

ABSORÇÃO E COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE VICILINAS DE *Vigna unguiculata* POR *Callosobruchus maculatus* E *Zabrotes subfasciatus*
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUQUINAE)

SHEILA MÁRCIA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO-2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ABSORÇÃO E COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE VICILINAS DE *Vigna unguiculata* POR *Callosobruchus maculatus* E *Zabrotes subfasciatus*
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUQUINAE)

SHEILA MÁRCIA DE SOUZA

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO-2009

ABSORÇÃO E COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE VICILINAS DE *Vigna unguiculata* POR *Callosobruchus maculatus* E *Zabrotes subfasciatus*
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUQUINAE)

SHEILA MÁRCIA DE SOUZA

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

Aprovada em ____ de _____ de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof. José Roberto da Silva (Doutor, Bioquímica de artrópodes vetores) – IQ/UFRJ

Prof. Milton Erthal Junior (Doutor, Produção vegetal) – ISTCA/FAETEC

Prof. Richard Ian Samuels (Doutor, Bioquímica e Fisiologia de Insetos e Microrganismos) – UENF

Prof^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira (Doutora, Bases bioquímicas das defesas de plantas) – UENF (Co - orientadora)

Prof. Carlos Peres Silva (Doutor, Bioquímica de Insetos) – UENF/UFSC
(Orientador)

*“Tudo é possível àqueles
que crêem”.*

JESUS

Dedico este trabalho àquele que SEMPRE foi o meu caminho, a minha verdade e a minha vida. Ao meu *Mestre e Senhor* JESUS CRISTO de Nazaré, dedico este trabalho final, já que foi por sua vontade que hoje sou mais uma vez VENCEDORA.

Aos meus pais, *Luiz Carlos e Cláudia* e aos meus irmãos *Fábio* e *Nathália* por sempre terem acreditado em meu potencial, me apoiarem e me aconselharem a NUNCA desistir dos meus ideais. “Amo vocês”.

Ao meu marido *Marcus*, com todo amor e carinho, pelos dias e noites de paciência quando precisei estudar e me dedicar para concretizar mais este sonho. Obrigada por tudo “meu Amor”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Carlos Peres Silva por ter acreditado em mim e ter me dado esta oportunidade única de estar aprendendo e aumentando ainda mais os meus conhecimentos na área científica.

À Prof^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira por ter aceitado ser responsável pelo meu projeto de pesquisa durante a ausência aqui na UENF do Prof^o. Carlos Peres Silva.

À Prof^a Kátia V.S. Fernandes pelos auxílios sempre que precisei.

Aos Professores José Roberto da Silva, Milton Erthal Junior e Richard Ian Samuels por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao Dr. André de Oliveira Carvalho por aceitar ser o revisor desta tese e o suplente interno da banca examinadora.

A Profa. Luciana Belarmindo da Silva por aceitar ser suplente externo da banca examinadora.

Às minhas amigas do laboratório com quem compartilhei de momentos maravilhosos: Amanda, Bárbara, Elane, Jamile, Lucilene, Mariana, Nathália e Simone. Vou sentir saudades das farras e momentos de descontração!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Insetos da Ordem Coleóptera	1
1.1.1. O bruquídeo <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)	1
1.1.2. O bruquídeo <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)	3
1.1.3. A hemolinfa e o corpo gorduroso dos insetos	6
1.1.4. Processo de absorção de proteínas que cruzam o epitélio intestinal	7
1.2. As sementes de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) e o feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) Fabaceae)	12
1.3. Sementes de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) resistentes a <i>Callosobruchus maculatus</i>	15
1.4. As vicilinas (globulinas 7S)	17
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Obtenção e manutenção do material biológico	21
3.1.1. Sementes	21
3.1.2. Insetos	21
3.2. Metodologia	21
3.2.1. Purificação de vicilinas de sementes de <i>V. unguiculata</i>	21

