. Números expressam a distância (Å) das ligações de hidrogênio. Esferas pretas=átomos de carbono. Esferas azuis=átomos de nitrogênio.

**Tabela 7. Interações entre o monômero de vicilina e (NAG)<sub>4</sub>.** \* Distância entre átomos de carbono nas interações hidrofóbicas. Distância entre H e átomos aceptores nas ligações de hidrogênio. Distância entre os centros de carga nas pontes salinas. Dados obtidos através do programa PLIP Web Tool e LigPlot+ v. 2. 2. 4.

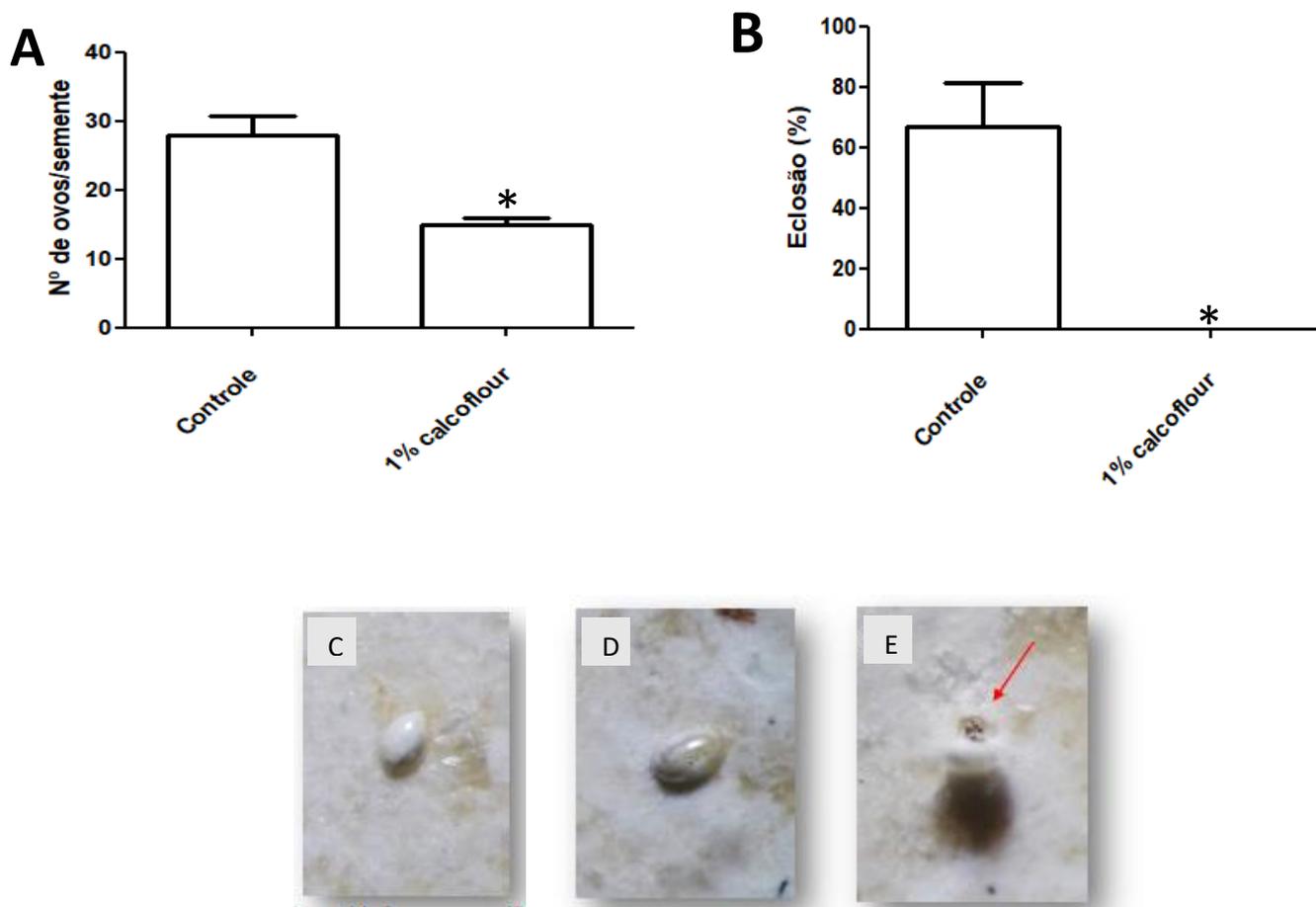
RESÍDUO (AA)	DISTÂNCIA (Å)	TIPOS DE INTERAÇÃO	INTERAÇÃO HIDROFÓBICA
GLU67	3.89	Ligação de Hidrogênio	
GLU89	3.91		
TYR96	4.04		X
THR118	3.10		
ASN122	3.92		
GLN125	3.46		
GLN160	2.70		
LYS163	3.43		
PHE155	3.93		X

#### 4.10. Análise da influência do calcofluor sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*

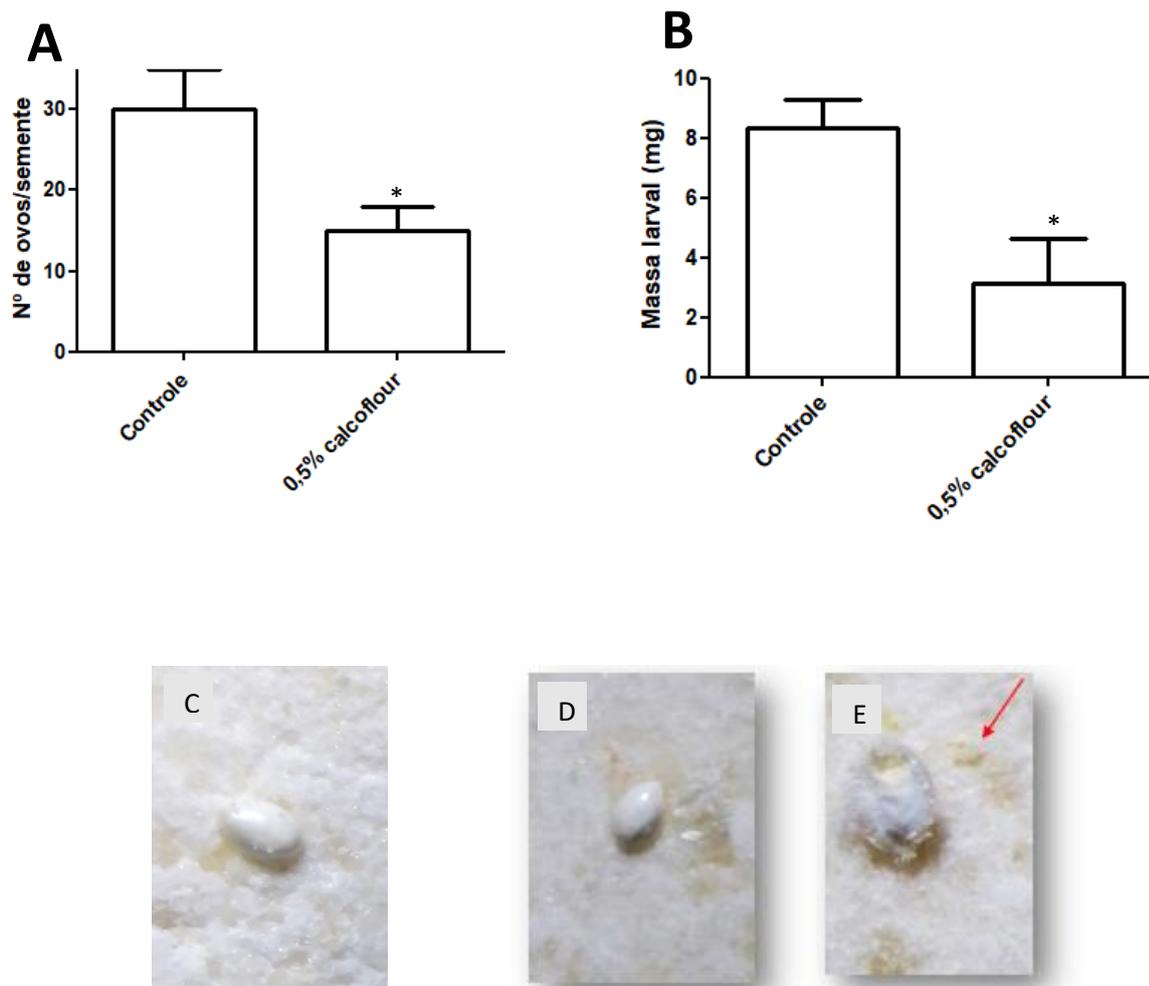
A observação do desenvolvimento do inseto em sementes artificiais com tegumentos artificiais contendo 1% de calcofluor revelou interferências nos parâmetros de desenvolvimento. A oviposição foi reduzida aproximadamente 40%, onde observou-se 28,8 ovos/ sementes no controle e 15,6 n<sup>o</sup>/semente nos experimentos com calcofluor (Figura 25-A). A eclosão larval foi completamente inibida nas sementes contendo calcofluor (Figura 25-B). Embora alguns ovos estivessem com aspecto esbranquiçado 7 DAO, as larvas não atravessaram os tegumentos artificiais (Figuras 25-C e D). A seta na figura 25-E aponta para uma larva morta na tentativa de ultrapassar o tegumento.