3.2.2. Produção de anticorpos contra vicilinas de <i>V. unguiculata</i>	22
3.2.2.1. Obtenção do soro pré-imune	22
3.2.2.2. Imunização	22
3.2.3. Crescimento e dissecação de larvas	23
3.2.4. Cultivo e dissecação de insetos adultos	23
3.2.5. Extração de proteínas da hemolinfa e do corpo gorduroso	24
3.2.6. Dosagem de proteínas	24
3.2.7. Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)	24
3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	25
3.2.9. Coloração dos géis com nitrato de prata	26
3.2.10. “Western blotting”	26
3.2.11. Hidratação e Infestação de sementes de <i>V. unguiculata</i> por <i>C. maculatus</i>	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Determinação da presença de vicilinas de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) e feijão-comum (<i>P. vulgaris</i>) na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	28
4.2. Concentração das vicilinas absorvidas durante o desenvolvimento das larvas de <i>C. maculatus</i>	33
4.3. Consumo das vicilinas absorvidas em <i>C. maculatus</i> de ambos os sexos	38
4.4. Efeito da hidratação de sementes naturais, obtidas pelo aumento do número de larvas por semente, sobre as concentrações de vicilinas e proteínas totais na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de <i>C. maculatus</i>	43
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	52
7. BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento dos insetos da Ordem Coleoptera.	2
Figura 2 – Caruncho do feijão-de-corda, <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) sobre sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .	4
Figura 3 – Caruncho do feijão-comum e do feijão-de-corda, <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).	5
Figura 4 – Transcitose de macroléculas cruzando o lúmen intestinal em direção ao sangue.	8
Figura 5 – Sementes de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) (Variedade Fradinho).	14
Figura 6 – Sementes de feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> (L) Fabaceae) (Variedade feijão-preto).	16
Figura 7 – Estrutura tridimensional identificada por cristalografia de raios-X de uma molécula homotrimérica homologa a vicilina pertencente à superfamília das cupinas.	19
Figura 8 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por µg de proteína na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de <i>C. maculatus</i> (Cm) alimentadas em sementes de <i>V. unguiculata</i> (Vu) e das larvas de <i>Z. subfasciatus</i> (Zs) alimentadas em sementes de <i>V. unguiculata</i> e <i>P. vulgaris</i> (Pv).	30
Figura 9 – Quantidade de vicilinas expressas em µg de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de <i>C. maculatus</i> alimentadas em sementes de <i>V. unguiculata</i> e das larvas de <i>Z. subfasciatus</i> alimentadas em sementes de <i>V. unguiculata</i> e <i>P. vulgaris</i> .	31
Figura 10 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa e do corpo gorduroso das larvas de 16 dias de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i> . SDS-PAGE 12% corado por prata (A) e “Western blotting” (B) .	32
Figura 11 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por µg de proteína na hemolinfa (A) e no corpo gorduroso (B) das larvas de <i>C. maculatus</i> de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias alimentadas em sementes de <i>V.</i>	

- unguiculata*. **34**
- Figura 12 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias alimentadas em sementes de *V. unguiculata*. **35**
- Figura 13 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20 e 24 dias. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. **36**
- Figura 14 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20 e 24 dias. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. **37**
- Figura 15 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por µg de proteína no corpo gorduroso de insetos machos **(A)** e de insetos fêmeas **(B)** de *C. maculatus* com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. **39**
- Figura 16 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por inseto no corpo gorduroso de *C. maculatus* adultos de ambos os sexos com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. **40**
- Figura 17 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso de adultos de *C. maculatus* machos com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. **41**
- Figura 18 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso de *C. maculatus* adultos fêmeas com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. **42**
- Figura 19 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por µg de proteína na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com quantidades diferentes destes insetos. **44**
- Figura 20 – Quantidade de vicilinas expressas em µg de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com quantidades diferentes destes insetos. **45**
- Figura 21 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa

e do corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com 2, 4 e 6 larvas por semente. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**.

46

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

APS	Persulfato de Amônio
AS	Allatostanina
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CG	Corpo Gorduroso
DAB	Diaminobenzidina
DEAE	Dietilaminoetil
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
EPACE-10	Genótipo de <i>Vigna unguiculata</i> susceptível ao gorgulho
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FP	Proteína de Fusão
GNA	Aglutinina de <i>Galantus nivalis</i>
HM	Hemolinfa
HRP	Peroxidase de Rabanete
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical
IgG	Imunoglobulina G
LQFPP	Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos
OPD	Orto fenil diamina
PBS	Tampão Fosfato Salina
PHA	Fitoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS

TEMED	N' N' N' N' Tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris-Hidroksimetilaminoetano
V	Volts

RESUMO

A interação entre proteínas de sementes com propriedades de ligação a carboidratos, com o epitélio intestinal e membranas peritróficas, e seus subseqüentes efeitos tóxicos, têm sido registrados em diversos insetos. Há evidências de que a possibilidade de absorção, internalização e ação de moléculas de proteínas em órgãos internos, são comuns nestes animais. Neste trabalho estudamos a absorção e a compartimentalização de vicilinas de *V. unguiculata* por *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. A hemolinfa e o corpo gorduroso de larvas de *C. maculatus* mantidas em sementes de *V. unguiculata* por 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias e de larvas de *Z. subfasciatus* mantidas em sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* por 16 dias foram dissecadas. Nosso resultado mostrou a detecção de vicilinas nas duas espécies de insetos e uma maior concentração de vicilinas nas larvas de *C. maculatus* em comparação às larvas de *Z. subfasciatus*. Nos diferentes dias de desenvolvimento de larvas de *C. maculatus*, nós constatamos a presença de moléculas de vicilinas em todos os dias. Sugerimos um possível consumo destas moléculas quando no estágio de pupa, pois pelo método de ELISA notamos um decréscimo das concentrações destas proteínas após o 16º dia. O corpo gorduroso de insetos adultos de ambos os sexos de *C. maculatus* com 1 a 10 dias após a emergência das sementes de *V. unguiculata* foram dissecados e nós observamos que as vicilinas além de terem sido detectadas em todos os dias, a concentração destas foi maior em insetos fêmeas. Observamos uma diminuição da concentração de vicilinas com o passar dos dias, levando-nos a sugerir um possível consumo destas moléculas pelos insetos adultos. Este achado está de acordo com o fato de que estes insetos quando na fase adulta não se alimentam. Nós observamos através de nossos resultados utilizando sementes úmidas, que as larvas de *C. maculatus* apresentam uma concentração de vicilinas maior no corpo gorduroso e menor na hemolinfa quando em um ambiente mais seco e o contrário deste resultado em um ambiente mais úmido. Sugerimos então que estes insetos possam estar absorvendo e acumulando em seu corpo gorduroso as vicilinas para tentar proteger suas células contra processos de dessecação celular, já que vivem em um ambiente seco no interior da semente. Com todos estes achados nós concluímos que a vicilina pode estar sendo utilizada como reserva energética pelas larvas e pelos insetos adultos e como proteção contra processos de dessecação celular.