Dado que não houve larvas eclodidas nas sementes contendo 1% de calcofluor, a concentração testada foi diminuída para 0,5% de calcofluor. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na oviposição e massa larval em relação as larvas desenvolvidas nas sementes artificiais controle (Figura 26). A média da oviposição nas sementes controle foi de 29,8 ovos/ sementes , comparada com 15,1 ovos/semente sobre as sementes contendo

calcofluor (Figura 26-A). As massas das larvas do tratamento foram inferiores a 4 mg, enquanto as larvas controle possuem massas superiores a 8 mg (Figura 26-B). Nas figuras 26-C e D é observado o ovo 7 e 20 DAO, respectivamente, onde nota-se o aspecto esbranquiçado característico de ovos preenchidos por farinha após a eclosão da larva. A seta da figura 26-E mostra que as larvas conseguiram atravessar o tegumento.



**Figura 25. Interferência do tegumento artificial contendo 1% de calcofluor sobre os parâmetros de oviposição e eclosão larval de *C. maculatus*. A:** Número de ovos postos. **B:** Eclosão larval 7 DAO. **C:** Ovo de *C. maculatus* 7 DAO. **D e E:** Ovo e larva 7 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de escala = 0,1mm.



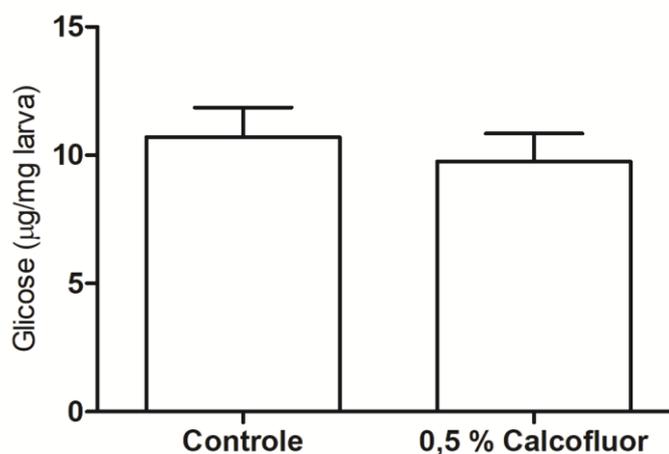
**Figura 26. Interferência do tegumento artificial contendo 0,5% de calcofluor sobre os parâmetros de oviposição e massa larval de *C. maculatus*. A:** Número de ovos postos. **B:** Massa das larvas 20 DAO. **C:** Ovo de *C. maculatus* 7 DAO. **D e E:** Ovo e larva 20 DAO. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Barras de escala = 0,1mm.

#### 4.11. Análise quantitativa de glicose, triacilglicerol, colesterol e proteínas totais em larvas de *C. maculatus*

As larvas de *C. maculatus* de 20 DAO desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5 % de calcofluor foram submetidas a diversas análises bioquímicas para verificar os efeitos desse composto nas macromoléculas de reserva das larvas do inseto *C. maculatus*.

##### 4.11.1. Quantificação de glicose

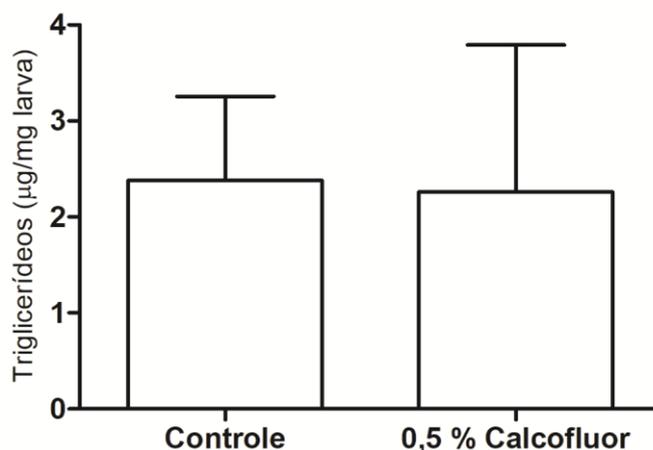
Ao verificar a concentração de glicose ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de larva), foi possível observar então que não houve alteração na quantidade de glicose nas larvas controle e desenvolvidas em sementes contendo calcofluor 0,5% (Figura 27).



**Figura 27. Quantificação de glicose em larvas 20 DAO. Quantidade de glicose ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larvas do controle e desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor. A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes.**

#### 4.11.2. Quantificação de triacilglicerol

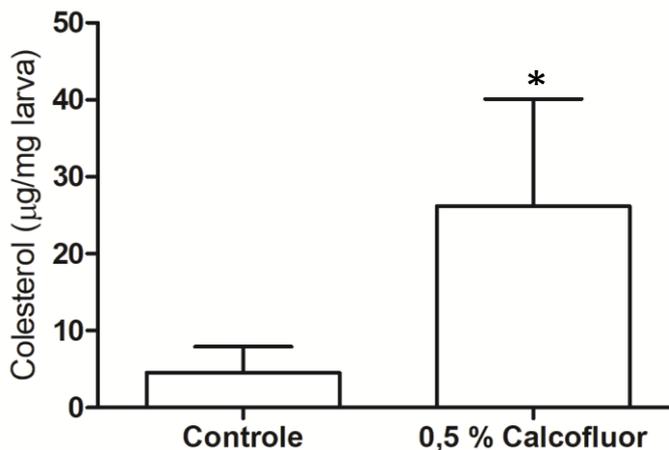
Quando se analisa a quantidade de triacilgliceróis, nota-se que os resultados não diferiram entre as larvas controle e larvas de sementes artificiais com 0,5% de calcofluor (Figura 28).



**Figura 28. Quantificação de triacilgliceróis em larvas 20 DAO. Quantidade de triacilgliceróis ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larvas controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes.

#### 4.11.3. Quantificação de colesterol

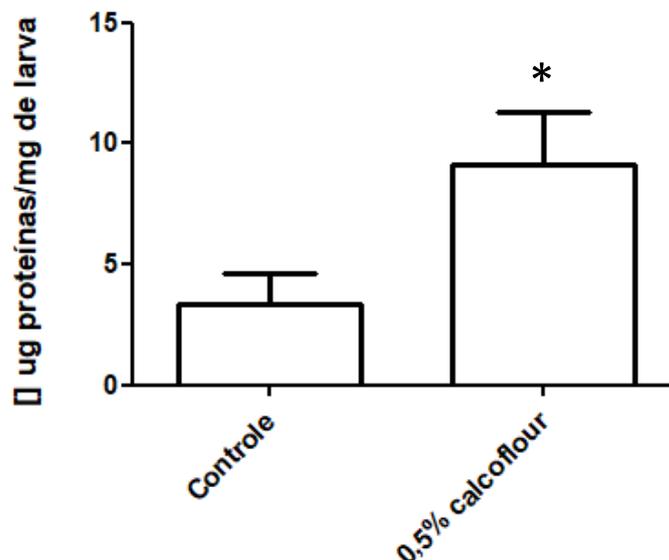
Ao analisar os resultados obtidos da quantificação de colesterol pode-se verificar que os níveis de colesterol nas larvas controle (aproximadamente 3,4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de larva) são menores do que as larvas de sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor, apresentando valores superiores a 86,4% (Figura 29).



**Figura 29. Quantificação de colesterol em larvas 20 DAO. Quantidade de colesterol ( $\mu\text{g}$ ) por mg de larvas controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.11.4. Quantificação de proteínas totais**

Os resultados mostram um aumento em aproximadamente de 50% na quantidade de proteínas totais solúveis nas larvas das sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor (Figura 30).

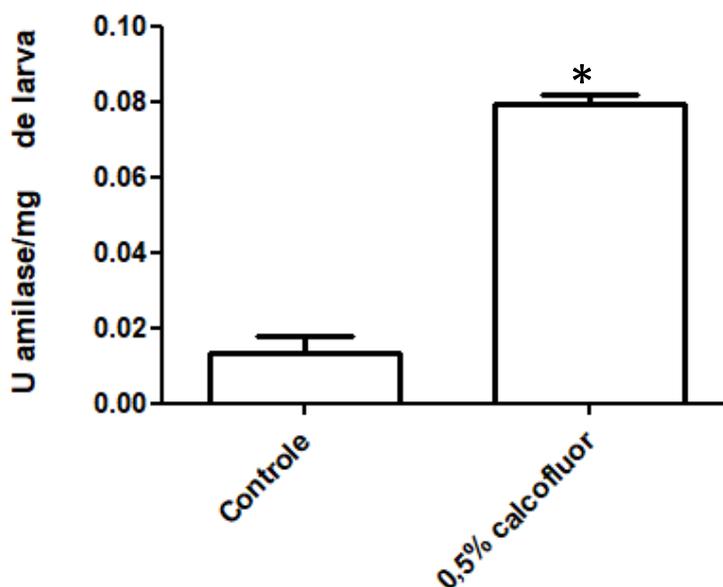


**Figura 30. Quantificação de proteínas totais solúveis em larvas 20 DAO. Quantidade de proteínas totais (µg) por mg de larvas controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.12. Análise da atividade das enzimas em larvas de *C. maculatus***

##### **4.12.1. Atividades de enzimas $\alpha$ -amilases**

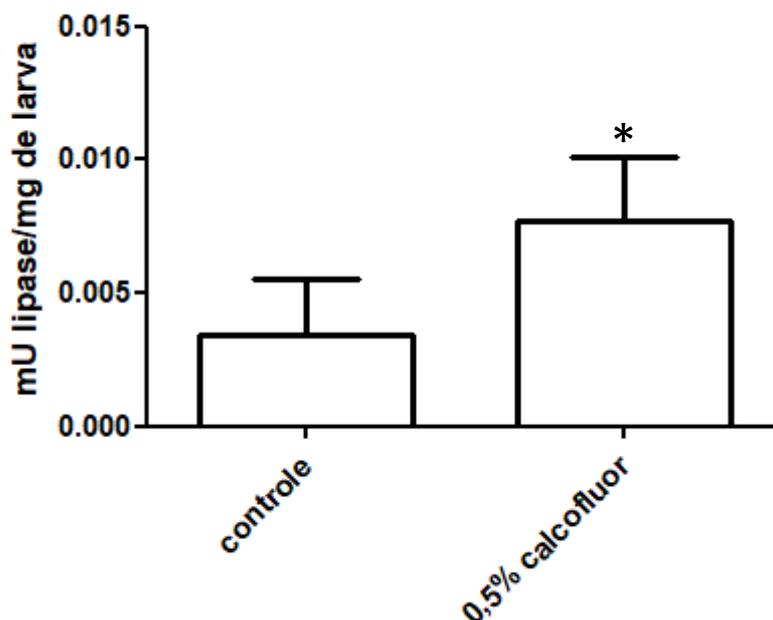
As análises da atividade de  $\alpha$ -amilase mostraram que as larvas controle apresentaram valores de 0,01 U por mg de larva, sendo bem inferiores aos valores da atividade das larvas das sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor, com valor de 0,08 U por mg de larva, ou seja, apresentando um valor superior a 87,5% (Figura 31).



**Figura 31. Análise da atividade de  $\alpha$ -amilases em larvas 20 DAO. Atividade da enzima (U por mg de larva) em larvas controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### 4.12.2. Atividades de lipases

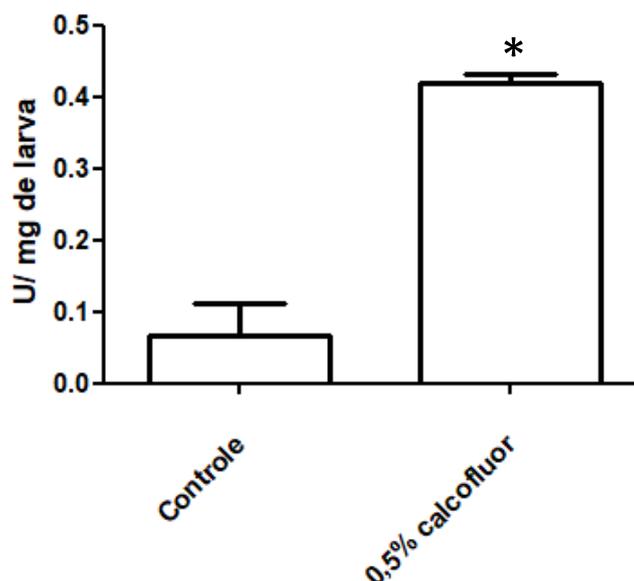
Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre as atividades de lipases de larva controle e das desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor. As larvas tratadas apresentaram um aumento na atividade de quase 50% em relação as larvas controle (Figura 32).



**Figura 32. Análise da atividade de lipases em larvas com 20 DAO. Atividade da enzima em larva controle e desenvolvidas em sementes artificiais com 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.12.3. Determinação da atividade de proteases cisteínicas**

As análises de determinação da atividade de protease cisteínica (unidade de enzima por larva) mostrou uma diferença estatística significativa das larvas desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor em relação as larvas controle. Os resultados mostram que as larvas do tratado tiveram um aumento de 84,4% da atividade da enzima com relação as larvas controle (Figura 33).



**Figura 33. Análise da atividade de proteases cisteínicas em larvas com 20 DAO. Atividade da enzima de larvas controle e desenvolvidas em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor.** A análise foi realizada em triplicata experimental utilizando larvas retiradas de experimentos independentes. Os valores seguidos por \* foram estatisticamente diferentes do respectivo controle de acordo com teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.13. Transcritos envolvidos com metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de embriões de *C. maculatus***

Para a comprovação de que o metabolismo de quitina se encontra ativo em *C. maculatus* desde a fase embrionária, a presença de transcritos para as proteínas quitina sintases, quitina desacetilases e quitinases foram investigados em embriões de *C. maculatus* 0-7 e 7-24 horas após a fertilização (haf) usando como base de dados o transcriptoma de *C. maculatus* publicado por BENTON *et al.*, (2016). Na tabela 8 estão mostrados os transcritos encontrados nessas buscas, sendo 2 transcritos para quitina sintase, 6 para quitinase e 3 transcritos para quitina desacetilase, alguns desses apresentaram duas sequencias. Quando analisamos a expressão diferencial desses transcritos entre os estágios

de desenvolvimento do embrião observamos que as 2 isoformas do transcrito comp28483\_c0\_(seq1 e seq2) são expressas principalmente em embriões 0-7 haf, enquanto o transcrito comp34773\_c0 é muito pouco expresso. Já os transcritos para quitinase observamos que as 2 isoformas de comp13908\_c0\_seq1 e seq2 tiveram expressão majoritária. Com relação aos transcritos para quitina desacetilase observa-se as maiores expressões no embrião 7-24 haf das isoformas comp13203\_c0\_seq1 e comp13203\_c0\_seq2.

#### **4.14. Transcritos envolvidos com metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de larvas, pupas e adultos de *C. maculatus***

Baseados nos dados de transcriptoma de *C. maculatus* previamente publicado por SAYADI *et al.*, (2016) foram realizadas também buscas para transcritos de quitina sintase, quitinases e quitina desacetilases em larvas, pupas e adultos desse inseto. Transcritos publicamente disponíveis do inseto *Tribolium castaneum*, obtidas do Genbank, foram usadas como iscas para encontrar esses transcritos relacionados no transcriptoma montado de *C. maculatus*. Foram encontrados dois transcritos para quitina sintase. Para quitinases/precursosores de quitinase foram identificados 10 transcritos e 9 para quitina desacetilase/precursor de quitina desacetilase (Tabela 9). Todas essas sequencias foram validadas usando-se sequências de referência de *T. castaneum*. Todos esses transcritos são expressos em mais de uma fase do desenvolvimento de *C. maculatus* (larva, pupa e adulto). Nenhum deles foi destacado como exclusivamente expresso em uma única dessas fases de desenvolvimento.

**Tabela 8. Transcritos relacionados ao metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de embriões de *C. maculatus* nos estágios de 0-7 e 7-24 horas após a fertilização (haf).** Os dados foram analisados no transcriptoma publicado BENTON et al (2015), usando sequencias publicadas no genoma de *Tribolium castaneum* como referência. Expressão diferencial em CPM (Counts Per Milion).

<b>Transcrito de <i>C. maculatus</i> (ID)</b>	<b>Embrião 0-7 haf (CPM)</b>	<b>Embrião 7-24 haf (CPM)</b>
Quitina Sintase		
comp28483_c0_seq1	12,17	2,648
comp28483_c0_seq2	12,117	2,659
comp34773_c0_seq1	0,008	0,08
Quitinase		
comp13771_c0_seq1	2,783	9,712
comp13864_c1_seq1	14,802	6,162
comp13908_c0_seq1	73,26	37,614
comp13908_c0_seq2	64,896	31,611
comp44036_c0_seq2	0,03	0,16
comp47009_c0_seq1	0,053	0,091
comp47443_c0_seq1	0,03	0,434
Quitina desacetilase		
comp13203_c0_seq1	0,098	3,903
comp13203_c0_seq2	0,12	3,732
comp22811_c0_seq1	0,015	1,175
comp39427_c0_seq2	0,015	0,685

**Tabela 9. Transcritos relacionados ao metabolismo de quitina encontrados no transcriptoma de larvas, pupas e adultos de *C. maculatus*. Os dados foram analisados no transcriptoma publicado por SAYADI *et al* (2016), usando sequencias publicadas no genoma de *Tribolium castaneum* como referência.**

<b>Transcrito de <i>C. maculatus</i> (ID)</b>	<b>Classificação do transcrito de acordo com o genoma de <i>T. castaneum</i></b>
Quitina Sintase	
GEUD01025219.1	PREDICTED: chitin synthase 1 isoform X1
GEUD01195185.1	chitin synthase 2
Quitinase	
GEUD01177134.1	chitinase 10 precursor
GEUD01140638.1	chitinase 7 precursor
GEUD01208149.1	chitinase 5 precursor
GEUD01123680.1	PREDICTED: probable chitinase 2
GEUD01193282.1	PREDICTED: chitinase 13 isoform X1
GEUD01133120.1	chitinase 8 precursor
GEUD01136061.1	chitinase 4 precursor
GEUD01172225.1	PREDICTED: chitinase domain-containing protein 1
GEUD01204795.1	PREDICTED: chitinase-3-like protein 2
GEUD01033853.1	PREDICTED: probable chitinase 3 isoform X1
Quitina Desacetilase	
GEUD01161065.1	chitin deacetylase 1 precursor
GEUD01091824.1	chitin deacetylase 2 isoform A precursor
GEUD01029461.1	chitin deacetylase 2 isoform B precursor
GEUD01142090.1	PREDICTED: chitin deacetylase 5 isoform X6
GEUD01191360.1	PREDICTED: chitin deacetylase 5 isoform X2
GEUD01194439.1	chitin deacetylase 4 precursor
GEUD01003481.1	chitin deacetylase 3 precursor
GEUD01008288.1	chitin deacetylase 6 precursor
GEUD01083876.1	chitin deacetylase 7 precursor

## 5. DISCUSSÃO

Mais de 800 milhões de pessoas vivem em extrema pobreza e sofrem de insegurança alimentar e subnutrição, enquanto outros 2 bilhões estão com sobrepeso ou obesidade. É esperado que a população mundial aumente para mais de 9 bilhões até 2050, com uma grande proporção disso em nações emergentes, especialmente na África subsaariana e Sul da Ásia (DEFRIES *et al.*, 2015). Portanto, é necessário aumentar as demandas de alimentos para suprir o aumento populacional. Sendo assim, as sementes são consideradas fundamentais para a alimentação humana, correspondendo à principal fonte de proteína no mundo em desenvolvimento (ASIF *et al.*, 2013).