ABSTRACT

The interaction among proteins of seeds with properties of linkage to carbohydrates, with the intestinal epithelium, and peritrophic membranes as well as their subsequent toxic effects, have been registered within several insects. There are evidences that the possibility of absorption, internalization and action of protein molecules in internal organs are common concerning these animals. In this present work, we have studied the absorption and compartmentalization of vicilins of *V. unguiculata* through *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*. The haemolymph and fat body of *C. maculatus* larvae kept in seeds of *V. unguiculata* for 14, 16, 18, 20, 22 and 24 days and *Z. subfasciatus* larvae kept in seeds of *V. unguiculata* and *P. vulgaris* for 16 days were dissected. Our result showed the detection of vicilins in the two species of insects and a larger concentration of vicilins in *C. maculatus* larvae in comparison to *Z. subfasciatus* larvae. On the different days of development of *C. maculatus* larvae, we observed the presence of molecules of vicilins on every each days. We recommended a possible consumption of these molecules during pupa stage, because due to the method of ELISA we noticed a decrease in the concentrations of these proteins after the 16th day. The fat body of adult insects from both sexes of *C. maculatus* with 1 to 10 days, after the emergence of *V. unguiculata* seeds, were dissected and we observed that the vicilins had been detected on every each days and the concentration of them was bigger in female insects. We noticed a decrease in the concentration of vicilins as days went by, leading us to suggest a possible consumption of these molecules by adult insects. That finding has been in accordance with the fact that these insects when adult ones do not feed. We observed through our results by using humid seeds that *C. maculatus* larvae present a concentration of vicilins larger in fat body and smaller in the haemolymph whenever they are in a dryer environment and the opposite of this result in a more humid environment. It is suggested, then, that these insects can absorb and accumulate in their fat body the vicilins in order to try to protect their cells against processes of cellular dissection, since they live in a dry environment in the inner part of the seed. By all these findings, we conclude that the vicilin can be used as energetic reserve by larvae and by adult insects, and as a protection against processes of cellular dissection.

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Insetos da Ordem Coleoptera

Com o número estimado de 350.000 a 375.000 espécies descritas, Coleoptera é a maior ordem dos insetos. Corpo altamente esclerotizado; asas anteriores esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas (élitros) que cobrem as asas posteriores e o corpo; asas posteriores membranosas, frequentemente reduzidas ou ausentes; peças bucais mastigadoras; antenas geralmente com oito a 11 "artículos"; protórax grande e móvel; mesotórax reduzido; abdômen tipicamente com cinco (ou até oito) segmentos; sem ovipositor; genitália masculina retrátil (Brusca & Brusca, 2007).

Os coleópteros da família Chrysomelidae são as maiores pragas de legumes cultivados pelo fato de se desenvolverem no interior das sementes (Figura 1) e consumirem as mesmas que são destinadas ao consumo humano (Southgate, 1979). Os crisomelídeos estão associados com as sementes de plantas leguminosas através de processos co-evolutivos. Estes processos têm permitido aos carunchos se desenvolverem no interior destas sementes repletas de compostos tóxicos, em contraste à maioria dos outros agressores potenciais. A associação entre os bruquídeos e as sementes de leguminosas é altamente específica (Sales *et al.*, 2000).

1.1.1. O bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

Nas zonas tropicais do Oeste da África, o *C. maculatus* se desenvolve em sementes de espécies selvagens e cultivadas do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (Leguminosa) (Figura 2). Este inseto é a principal praga das sementes de *Vigna* (Singh *et al.*, 2000), no entanto, não ataca sementes do feijão-comum, *Phaseolus vulgaris*, devido a presença de inibidores de α -amilases (Xavier-Filho, 1993).

São insetos de aproximadamente 3 mm de comprimento, cabeça preta com antenas contendo 11 segmentos ligeiramente serrilhados, tórax preto com pubescências douradas, apresentando nos élitros manchas amarronzadas que em repouso formam um "X". Para o desenvolvimento do inseto, a condição ideal é referida como temperatura de 29 °C e 65 % de umidade relativa, sendo o período médio de desenvolvimento de 23 dias (Quintela *et al.*, 1991).

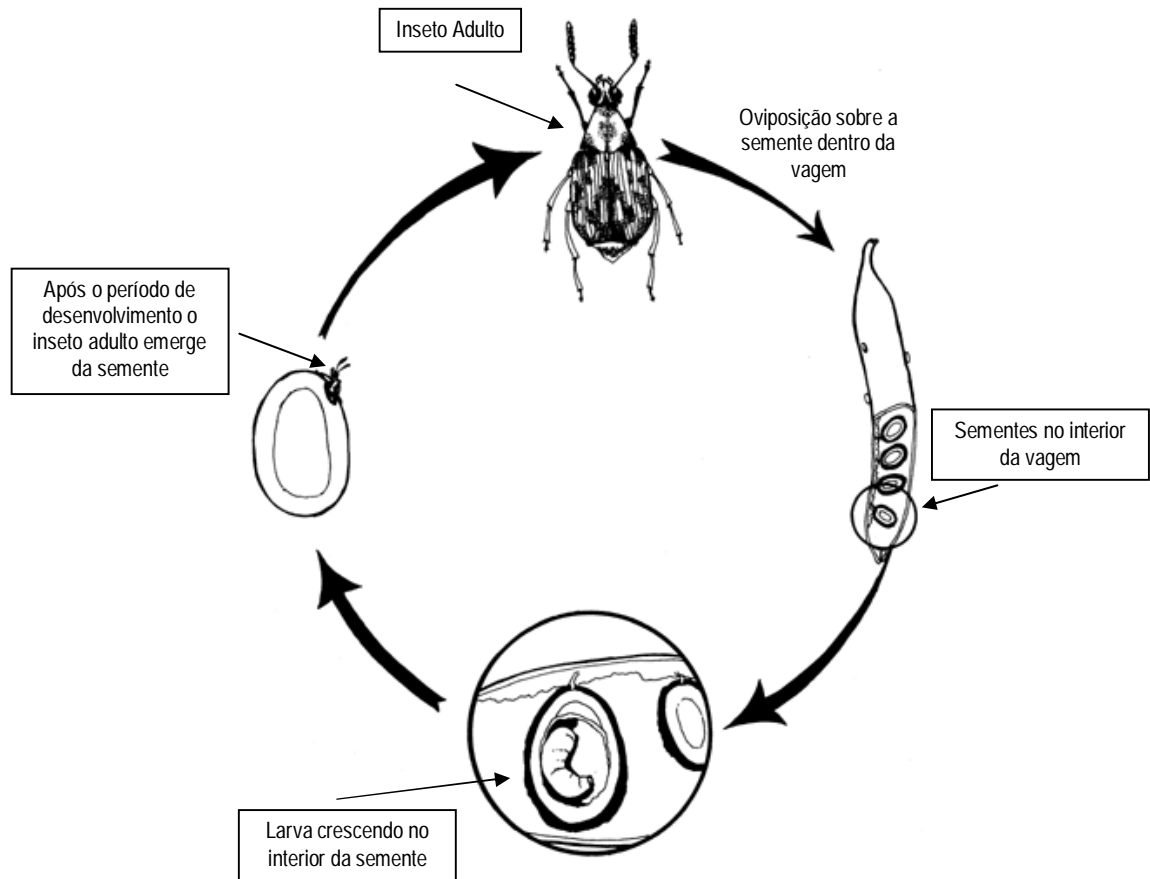


Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento dos insetos da Ordem Coleoptera.

Fonte: www.fao.org/DOCREP/006/Q2585E/Q2585E08.gif

A forma adulta tem duração média de sete a nove dias e apresenta-se na proporção de uma fêmea para um macho, sendo, portanto, a razão sexual apresentada de 1:1 (Gallo *et al.*, 2002). Nesta fase adulta é comum o dimorfismo sexual, onde as fêmeas são maiores que os machos as quais põem em média 80 ovos (Quintela *et al.*, 1991) nas superfícies das sementes. O ovo é branco de forma subelíptica, com comprimento de aproximadamente 0,5 mm e largura de 0,3 mm. Ao eclodirem, liberam larvas de forma curva e cor branca, que penetram nas sementes consumindo apenas o seu conteúdo interno (Southgate, 1979; Credland & Dendy, 1992). O crescimento do corpo do inseto é mais ou menos cíclico, com períodos de descanso alternados com períodos de atividade. Portanto, o inseto cresce em sucessivas mudas, e o intervalo entre uma muda e outra é chamado de instar (EMBRAPA, 2004). No interior das sementes as larvas, transformam-se em pupas, que possuem cor marrom, e nos últimos estágios apresentam vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981). Completado o desenvolvimento, os insetos emergem deixando galerias nas sementes (Williams, 1980). Quando no interior de sementes que se encontram em estocagem, os adultos ao emergirem destas podem produzir muitas gerações, sem se alimentarem (Johnson, 1989).