As sementes de leguminosas representam cerca de 70% de todos os alimentos para o consumo humano. Essas sementes são a segunda fonte de proteína vegetal mais importante a nível mundial, a seguir dos cereais. Por essas sementes possuírem altos valores nutricionais, são alvos de grandes pragas na agricultura. Os principais grupos de pragas de armazenamento são fungos, bactérias, roedores e insetos que contribuem para perdas no armazenamento. Entre todas as pragas, danos causados por insetos em grãos armazenados podem chegar a 10–50% (FAO, 2012).

Dentre as espécies mais estudadas de insetos praga, chamam atenção os bruquídeos, que destacam-se os insetos *C. chinensis* e o *C. maculatus*, ambos responsáveis por severas perdas em culturas de feijão mungo (*V. radiata*) e de feijão-caupi (*V. unguiculata*) (MAINA *et al.*, 2012; SOMTA *et al.*, 2017). Espécies desse gênero causam danos às sementes de leguminosas que variam, em média, de 5 a 10% em locais de clima temperado e de 20 a 30% em países tropicais (KIRADOO; SRIVASTAVA, 2010).

Embora as sementes de leguminosas possuem uma quantidade moderadamente alta de proteínas, calorias, certos minerais e vitaminas, seu uso na alimentação ainda é limitada pela presença de diversos compostos antinutricionais como fitato, oligossacarídeos, compostos fenólicos, aminoácidos não proteicos, lectinas, inibidores de enzimas, proteínas de defesa, entre outros.

Esses efeitos podem ser considerados positivos, negativos ou ambos (CAMPEÃO, 2002). Nesse contexto, o potencial tóxico desses compostos estão sendo estudado para insetos praga como *C. maculatus*, com destaque para estudos publicados com sementes de *A. lebbbeck*, cultivares resistentes de *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *C. ensiformis* (SOUZA *et al.*, 2011; VENTURY *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2016; DE SÁ *et al.*, 2018).

De Sá *et al.*, (2018) mostraram que tegumentos de *C. ensiformis* bloqueia 100% a penetração larval do inseto *C. maculatus*. Outro trabalho do nosso grupo mostrou que em tegumentos dessa mesma semente tem a presença de um polissacarídeo com um grande potencial tóxico para *C. maculatus* (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Oliveira *et al.*, (1999) mostraram a presença de vicilinas em tegumento de *C. ensiformis* e que as mesmas foram tóxicas para as larvas de *C. maculatus* quando incorporadas em cotilédones artificiais, indicando a presença de compostos tóxicos nos tegumentos dessa espécie.

No presente trabalho foi explorada a toxicidade dos tegumentos de sementes do gênero *Canavalia* para *C. maculatus*. Nossos resultados mostraram que tegumentos naturais das espécies de *C. ensiformis* e *C. rosea* em sementes artificiais alterou significativamente a *oviposição* e bloquearam em 100% a penetração larval, como evidenciado nos estudos de De Sá *et al.*, (2018)

A co-evolução de sementes e herbívoros resultou na seleção dos melhores arsenais de biomoléculas defensivas produzidas em resposta à agressão. Assim, uma vez dada a presença de compostos tóxicos em diversas sementes, como na espécie *C. ensiformis* (SOUZA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001), podem então fornecer alternativas potenciais naturais ao controle de insetos praga como o *C. maculatus*, diminuindo o uso exagerado de inseticidas que tem gerado surgimento de insetos pragas resistentes (DA SILVA *et al.*, 2012). No intuito de investigar a presença de biomoléculas como proteínas que tenham algum papel de defesa ou toxicidade de sementes contra esses agressores bióticos, foi realizada uma análise de proteômica comparativa entre os tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea* a fim de detectar e identificar essas proteínas e tentar relacioná-las como papel de defesa. Em um total de 308 proteínas identificadas, 156 proteínas foram relatadas em ambas as sementes. Dentre essas proteínas presentes em ambos

os tegumentos, algumas se destacam como proteínas de defesa como ureases (FOLLMER *et al.*, 2004) e proteínas com domínio peptidases (SILVA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004; CAMAROTI *et al.*, 2018; KUNS *et al.*, 2019). Dentre 7 proteínas identificadas unicamente em tegumentos de *C. ensiformis* e em tegumentos de *C. rosea*, nenhuma foi relacionada à defesa. Entretanto, a maioria das únicas encontradas em tegumentos de *C. ensiformis* estão relacionadas a processos biológicos de ligação à carboidratos. Por outro lado, para as únicas identificadas em tegumentos de *C. rosea*, a maioria está relacionada a processos do metabolismo energético. Visto que foram encontradas cerca de 38 proteínas aumentadas em tegumentos de *C. ensiformis*, as proteínas que mais estão relacionadas com a defesa são as ureases, lipoxigenases e em especial, uma quitinase. (FOLLMER *et al.*, 2004; FELTON *et al.*, 1994; VISWANATH *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2011; GROVER *et al.*, 2012). Entre as 96 proteínas diminuídas em tegumentos de *C. ensiformis*, as análises proteômicas revelaram a presença também de ureases, proteínas contendo o domínio peptidase A1, lipoxigenases.

As ureases são metaloenzimas que catalisam a hidrólise da uréia para produzir amônia e dióxido de carbono (DIXON *et al.*, 1975). São encontrados em uma variedade de organismos, incluindo fungos, bactérias e plantas (HIRAYAMA *et al.*, 2000; COX *et al.*, 2000). Ureases de sementes de soja e feijão-guandu, apresentam atividades inseticidas e antifúngicas, podendo formar poros no trato digestório de insetos (DANG E DAMME, 2015). A urease vegetal mais bem caracterizada é o de feijão-de-porco (*C. ensiformis*) (FOLLMER *et al.*, 2004; KRAJEWSKA E CIURLI, 2005). Follmer *et al.*, (2004) mostraram que uréases de *C. ensiformis*, chamada de JBU, foram tóxicas para o inseto *Dysdercus peruvianus*, gerando efeitos prejudiciais nos insetos sobreviventes, reduzindo o peso corporal e retardo no desenvolvimento de ninfas em adultos.

As lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de lipídeos poli-insaturados que possuem frações cis,cis-pentadieno (HILDEBRAND *et al.*, 1988). Estudos mostram que em folhas de tomate, o ácido linolênico, um hidroperóxido derivado da atividade dessas lipoxigenases, são precursores do ácido jasmônico, que possivelmente está relacionado na rota de ativação genética dos inibidores de proteases que desempenham ataques contra insetos

(FARMER E RYAN, 1992). As quitinases, como já relatadas, são endoglicosil-hidrolases que clivam de forma específica as ligações glicosídicas da quitina, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações do tipo  $\beta$ -[1-4], encontradas principalmente nas carapaças de crustáceos, cutículas e membrana peritrófica de insetos e na parede celular de fungos, sendo, depois da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza (FLACH *et al.*, 1992).

As peptidases e proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas nas extremidades amino peptidases ou carboxipeptidases. Alguns estudos também mostram atividades de proteases relacionadas a defesa de plantas (HARRISON; BONNING, 2010;) e seus principais alvos nos insetos são tecidos do intestino como a matriz peritrófica e cutícula (MOHAN *et al.*, 2006, 2008). Silva *et al.*, (2016) isolaram do tegumento de sementes de *A. lebeck* proteínas similares a mexicaina e a vignaina, ambas proteases cisteínicas. Essas proteases foram tóxicas para larvas de *C. maculatus*. Os inibidores de peptidase e proteases (IPs) também são alvos de estudos uma vez que são proteínas multifuncionais, tendo a função também de proteína de armazenamento quanto a defesa da planta. Quando ingeridos por insetos, os IP's formam complexos compactos com peptidases comprometendo o processo digestivo larval (OLIVIA *et al.*, 2010, 2011). Essas moléculas antinutricionais são amplamente distribuídas em Fabaceae, famílias Solanaceae e Poaceae e têm sido extensivamente estudados. A atividade biológica dos IP's tem sido explorada por controle de pragas. Insetos alimentados com dieta artificial contendo IPs do classe principal de suas peptidases intestinais mostram efeitos negativos no desenvolvimento larval (BEZERRA *et al.*, 2017; JAMAL *et al.*, 2015).

Proteínas estão entre os compostos de plantas relacionados aos mecanismos de defesa, e dentre estas estão proteínas com afinidade a quitina. As plantas sintetizam uma variedade de proteínas que se ligam a quitina, a maioria contém um ou mais domínios de ligação a esse polímero apresentando toxicidade para insetos (ASENSIO *et al.*, 2000; YUNES *et al.*, 1998; MOTTA *et al.*, 2003). Portanto, foi realizado o isolamento e detecção de proteínas com afinidade à quitina nos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea*. Os nossos

resultados mostraram que em ambos os tegumentos existem proteínas com afinidade a quitina. A presença de vicilinas e quitinases foi confirmada na fração retida em quitina dos tegumentos de sementes de *C. ensiformis*. A presença dessas proteínas foi confirmada por *Western blotting* e por espectrometria de massas. As bandas reativas com o anticorpo anti-vicilinas apresentaram massas moleculares similares as descritas por Macedo *et al.*, (1993) e Sales *et al.*, (2001). Algumas bandas proteicas também reagiram com anticorpos anti quitinases, evidenciando massas moleculares de 130 kDa e entre 40 e 25 kDa.