A infestação deste bruquídeo pode começar já no campo e continua no armazém, onde são responsáveis por perdas nos grãos estimadas em 20-60% (Abrol, 1999; Tarver, Gallo *et al.*, 2002; *et al.*, 2007). O ataque destes insetos pode causar danos diretos como perda de peso, redução do poder germinativo e do valor nutricional e danos indiretos como desvalorização comercial dos grãos, devido ao hábito alimentar dessas pragas, onde na fase larval abre galerias, além da presença de insetos mortos, ovos e excrementos (Ferreira, 1960; Gallo *et al.*, 2002). Estes insetos podem danificar totalmente os grãos armazenados após cinco meses (Singh, 1978; Messina & Renwick, 1985; Mbata, 1993).

1.1.2. O bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

O bruquídeo *Z. subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera, Bruchidae) é originário das regiões tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul e é uma das principais pragas do feijão-comum (*P. vulgaris*) durante o armazenamento (Dendy & Credland, 1991; Haines, 1991).



Figura 2 – Caruncho do feijão-de-corda, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) sobre sementes de *Vigna unguiculata*.

Foto por J. W. Stewart.

Fonte: <http://insects.tamu.edu/images/insects/common/images/b-txt/bimg179.html>



Figura 3 – Caruncho do feijão-comum e do feijão-de-corda, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Em **A**, vagens contendo as sementes de feijão em seu interior; Em **B**, insetos machos sobre a semente de *Phaseolus vulgaris*; Em **C**, insetos fêmeas sobre a semente de *Vigna unguiculata*.

Fonte: http://www2.unine.ch/leae/page6121_en_GB.html

A espécie tem sido introduzida em muitos países da Europa por meio de feijões infestados, onde tem ocasionalmente ampliado seu registro de hospedeiros, tornando-se também uma praga séria de outros legumes (Meik & Dobie, 1986) como o feijão-de-corda (*V. unguiculata*) (Silva *et al.*, 2001).

Os insetos adultos de *Z. subfasciatus* apresentam quatro manchas de cor creme nos élitros, contrastando com a cor escura brilhante do corpo e assim como o *C. maculatus* estes apresentam dimorfismo sexual. Os machos são inteiramente de cor marrom (Howe & Currie, 1964). A fêmea oviposita diretamente nas sementes após a deiscência das vagens ou pode infestar as sementes ainda dentro das mesmas (Figura 3), utilizando-se de perfurações nas vagens realizadas por outros insetos (Credland & Dendy, 1992). O seu ciclo biológico é semelhante ao do *C. maculatus*, porém ao contrário da maioria dos bruquídeos, as fêmeas necessitam do contato com a semente para estimular a ovogênese (Pimbert & Pierre, 1983; Pimbert, 1985).

O ataque do *Z. subfasciatus* pode causar perdas de peso, redução do poder germinativo, do valor nutritivo e desvalorização comercial dos grãos, devido ao aspecto danificado destes, além da presença de insetos mortos, ovos e excrementos (Ferreira, 1960; Hohmann & Carvalho, 1989; Gallo *et al.*, 2002).

1.1.3. A hemolinfa e o corpo gorduroso dos insetos

A hemolinfa ou “*sangue*” dos insetos é um fluido claro, geralmente tingido com pigmento verde ou amarelo ou algumas vezes incolor, que constitui de 5 a 40% do peso do corpo do inseto (em média 25%). Além de atuar nas trocas químicas, necessárias para o funcionamento dos órgãos e tecidos, a hemolinfa funciona como fluido hidráulico para manter a pressão do animal, assim como tem papel na ecdise e na reserva de água (Wigglesworth, 1972). Cerca de 90% do volume da hemolinfa é água, mas essa percentagem varia durante o ciclo de vida do inseto em função das mudas. Dentre os constituintes inorgânicos, cloreto é o ânion mais abundante enquanto o cátion mais comum é o sódio, mas ambos variam em função do grupo taxionômico e a dieta do inseto. Entre os componentes orgânicos, a hemolinfa dos insetos é caracterizada por uma alta concentração de aminoácidos. Numerosas proteínas também estão presentes na hemolinfa, podendo chegar a mais de 20 tipos diferentes. Exceto pela presença de hemoglobina nas larvas de alguns Chironomidae, não existem pigmentos respiratórios na hemolinfa dos insetos o que resulta em uma desprezível capacidade de transporte de oxigênio. Outra função

importante da hemolinfa é a de transportar, além de hormônios, outras moléculas através do corpo (Chapman, 1982).

O corpo gorduroso é geralmente descrito como um tecido uniforme de origem mesodérmica (Snodgrass, 1956; Chapman, 1998; Jensen & Børgesen, 2000) bastante evidente na cavidade do corpo dos insetos. Distribui-se dentro desta cavidade e apresenta uma ampla variedade de arranjos (cordas, grupos, ou lóbulos) (Smith, 1968; Chapman, 1998), revestidos de uma delicada membrana de tecido conjuntivo, a fim de aumentar a superfície de contato com o sangue (Wigglesworth, 1974). O termo corpo gorduroso não faz justiça à versatilidade deste tecido, desde que pode seqüestrar e armazenar vários compostos da hemolinfa, por exemplo, proteínas, carboidratos, além dos lipídeos. Pode também participar do metabolismo, tendo um papel similar ao fígado em vertebrados, além de atuar como células endócrinas (Locke & Collins, 1968; Price, 1969; Chapman, 1998). É capaz de responder a necessidades fisiológicas e bioquímicas de várias maneiras, incluindo as altas taxas de biossíntese de proteínas, formação e liberação de trealose, liberação de lipídeos, detoxificação de nitrogênio de excretas, e biossíntese de hormônios (Stanley & Bedick, 1997).

1.1.4. Processo de absorção de proteínas que cruzam o epitélio intestinal

O epitélio intestinal em animais atua como uma barreira que permite uma troca seletiva de moléculas entre o lúmen do intestino e os compartimentos internos. A transferência de proteínas intactas cruzando o sistema digestivo para o interior do sistema circulatório de mamíferos foi documentada já em 1936 (Verzár & McDougall, 1936). As macromoléculas podem ser transportadas ao outro lado do intestino por transcitose (Figura 4), um processo complexo em que a macromolécula é internalizada em um pólo da membrana plasmática da célula e transportada por vesículas dentro do citoplasma para a membrana plasmática do lado oposto desta mesma célula. Uma vez que internalizada, as vesículas contendo a proteína são transportadas seguindo uma complexa seqüência de eventos intracelulares que permitem a fusão desta com compartimentos celulares específicos. A transcitose é, portanto um mecanismo de transporte ativo, modulado por um número de passos endocelulares citoesqueleto-específico (Apodaca, 2001), que é usado por organismos multicelulares para mover seletivamente um determinado material que cruzará dois ambientes separados.

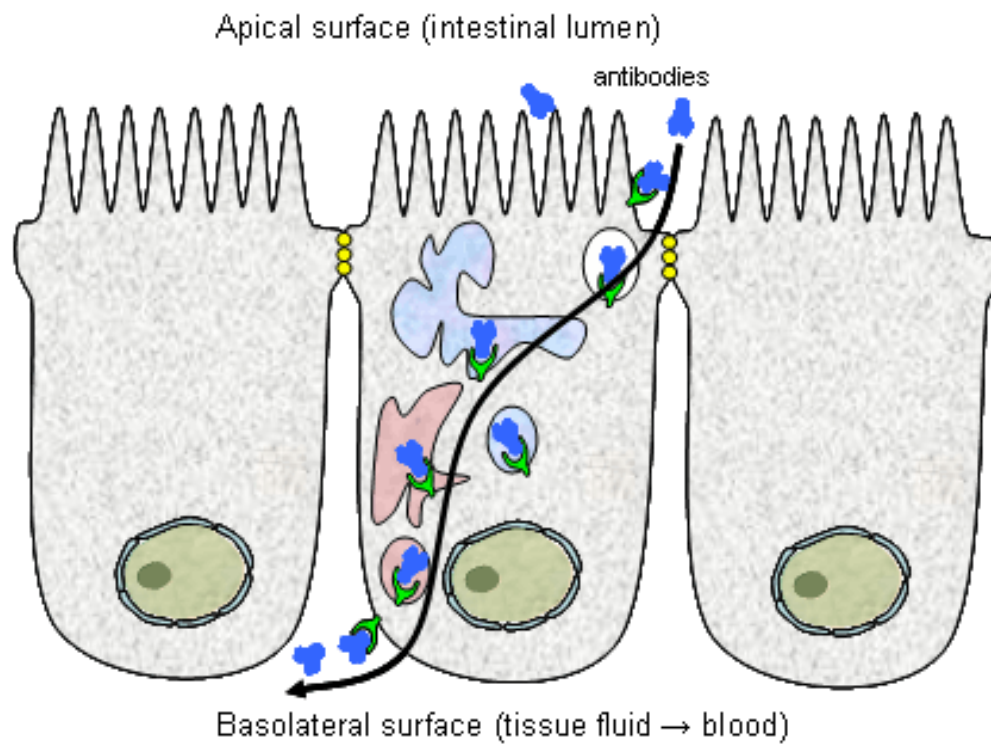


Figura 4 – Transcitose de macroléculas cruzando o lúmen intestinal em direção ao sangue.

Fonte: http://www.steve.gb.com/science/protein_targeting.html

O transporte de proteínas que cruzam o epitélio intestinal tem sido completamente investigado em mamíferos (Okamoto, 1998; Apodaca, 2001; Tuma & Hubbard, 2003), especialmente as notáveis implicações a respeito da entrega de drogas (Smith *et al.*, 1992; Swaan, 1998; Kompella & Lee, 2001). Mamíferos neonatos, imediatamente após o nascimento, necessitam adquirir imunidade passiva humoral por transporte de IgG do leite materno cruzando o intestino em direção ao sangue (Sugimura *et al.*, 2001).

Em comparação aos mamíferos, muito pouco é conhecido sobre a absorção de proteínas intactas que cruzam o epitélio do intestino médio dos insetos. Nestes animais, o transporte transepitelial de macromoléculas não tem sido investigado a fundo, apesar do fato de que estudos enfocando neste tópico podem ter importantes implicações no controle biológico dos insetos. Wigglesworth (1943) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar a passagem de proteínas intactas que cruzam o sistema digestivo dos insetos. Este autor descobriu que uma pequena quantidade de hemoglobina ingerida foi absorvida e cruzou o intestino de *Rhodnius prolixus* em direção a hemolinfa (Wigglesworth, 1943).