Vicilinas e quitinases que se ligam à quitina da matriz peritrófica do intestino médio de insetos, isoladas de cotilédones ou tegumentos são alvos de estudos para inibir o desenvolvimento de diversos insetos praga, como o *C. maculatus* (TERRA *et al.*, 2001; YUNES *et al.*, 1998; MOTA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 1996). Uchoa *et al.*, (2006) detectaram vicilinas no lúmen do intestino médio e hemolinfa das larvas de *C. maculatus*. Além disso, vicilina também foi detectada nos túbulos de malpighi e no corpo gorduroso 48 horas após a ingestão. Dessa forma, foi investigado se essas vicilinas e quitinases detectadas em frações retidas em quitina dos tegumentos de *C. ensiformis* apresentariam toxicidade para o inseto *C. maculatus*, nossos resultados mostram que em sementes artificiais contendo 1% dessa fração retida, houve alteração na oviposição e pouca diminuição em relação à eclosão e massa das larvas de *C. maculatus*, 20 DAO. Já nas sementes artificiais contendo 1% da fração retida em quitina dos tegumentos de *C. rósea*, os parâmetros de desenvolvimento foram bem mais afetados, com redução de massa larval em aproximadamente 59,6%. Muitos trabalhos mostraram que vicilinas que se ligam a quitina de diversas sementes foram tóxicas para o inseto *C. maculatus* (MACEDO *et al.*, 1993; YUNES *et al.* 1998; SALES *et al.*, 2001, MOTA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.* 2020; FERREIRA *et al.* 2021). Em uma concentração de 0,1%, vicilinas isoladas do tegumento de *Albizia lebbbeck*, apresentaram efeito tóxico para as larvas de *C. maculatus*, reduzindo cerca de 77 % a massa larval (SOUZA *et al.*, 2012).

A presença de quitinases em tegumentos de *Glycine max* (soja) já havia sido mostrada previamente por Silva *et al.*, (2018). Essas proteínas apresentaram massas moleculares entre 26 e 36 KDa e foram tóxicas para *C.*

*maculatus*. Em concentração de 0,1%, essa proteína reduziu a sobrevivência larval em 77%, e em concentração de 0,5%, reduziu a massa larval em 60%. Essa fração marcada com FITC foi detectada no intestino e nas fezes das larvas 20 DAO. Nesse trabalho os autores também testaram a toxicidade dessa proteína quando adicionada em tegumentos artificiais e mostraram mortalidade larval de 90% e redução de massa larval de 87%, entretanto a concentração eficiente foi de 25% (SILVA *et al.*, 2018). Outro estudo mostrou bandas que reagiram com o anticorpo anti quitinase, com massas moleculares abaixo de 40 kDa de uma fração retida em quitina de cotilédones de sementes de cultivares de *V. unguiculata* resistentes a infestação por *C. maculatus* (FERREIRA *et al.*, 2018). A atividade inseticida de quitinases de diversos organismos vem sendo bastante estudada. Quitinase isolada de *Pseudomonas fluorescens* apresentou atividade inseticida contra *Helopeltis theivora* (SUGANTHI *et al.*, 2017). Em vista disso, separamos as vicilinas das quitinases da fração retida em quitina de tegumentos de *C. ensiformis*, por diferença de solubilidade. A fração rica em quitinase (FRQ) quando adicionada a 1% em sementes artificiais, apresentou toxicidade para o inseto *C. maculatus*, com redução da massa larval, em 64,4%.

A fim de investigar a interação molecular entre as vicilinas e quitinases com a quitina, experimentos *in silico*, como o *docking* molecular foram realizados. As sequências obtidas da banda de 25 kDa por espectrometria de massas foram usadas para fazer um BLASTp com proteínas que tivessem estruturas depositadas no PDB. A vicilina de *V. angularis* (2EA7) foi a proteína que apresentou maior similaridade com as sequências dos peptídeos, sendo assim escolhida para os experimentos *in silico*. Trabalhos anteriores já identificaram possíveis sítios de ligação a quitina em vicilinas. Rocha *et al.*, (2018), relataram a presença de três potenciais sítios de ligação a quitina, localizados nos vértices de três cadeias na forma trimérica da vicilina do feijão-caupi. Miranda *et al.*, (2020), relataram que a região na sequência "REQIRELMK" (Arg-208 a Lys-216) forma uma  $\alpha$ -hélice exposta na estrutura molecular do monômero de vicilina onde seria preferencialmente o sítio de ligação à quitina. Posteriormente Ventury *et al.*, (2022) também mostrou essa região na vicilina de genótipos resistentes de *V. unguiculata* e que a mesma foi capaz de se ligar a quitina por experimentos *in silico*. Esse sítio de ligação previamente identificado por Miranda *et al* (2020),

também estava presente nos peptídeos obtidos da vicilina de tegumento de *C. ensiformis*, por esse motivo, o *docking* da vicilina com (NAG)<sub>4</sub> foi realizado de modo a incluir essa região. Os resultados mostraram valores negativos de energia de afinidade (-7,58 kcal / mol), indicando que a ligação ocorre de forma espontânea. Ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas foram observadas. O resíduo Lys187 realiza ligações de hidrogênio e pontes salinas, da mesma forma, o mesmo resíduo Lys216 descrito por Miranda *et al.*, 2020, interage por pontes salinas. Os outros resíduos como Arg, Glu e Asp que realizam interações de hidrogênio também foram relatados. Estudos indicaram que os sítios de ligação entre proteínas e açúcares são compostas por um alta concentração de Glu e Asp carregados negativamente, juntamente com resíduos polares e aromáticos (NASSIF *et al.*, 2009). Saeed *et al.*, (2022), relataram sítio de ligação da vicilina de *P. sativum* com quitina e viram que os resíduos aspartato e glutamato foram os principais resíduos de vicilina que interagiram e desempenharam um papel significativo para o desenvolvimento de interações estáveis entre a proteína e a quitina.

Nossos resultados do BLASTp também mostraram similaridades com uma quitinase de *C. ensiformis* (PDB: 1DJX). HAHN *et al.*, (2000), relataram que o sítio de ligação da quitina com a quitinase de *C. ensiformis* se encontra entre o aminoácido Glu68 e Thr119. Portanto, o *docking* da quitinase com (NAG)<sub>4</sub> foi realizado nessa região próxima do sítio de ligação e apresentou valores negativos de -8,795 kcal / mol, ou seja, com maior afinidade do ligante com o receptor. Nossos resultados evidenciaram que os resíduos Glu67 e Thr118 observados são os mesmos descritos em Hahn *et al.*, 2000, apresentados como Glu68 e Thr119, realizando ligações de hidrogênio. TYR96 e PHE155 também interagiram com (NAG)<sub>4</sub> por interações hidrofóbicas.

Mecanismos de interferência na matriz peritrófica (MP) tem sido alvo de grandes estudos para o controle de diversos insetos praga, uma vez que apresentam diversas funções importantes como proteger o epitélio do intestino contra possíveis injúrias mecânicas e/ou químicas, contra a penetração de microrganismos do alimento, participa da reciclagem das enzimas digestivas e auxilia na digestão (TERRA, 2001). A fim de investigar os efeitos deletérios que interferência no metabolismo de quitina, conseqüentemente na matriz peritrófica,

causaria no desenvolvimento de *C. maculatus*, incorporamos em tegumentos artificiais calcofluor white (um ligante de quitina que inibe o metabolismo normal desse carboidrato) em concentrações de 1% e 0,5%. Estudos de RAM e KLIS (2006), relataram que esse corante alterou funções morfológicas e inibiu a ação de quitinases em células fúngicas. Nossos resultados para o inseto *C. maculatus* mostraram que em sementes artificiais com tegumentos artificiais contendo 1% de calcofluor, a oviposição foi reduzida em relação ao controle e a penetração larval (taxa de eclosão) foi completamente inibida. Os mesmos parâmetros foram analisados em sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor. Nesse caso, a taxa de oviposição também foi menor e a massa larval foi reduzida mais de 50%. REES *et al.*, 2009 relataram que o calcofluor interrompe a MP, mas esse composto depois é excretado pelo inseto, não ficando muito tempo ligado à membrana do intestino médio, tendo, portanto, efeito tóxico curto para lepidópteras.

Com o propósito de compreender mais afundo sobre o efeito tóxico do calcofluor, foi investigado alterações nas principais biomoléculas e nas atividades digestivas do inseto. Nossos resultados mostraram que as larvas sobreviventes apresentaram alterações metabólicas consideráveis, quando comparadas as larvas controle. Foram observados aumentos na atividade das enzimáticas  $\alpha$ -amilase, lipase e protease cisteínica. Resultado similar observado por Cruz *et al.*, (2016), em larvas de 20 DAO de desenvolvidas em sementes de *V. unguiculata*, do cv. BRS Xiquexique, resistente a *C. maculatus*. Os níveis de colesterol e proteínas totais também tiveram um aumento significativo. Esses dados indicam que a interferência no metabolismo de quitina pode resultar num desbalanço geral no metabolismo energético da larva.

A quitina é um importante carboidrato no desenvolvimento de insetos, participando tanto no exoesqueleto como na matriz peritrófica (CANELLA e GARCIA, 2001). Existem pelo menos três tipos de enzimas classicamente envolvidas no metabolismo de quitina em insetos, as quitina sintases e quitina desacetilases que estão relacionadas com a biossíntese de quitina e as quitinases que estão envolvidas na degradação/reciclagem da quitina em vários insetos. As enzimas do tipo quitina sintases (CS) são enzimas da família 2 das glicosiltransferases que catalisam a formação da quitina através da transferência

de N- acetilglucosamina da uridina difosfato N- acetilglucosamina (UDP- GlcNac) para o crescimento da cadeia de microfibrilas cristalinas de quitina, que se combinam com outras moléculas como proteoglicanos e proteínas (ZHONG *et al.*, 2014). A quitina sintase (CHS) é uma dessas enzimas, sendo chave na via da síntese da quitina de alguns insetos. Essas enzimas que são grandes proteínas transmembranares, com massa molecular em torno de 160 a 180 KDa e sua atividade depende da presença de cofatores como cátions divalentes. Além disso, a CHS-Aa é predominantemente expressada em carapaças/tegumento de insetos, enquanto CHS-Ab é expressa principalmente em traqueias. Já a CHS-B é mais expressa no intestino dos insetos (ZHU *et al.*, 2016).

Todos os artrópodes que contêm quitina como constituinte de seus tecidos, como do exoesqueleto, parecem ter genes que codificam para quitina desacetilases (CDA's) (ZHONG *et al.*, 2014). As CDA's também são encontradas extensivamente em fungos e têm papéis na modificação de paredes de células ou esporos. Elas também são encontradas em bactérias e plantas, onde podem ter funções digestivas e de defesa. No entanto, as funções precisas dos CDA's de insetos não são bem compreendidas. Já se sabe que essas enzimas são importantes para a formação e a organização da cutícula (ZHU *et al.*, 2016).

Por outro lado, as quitinases (CHT's) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ - 1-4 de polímeros de quitina. Em insetos, apresentam 3 domínios: região catalítica, região rica em prolina, glutamato, serina e treonina e região rica em cisteínicas (KRAMER E MUTHUKRSHNAN; 1997), sendo a região cisteínica a principal em ligação à quitina. Teoricamente, um é responsável pela degradação da quitina do exoesqueleto em períodos de muda e o outro é responsável pela degradação da quitina da MP do inseto ZHU *et al.*, 2008.

A MP dos insetos aparentemente é degradada periodicamente e substituída por uma nova MP no momento da muda, para permitir crescimento intestinal e também nos picos de alimentação (TERRA, 2001). Em geral, as partes anterior e média do intestino médio parecem conter a maioria dos transcritos para a enzima quitina sintase CHS-B, que é relacionada como sendo a principal na síntese de quitina da MP (ARAKANE *et al.*, 2005). Da mesma forma, alguns genes para quitinases (CHT) parecem ser expressos nas partes

anterior e média do intestino médio. No entanto, outros são expressos predominantemente nas partes média e posterior do intestino médio (ZHU *et al.*, 2008). Embora os autores acreditem que parte dos produtos originados da degradação da quitina sejam utilizados para a síntese de nova quitina, as evidências experimentais para esse evento ainda são limitadas (ZHU *et al.*, 2016). Para comprovar a presença de um metabolismo de quitina ativo desde as fases iniciais até as finais do ciclo de vida de *C. maculatus*, buscamos a presença de transcritos para enzimas relacionadas com o metabolismo de quitina no transcriptoma de embriões, larvas, pupas e adultos do inseto. Nossas buscas detectaram a presença de transcritos para as enzimas quitina sintase, quitina desacetilase e quitinases em embriões, larvas, pupas e adultos de *C. maculatus*, indicando que o metabolismo de quitina é ativo em todas as fases do ciclo de desenvolvimento do inseto.

Sendo assim, o estudo de proteínas inseticidas de plantas, como as vicilinas e quitinase, cujos mecanismos de toxicidade se concentram na interferência do metabolismo de quitina, representa uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de técnicas de controle dessa praga, pois pode interferir com o desenvolvimento do inseto nas mais diferentes fases do ciclo de vida.

## 6. CONCLUSÃO

- Os tegumentos naturais de *C. ensiformis* e *C. rosea* inibem 100% a eclosão larval e conseqüentemente a penetração do inseto *C. maculatus*;
- A análise de proteômica comparativa dos tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rosea* identificou 308 proteínas. A maioria delas, um total de 156 estavam presentes em ambos os tegumentos com níveis de expressão similares. 38 proteínas estavam aumentadas (UP) e 96 proteínas estavam diminuídas (DOWN) no tegumento de *C. ensiformis*. Das proteínas encontradas, 7 estavam presentes unicamente nos tegumentos de *C. ensiformis* e 7 nos tegumentos de *C. rosea*.
- Os tegumentos de *C. ensiformis* e *C. rósea* possuem proteínas com afinidade a quitina;
- Vicilinas e quitinases estão presentes na fração com a afinidade a quitina de tegumentos de *C. ensiformis*;
- Concentração de 1% da fração retida em quitina de ambos os tegumentos interferiu no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*.
- A fração rica em quitinase de tegumentos de *C. ensiformis* foi mais tóxica para as larvas de *C. maculatus* do que a fração total de proteínas com afinidade a quitina;
- Análises, *in silico*, mostraram que interações entre o monômero de vicilina de tegumentos de *C. ensiformis* e o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina ocorrem espontaneamente através de ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas;
- Análises, *in silico*, mostraram que interações entre a quitinase de tegumentos de *C. ensiformis* e o tetrâmero de *N*-acetilglicosamina

ocorrem espontaneamente através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

- 1% de calcofluor, quando adicionado em tegumentos artificiais, bloqueou 100% a eclosão das larvas de *C. maculatus*;
- Larvas desenvolvidas em sementes artificiais após ultrapassarem um tegumento artificial contendo 0,5% de calcofluor tiveram uma redução significativa na massa corporal;
- Análises bioquímicas das larvas 20 DAO desenvolvidas de sementes artificiais contendo 0,5% de calcofluor nos tegumentos artificiais, mostraram alterações na atividade das enzimáticas  $\alpha$ -amilase, lipase e protease cisteínica e nos níveis de colesterol e proteínas totais;
- Transcritos para as enzimas quitina sintase, quitina desacetilase e quitinases foram identificados em embriões, larvas, pupas e adultos de *C. maculatus*, indicando que o metabolismo de quitina é ativo em todas as fases do ciclo de desenvolvimento do inseto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, J., K.V. DILEEP, M. PALANIMUTHU, K. GEETHANANDAN, C. SADASIVAN, AND M. HARIDAS. Metal ions in sugar binding, sugar specificity and structural stability of *Spatholobus parviflorus* seed lectin. *J. Mol. Model.* 19(8):3271-3278, 2013.

AGRIOS, G.N. (Ed.) *Plant pathology*. 4th ed. California: Academic Press. p. 93-114, 1977.

AKIBODE, S., & MAREDIA, M. Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. Disponível em <https://impact.cgiar.org/sites/default/files/images/Legumetrendsv2.pdf>. Acessado em 17.01.2017

AL ATALAH, B., G. SMAGGHE, AND E.J. VAN DAMME. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects. *Plant Sci.* 222:21-8, 2014.

ANDERSON JT, MITCHELL-OLDS T. Ecological genetics and genomics of plant defences: evidence and approaches. *Functional Ecology* 25, 312–324, 2011.

ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S, KRAMER KJ, SPECHT CA, TOMOYASU Y, et al. The *Tribolium* chitin synthase genes *tcchs1* and *tcchs2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.* 14:453-63, 2005

ASIF, M., ROONEY, L. W., ALI, R., RIAZ, M. N. Application and opportunities of pulses in food system: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 11, p. 1168-1179, 2013

BANGA KS, KOTWALI WALE N, MOHAPATRA D, GIRI SK. Techniques for insect detection in stored food grains: An overview. *Food Control.* 2018; 94:167-176.

BAZZANO LA, HE J, OGDEN LG et al. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med*; 161: 2573–2578, 2001.

BECK, C. W.; BLUMER, L. S. A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. National Science Foundation, n. September, p. 1–17, 2011.

BENTON MA., KENNY NJ; CONRADS KH., ROTH S., LYNCH JA. Deep, Staged Transcriptomic Resources for the Novel Coleopteran Models *Atrachya menetriesi* and *Callosobruchus maculatus*. Plos One. DOI:10.1371/ journal.pone. 0167431, 2016.

BEYRA-MATOS, A.; REYES, G.; HERNA´NDEZ, L., AND HERRERA P. Revision taxon ´ omica del g ´ enero ´ *Canavalia* DC. (LeguminosaePapilionoideae) en Cuba. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, 28(107), 157–175, 2004.

BEZERRA, C. S.; OLIVEIRA, C. T.; MACEDO, M. L. R. Inga vera trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Ephestia kuehniella* larvae. Entomol. Exp. Appl., 10.1111/eea.12605, 2017.

BRESSANI R, BRENES RG, GARCIA A, ELIAS LG. Chemical composition, amino acid content and protein quality of *Canavalia* spp seeds. J Sci Food Agric 40: 17-23, 1987.

BROEKGAARDEN C, SNOEREN TAL, DICKE M, VOSMAN B. Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. Plant Biotechnology Journal 9, 819–825, 2011.