Recentes estudos têm fornecido evidência de que a possibilidade de absorção, internalização e ação de moléculas de proteínas em órgãos internos, além de ser um processo importante, é comum nestes animais. Tem sido mostrado por Paes *et al.* (2000), que proteínas tóxicas a bruquídeos, como por exemplo, as arcelinas, não somente se ligam à parede do intestino, mas são também encontradas nos órgãos internos das larvas de *Z. subfasciatus*. Alguns dos acessos selvagens do feijão-comum contêm uma família de proteínas chamadas arcelinas, que são tóxicas para as larvas de certas espécies de bruquídeos. Visto que a arcelina do tipo 1, mostrou possuir efeitos inibitórios sobre o crescimento das larvas de *Z. subfasciatus*, mas não sobre as larvas de *Acanthocelides obtectus*. Estes autores começaram a examinar os efeitos desta proteína, contida na dieta destes animais, sobre a estrutura das células que formam o trato intestinal das larvas destas duas espécies de bruquídeos, e usaram anticorpos contra a arcelina para examinar a distribuição desta proteína dentro das células e tecidos destes animais. A partir destes experimentos eles observaram que a arcelina do tipo 1, presente na dieta destes insetos, causou uma alteração na estrutura do intestino médio e a penetração da arcelina para o interior da hemolinfa em *Z. subfasciatus* mas não acontecendo o mesmo fenômeno em *A. obtectus*

Em larvas do bicho-da-seda *Bombyx mori* uma enzima de sua dieta é especificamente absorvida durante o último instar larval, e é encontrada circulando na hemolinfa (Sugimura *et al.*, 2001). As larvas de *B. mori* absorvem da folha de amora, sua planta hospedeira, a enzima urease que é transportada intacta do lúmen do intestino médio para dentro da hemolinfa. Os resultados obtidos por estes autores, mostraram que o transporte da urease proveniente da folha de amora cruzando o intestino médio para dentro da hemolinfa é um processo seletivo e estágio-larval específico.

Lectinas como, por exemplo, a aglutinina de *Galantus nivalis* (GNA), e a fitohemaglutinina de *P. vulgaris* (PHA) têm sido mostradas como capazes de se ligar ao tecido do intestino médio e foram detectadas em órgãos internos das larvas da mariposa do tomate *Lacanobia oleracea* (Fitches *et al.*, 2001; 2002). A PHA possui toxicidade para animais de grande porte e existem nas isoformas PHA-E e PHA-L, que aglutinam eritrócitos e linfócitos, respectivamente. Fitches *et al.* (2001) mostraram que ambas PHA-E e PHA-L foram detectadas por Western blotting na hemolinfa, de amostras de insetos alimentados em suas dietas com material de plantas contendo as respectivas lectinas. Logo em seguida, estes mesmos autores em 2002 mostraram que as lectinas ligantes de manose de galanto (GNA), quando ingeridas pelos insetos, ligam-se ao epitélio do intestino médio e passam para a hemolinfa. O potencial para GNA atuar como uma proteína carreadora para entregar o neuropeptídeo de um inseto, allatostatina (AS) de *Manduca sexta* (Manse-AS), para a hemolinfa de larvas de lepidópteros tem sido examinado pela expressão de uma proteína de fusão GNA/Manse-AS (FP) em *Escherichia coli*, e a alimentação desta FP purificada, pelas larvas da mariposa do tomate *L. oleracea*. Níveis elevados de material reagindo com anticorpos anti-Manse-AS foram detectados na hemolinfa de insetos alimentados com dietas contendo FP, sugerindo o transporte do peptídeo.

A translocação de albumina do intestino médio da lagarta *B. mori*, indicam que esta proteína modelo cruza a barreira intestinal das larvas, em uma forma não processada, através do mecanismo da transcitose (Casartelli *et al.*, 2005). As propriedades funcionais do transporte transepitelial fluxo lúmen-hemolinfa desta proteína foram descritas por estes autores, visto que a absorção prevalece sobre a secreção.

A albumina sérica bovina (BSA) e o anticorpo policlonal anti-BSA foram usados como polipeptídeos modelos para examinar o movimento de proteínas externas cruzando o sistema digestivo dos insetos e a acumulação destas proteínas na hemolinfa da broca do broto de tabaco de quarto instar, *Heliothis virescens* (Jeffers *et al.*, 2005). Estes autores demonstraram que a acumulação da proteína BSA e do anticorpo anti-BSA em sua forma nativa na hemolinfa de insetos é o resultado da razão de movimento destas moléculas cruzando o intestino médio e a razão de circulação das mesmas na hemolinfa.