CARLINI CR, GROSSI-DE-SA´ MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 2002;40:1515–39, 2002.

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

CHEN, T. C., YI-LING, H., & HSIEN-YI, S. Purification and proper- ties of chitinase from cabbage stems with roots. Biochemical and Molecular Biology Interactions, 40(2), 417–425, 1996.

COLLINGE, D. B., KRAGH, K. M., MIKKELSEN, J. D., NIELSEN, K. K., RASMUSSEN, U., and Vad, K. Plant chitinases. Plant J. 3: 31–40, 1993.

CRUZ, L. P. de SÁ, L. F. R. SANTOS, L. A. GRAVINA, G. A. CARVALHO, A. O. FERNANDES, K. V. S. FREIRE FILHO, F. R. GOMES, V. M. OLIVEIRA, A. E. A.. Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. *Journal of Pest Science*, v. 89, n. 1, p. 117–128, 29 mar. 2016.

DA SILVA, P., EYRAUD, V., CARRE-PIERRAT, M., SIVIGNON, C., RAHIOUI, I., ROYER, C., et al. High toxicity and specificity of the saponin 3-GlcA- 28-AraRhaxylmedicagenate, from *Medicago truncatula* seeds, for *Sitophilus oryzae*. *BMC Chemical Biology*, 12, 3, 2012.

DE GEYTER, E. D., LAMBERT, E., GEENLEN, D., E SMAGGHE, G. Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. *Pest Technology*, 1(2), 96-105, 2012.

DE METS, R., JEUNIAUX, C. On the organic substances constituting the peritrophic membrane of insects. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 70, 93–96, 1962.

DE SÁ, L. F. R. VENTURY, K. E., MACHADO, OLGA L. T., FERNANDES, K. V. S., XAVIER-FILHO, J. OLIVEIRA, A. E. A. Toxic effect of *Canavalia ensiformis* seed coat on larval development of *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Pest Science*, v. 91, n. 1, p. 313–326, 20 jan. 2018.

DE SÁ, L. F. R. WERMELINGER, T.T., RIBEIRO, E. S. GRAVINA, G. A. FERNANDES, K. V. S. XAVIER-FILHO, J. VENANCIO, T. M. REZENDE, G. L. OLIVEIRA, A. E. A. Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 60, n. 1, p. 50–57, 2014.

DIXON, N.E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R.L., ZERNER, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4131–4133, 1975.

DOWD, P. F., MEHTA, A. D., AND BOSTON, R. S. Relative toxicity of the maize endosperm ribosome-inactivating protein to insects. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3775–3779. doi: 10.1021/jf980334w, 1998.

DOWD, P. F., ROBER, A. H., PINKERTON, T. S., JOHNSON, E. T., LAGRIMINI, L. M., AND BOSTON, R. S. Relative activity of a tobacco hybrid expressing high levels of a tobacco anionic peroxidase and maize ribosome-inactivating protein against *Helicoverpa zea* and *Lasioderma serricorne*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2629–2634. doi: 10.1021/jf058180p, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *Seeds in Emergencies*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. v. 202, 2010.

FARIAS, L. R., COSTA, F. T., SOUZA, L. A., PELEGRINI, P. B., GROSSI-DE-SÁ, M. F., NETO, S. M., ... & FRANCO, O. L. (2007). Isolation of a novel *Carica papaya*  $\alpha$ -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(3), 255-260.

FARMER EE, RYAN CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4:129–134

FELTON, GW, BI, JL, SUMMERS, CB et al. Papel potencial das lipoxigenases na defesa contra a herbivoria de insetos. *J Chem Ecol* 20 , 651-666, 1994.

FRANCO OL, SANTOS RC, BATISTA JNA, MENDES ACM, ARAÚJO MAM, MONNERAT RG, GROSSI-DE-SÁ MF, FREITAS SM. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry*. v. 63, p. 343– 349, 2000.

GALLEGO-FERNA´NDEZ, J.B. AND MART´INEZ, M.L. Environmental filtering and plant functional types on Mexican foredunes along the Gulf of Mexico. *Ecoscience*, 18(1), 52–62, 2011.

GATEHOUSE, A. M. R., BARBIERI, L., STIRPE, F., AND CROY, R. R. D. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 54, 43–51. doi: 10.1111/j.1570-7458.1990.tb01310.x, 1990.

GOMES, V. M.; OLIVEIRA, A. E. A.; XAVIER-FILHO, J. Chitinase and alpha beta-1,3- glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp)

inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. *Journal of the science of food and agriculture.*, 1996

GROSS, C.L., . The reproductive ecology of *Canavalia rosea* (Fabaceae) on Anak Krakatau, Indonesia. *Australian Journal of Botany*, 41(5), 591–599, 1993.

GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31:1, 57-73, 2012.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Proteases as insecticidal agents. **Toxins**, v. 2, p. 935–953, 2010

HIRAYAMA, C., SUGIMURA, M., SAITO, H., NAKAMURA, M.. Purification and properties of urease from leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry* 53, 325–330, 2000.

ITURRALDE-GARCÍA RD, BORBOA-FLORES J, CINCO-MOROYOQUI FJ, RIUDAVETS J, DEL TORO-SÁNCHEZ CL, RUEDA-PUENTE, Effect of controlled atmospheres on the insect *Callosobruchus maculatus* Fab. in stored chickpea. *Journal of Stored Products Research*,; 69, 78-85, 2006.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; AHMED, W. A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. *Process Biochem.* 50, 311–316, 2015.

JENKINS DJ, KENDALL CW, AUGUSTIN LS et al. Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*; 172: 1653–1660, 2012.

JOHNSON MTJ. Evolutionary ecology of plant defences against herbivores. *Functional Ecology* 25, 305–311, 2011.

KABIR SR, RAHMAN MM, TASNIM S, KARIM MR, KHATUN N, HASAN I, AMIN R, ISLAM SS, NURUJJAMAN M, KABIR AH, NIRANJAN KS, YASUHIRO O, ASADUZZAMAN AKM, Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. *Int J Biol Macromol* 84:62–68, 2016.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases—regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8: 809–824, 2003.

KEBEDE E. Grain legumes production and productivity in Ethiopian smallholder agricultural system, contribution to livelihoods and the way forward. *Kebede, Cogent Food & Agric.*; 6(1):1722353, 2020.

KOROMA S, MOLINA P B, WOOLFREY S. Promoting regional trade in pulses in the Horn of Africa, 2016.

KRAJEWSKA, B., CIURLI, S., Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid–base groups of the active site by pH variation. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 651–658, 2005.

KRAMER KJ and MUTHUKRISHNAN S. Chitin metabolism in insects. In: L. I. Gilbert, K. Iatrou and S. Gill, eds., *Comprehensive Molecular Insects Science*. Vol 4, Biochemistry and Molecular Biology, Chapter 3. Elsevier Press, Oxford, UL. Vol 4, p. 111-144, 2005

KUMAR, D., VERMA, H. N., TUTEJA, N., AND TEWARI, K. K. Cloning and characterization of a gene encoding an antiviral protein from *Clerodendrum aculeatum* L. *Plant Mol. Biol.* 33, 745–751. doi: 10.1023/A:1005716103632, 1997.

KUMAR, S. AND A. SINGH. Biopesticides: Present status and the future prospects. *J. Fertilizers Pesticides*, 6: 1-2, 2015.

L. DANG, V.E. DAMME. **Toxic proteins in plants**. *Phytochemistry*, 117 ,pp. 51-64, 2015.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42, 525-550, 1997.

LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, 577p, 2005.

LIS, H. & SHARON, N. Legume lectins - a large family of ho-mologous proteins, *FASEB Journal*, 4(14): 3198-3208, 1990.

LORINI, I. KRZYZANOWSKI, F. C. DE BARROS, J. ADEMIR, F. N. HENNING, A. HENNING, F. A. Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. 1 a ed. Brasília: Embrapa, 2015.

LOVEJOY, J.C. Fat: The Good, the Bad, and the Ugly. In Nutrition Guide for Physicians (pp. 1–11). Humana Press, 2010.

MACEDO, M. L. R. DA S. A. L. B., MORAES, R. A. XAVIER-FILHO, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, v. 105, n. 1, p. 89–94, 1 maio 1993.

MANSOOR, A. A. AND YUSUF, H. K. M. In vitro protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*). *Food Sci. Tech.* 37:979–999, 2002.

MERZENDORFER, H., KELKENBERG, M., MUTHUKRISHNAN, S. Peritrophic matrices. In: Cohen, E., Moussian, B. (Eds.), *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 255–324, 2016.

MICHIELS, K., E.J. VAN DAMME, AND G. SMAGGHE. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 73(4):193-212, 2010.

MIRANDA, M. R. A., UCHÔA, A. F., FERREIRA, S. R., VENTURY, K. E., COSTA, E. P., CARMO, P. R. L., MACHADO, O., FERNANDES, K. V. S., OLIVEIRA, A. E. A. Chemical modifications of vicilins interfere with chitin-binding affinity and toxicity to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) insect: a combined in vitro and in silico analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 20, p. 5596–5605, 2020.

MOHAN, S. et al. A naturally occurring plant cysteine protease possesses remarkable toxicity against insect pests and synergizes *Bacillus thuringiensis* toxin. *PLoS ONE*, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2008.

MOHAN, S. et al. Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *Journal of Insect Physiology*, v. 52, p. 21–28, 2006.

MOÏSE, J. A., HAN, S., GUDYNAITE-SAVITCH, L., JOHNSON, D. A. MIKI, B. L. A. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 41, n. 5, p. 620–644, set. 2005.

MOLINA MR, BRESSANI R. Protein-starch extraction and nutritive value of the jack bean and jack bean protein isolate. In: Jaffe WG (ed), Proceedings of a meeting held in Ribeirao Preto, Brazil, 1973 on Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods, pp 153-163, 1973.

MOTA AC, DAMATTA RA, LIMA-FILHO M, SILVA CP, XAVIER-FILHO J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *J Insect Physiol* 49:873–880, 2003.

MOTA, A. C. DaMatta, R.A. Lima F. M., Silva, C.P. Xavier-Filho, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *Journal of Insect Physiology*, v. 49, n. 9, p. 873–880, set. 2003.

MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C. & SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, 29: 85-89, 1990.

NASSIF H, AL-ALI H, KHURI S, KEIROUZ W. Prediction of protein-glucose binding sites using support vector machines. *Proteins*. 2009;77(1):121-132

Nation JL. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, 2008.

OLIVA, M. L. V.; FERREIRA, R. S.; FERREIRA, J. G.; DE PAULA, C. A. A.; SALAS, C. E.; SAMPAIO, M. U. Structural and Functional Properties of Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminosae: A Mini Review. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 12, 348–357, 2011.

OLIVEIRA AEA, SALES MP, MACHADO OLT, FERNANDES KVS. The toxicity of jack bean (*Canavalia ensiformis* (L) DC) cotyledonary and testa proteins to the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. v. 92, p. 249-255, 1999

OLIVEIRA GB, KUNZ D, PERES T V., LEAL RB, UCHÔA AF, SAMUELS RI, MACEDO MLR, CARLINI CR, RIBEIRO AF, GRANGEIRO TB, et al. Variant vicilins from a resistant *Vigna unguiculata* lineage (IT81D-1053) accumulate inside *Callosobruchus maculatus* larval midgut epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v.168, p. 45–52, 2014.

OSBORN, T.C., BUROW, M. & BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, 240: 207-210, 1998.

PAES EV, UCHÔA AF, PINTO MST, SILVA CP, FERNANDES KVS, OLIVEIRA AEA XAVIER-FILHO J, Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomol Exp Appl* 129:11–17, 2008.

PATEL, A. K., SINGH, V. K., YADAV, R. P., MOIR, A. J. G., & JAGANNADHAM, M. V. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process Biochemistry*, 45(5), 675–681, 2010.

PRAKASH, A.; RAO, J.; MUKHERJEE, A.K.; BERLINER, J.; POKHARE, S.S.; ADAK, T.; MUNDA, S.; SHASHANK, P.R. *Climate Change: Impact on CroPests; Applied Zoologists Research Association (AZRA), Central Rice Research Institute: Odisha, India; ISBN 81-900947-2-7, 2014.*

PURSEGLOVE JW. *Tropical crops dicotyledons, Vols 1 and 2.* London: The English Language Book Society and Longman, 1977.

REES., S; JARRENT. P., . Peritrophic membrane contribution to Bt Cry  $\delta$ -endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. Department of Biochemistry, Tennis Court Road, University of Cambridge, Cambs CB2 1GA, UK, 2008.

RODRIGUES BF, TORNE SG. A chemical study of seeds in three *Canavalia* species. *Tropical Sci* 31: 101-103, 1991.

SAEED, Ahsan et al. In-silico Studies Calculated a New Chitin Oligomer Binding Site Inside Vicilin: A Potent Antifungal and Insecticidal Agent. *Dose-Response*, v. 20, n. 2, p. 15593258221108280, 2022.

SAHAI, A. AND MANOCHA, M. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 317–338, 1993.

SANTOS, J. P. DOS; MANTOVANI, E. C. *PERDAS DE GRÃOS NA CULTURA DO MILHO.* Sete Lagoas: EMBRAPA- CNPMS, 1997. SHEVCHENKO, A. WILM, M. VORM, O, MANN, M. *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-*

Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 5, p. 850–858, jan. 1996.

SCHALLER, A.; HOWE, G.A. Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores. In *Induced Plant Resistance to Herbivory*; Schaller, A., Ed.; Springer Science+Business Media: Berlin, Germany,; pp. 7–29, 2008.

SCHOONHOVEN LM, VAN LOON JJA, DICKE M. *Insect-Plant Biology*. New York: Oxford University Press, 2005.

SHAHIDI-NOGHABI, S., VAN-DAMME, E. J. M., AND SMAGGHE, G. Carbohydrate-binding activity of the type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I from elderberry (*Sambucus nigra*) is a determining factor for its insecticidal activity. *Phytochemistry* 69, 2972–2978. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.09.012, 2008.

SHARMA, N. ; SHARMA, KP ; GAUR, RK ; GUPTA, VK. Papel da quitinase na defesa vegetal. *Asian Journal of Biochemistry* Vol.6 No.1 pp.29-37 ref.many, 2011.

SHEWRY, P. R. Plant Storage Proteins. *Biological Reviews*, v. 70, n. 3, p. 375–426, 1995.

SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (Coleoptera: bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, v. 99, n. 3, p. 529–533, 1991.

SILVA, J. S.; CORREA, P. C. Estrutura, composição e propriedades dos grãos. In: SILVA, J. DE S. E (Ed.). . *Secagem e Armazenamento de Grãos no Brasil*. 1a ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008. p. 21–36.

SILVA, N. C. Conceição, J. G., Ventury, K. E., De Sá, L. F. R., Oliveira, E. A. G. SANTOS, I. S. GOMES, V. M. COSTA, M. N., FERREIRA, A. T. S. PERALES, J., XAVIER-FILHO, J. FERNANDES, K. V. S. OLIVEIRA, A. E. A. Soybean seed coat chitinase as a defense protein against the stored product pest

*Callosobruchus maculatus*. *Pest Management Science*, v. 74, n. 6, p. 1449–1456, 1 jun. 2018.

SOUZA, A. J., FERREIRA, A. T. S., PERALES, J., BEGHINI, D. G., FERNANDES, K. V. S., XAVIERFILHO, J., VENANCIO, T. M., OLIVEIRA, A. E. A. Identification of *Albizia lebbek* 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, A. J., SANTOS, P. O., PINTO, M. S.T., WERMELINGER, T. T., RIBEIRO, E. S., SOUZA, S. C., DEUS, M. F., SOUZA, M. C., XAVIER-FILHO, J., FERNANDES, K. V.S., OLIVEIRA, A. E. A. Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Crop Protection*, v. 30, n. 6, p. 651–657, 2011.

STANISCUASKI F, FERREIRA-DASILVA CT, MULINARI F, PIRES-ALVES M, CARLINI CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 2005;45:753–60.

T.C. OSBORN, D.C. ALEXANDER, S.S.M. SUN, C. CARDONA, F.A. Bliss, Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein, *Science* 240 207 – 210, 1988.

TAIRA T, OHNUMA T, YAMAGAMI T, ASO Y, ISHIGURO M, ISHIHARA M, Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:970–977, 2002.

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

TETREAU, G., DITTMER, N.T., CAO, X., AGRAWAL, S., CHEN, Y.-R., MUTHUKRISHNAN, S., HAOBO, J., BLISSARD, G.W., KANOST, M.R., WANG, P. Analysis of chitin-binding proteins from *Manduca sexta* provides new insights into evolution of peritrophin A-type chitin binding domains in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 62, 127–141, 2015.

TOSH, S., AND YADA, S. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Res. Int.* 43(2): 450–460. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.005, 2010.

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

UCHÔA, A. F. DE MIRANDA, M. R. A., DE SOUZA, A. J., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V. S. LEMOS, F. J. A. OLIVEIRA, A. E. A. XAVIER-FILHO, J. Toxicity of hydrolyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 17, p. 8056–8061, 2009

UPADHYAY, S., AND P. SINGH. Receptors of garlic (*Allium sativum*) lectins and their role in insecticidal action. *The Protein Journal* 31(6):439-446, 2012.

VATANPARAST, M. Phylogeography of a pantropical plant with sea-drifted seeds: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. (Fabaceae). United Kingdom: Graduate School of Science, Chiba University, PhD thesis, 89p, 2010.

VISWANATH, KK, VARAKUMAR, P., PAMURU, RR et al. Lipoxigenases vegetais e seu papel na fisiologia vegetal. *J. Plant Biol.* 63 , 83–95, 2020.

W.J. PEUMANS, E.J.M. Van Damme, Lectins as plant defence proteins, *Plant Physiol.* 109. 347 – 352, 1995.

YUNES, A. N. A. DE ANDRADE, M. T., SALES, M. P., MORAIS, R. A., FERNANDES, K. V. S., GOMES, V. M., XAVIER-FILHO, J. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, n. 1, p. 111–116, 1 jan. 1998.

ZHONG XW, WANG XH, TAN X, XIA QY, XIANG ZH . Identification and molecular characterization of a chitin deacetylase from *Bombyx mori* peritrophic membrane. *Int. J. Mol. Sci.* 15:1946–61, 2014.

ZHU K,Y, MERZENDORFER H, ZHANG W, ZHANG J AND MUTHUKRISHNAN S. 2016. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 61:177–96, 2016.

ZHU Q, ARAKANE Y, BEEMAN RW, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. PNAS 105:6650–55, 2008

ZIMMERMANN, A., GRABNER, F., TRUSS, F. GLUCOSE consumption test in the urine for the demonstration of urinary tract infections. Med. Welt.26, 61-65, 1975.