Uma proteína de fusão recombinante ButalT/GNA intacta foi detectada na hemolinfa das larvas de insetos lepidópteros que foram alimentadas oralmente com esta proteína, demonstrando o transporte do polipeptídeo tóxico (ButalT) ligado a proteína GNA cruzando o intestino médio destes insetos (Trung *et al.*, 2006). A proteína recombinante contendo a fusão do GNA expresso com um peptídeo ou proteína foi produzida e purificada usando a levedura *Pichia pastoris* como hospedeiro para a expressão desta e normalmente só é tóxica quando injetada no interior da hemolinfa dos insetos. Estes autores observaram que esta proteína foi tóxica para as larvas lepidópteras também quando alimentada oralmente mostrando que a proteína GNA foi útil como um carreador transportando o peptídeo tóxico do intestino médio para o interior da hemolinfa dos insetos.

Casartelli *et al.* (2007) com o propósito de obter um conhecimento mais profundo deste processo de transporte de proteínas cruzando o epitélio intestinal, investigaram a absorção da peroxidase de rabanete (HRP), uma glicoproteína de 40 kDa, pelo intestino médio de larvas do bicho-da-seda *B. mori in vitro*. Análises de microscopia eletrônica de transmissão das células colunares do intestino médio que foram expostas a HRP mostraram a presença desta proteína tanto em estruturas vesiculares no interior do citoplasma como no espaço entre duas células absortivas adjacentes, indicando a ocorrência de uma rota de permeação paracelular e transcelular.

Uchôa *et al.* (2006), em resultados recentemente obtidos em nosso laboratório confirmaram o transporte de vicilinas do lúmen do intestino médio para dentro da hemolinfa de *C. maculatus* e mostraram que estas proteínas também foram detectadas nos túbulos de Malpighi e no corpo gorduroso 48 h após a ingestão. O objetivo deste trabalho foi estudar o destino das globulinas de reserva 7S (Vicilinas) de *V. unguiculata* em vários órgãos das larvas do bruquídeo *C. maculatus*.

Resultados obtidos demonstraram a ligação de vicilinas a proteínas presentes nas preparações de microvilosidades dos intestinos destas larvas.

1.2. As sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* (L) Fabaceae).

A semente é um órgão de propagação e ocupa uma posição crítica na evolução das plantas superiores, sendo o órgão responsável pelo armazenamento da informação genética, necessária à perpetuação da espécie, bem como das reservas necessárias para o sustento da plântula nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando a planta ainda não é capaz de usar energia luminosa para executar a síntese de compostos orgânicos necessários à formação de novos tecidos e órgãos (Bewley & Black, 1994).

Os humanos usam as sementes como fonte de alimento e têm aprendido, através de práticas agrícolas, a aumentar os níveis e as qualidades de seus componentes, assim como lidar com a multiplicidade de compostos tóxicos e antinutricionais presentes nelas. A maioria dos compostos não essenciais presentes na plântula contribuem possivelmente para sua proteção, contra patógenos e predadores (Sales *et al.*, 2000).

Entre nossas fontes alimentares, os feijões, sementes comestíveis de plantas da família das leguminosas, constituem um dos alimentos básicos mais importantes como fonte de proteína para o povo brasileiro e também para grande parte da América Latina e México. Além de apresentar elevado conteúdo energético quando comparado a outros gêneros alimentícios (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1996). Segundo Oliveira *et al.* (1979), o Brasil é o maior consumidor mundial do produto. Entre os feijões, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) são cultivados em muitas regiões e fazem parte da dieta de centenas de milhões de pessoas (Xavier-Filho, 1993).

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Figura 5) tem vários nomes vulgares, sendo conhecido como feijão-de-corda e feijão macassar na região Nordeste, feijão de praia e feijão de estrada na região Norte e feijão miúdo na região Sul (Freire Filho *et al.*, 1983). É também chamado de feijão catador e feijão gerutuba em algumas regiões do estado da Bahia e norte de Minas Gerais e de feijão fradinho, no estado do Rio de Janeiro. É uma planta Dicotyledonea, que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinea,

gênero *Vigna*, secção Catiang e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Verdecourt, 1970; Maréchal *et al.*, 1978; Padulosi & Ng, 1997).

O feijão-de-corda é um dos mais antigos cultivos conhecido pelo homem (Sales *et al.*, 2000). É muito bem adaptado, versátil e nutritivo. É largamente utilizado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Singh & Rachie, 1985; Sahoo *et al.* 2003), e fornecem uma maior fonte de abastecimento de proteínas na dieta alimentar com elevada qualidade e economia (Langyintuo *et al.* 2003). Steele & Mehra (1980) e Ng & Maréchal (1985) citam o oeste da África, mais precisamente a Nigéria, como centro primário de diversidade da espécie. Entretanto, Padulosi & Ng (1997) afirmam que provavelmente a região de Transvaal, na República da África do Sul, é a região de especiação do feijão-de-corda. No Brasil, esta semente entrou principalmente pelos portos do Nordeste, sendo inicialmente introduzido, no século XVI, pelos portugueses e trabalhadores africanos (Guazzelli, 1988).

Estas sementes de leguminosas são ricas em proteínas (23,4%) e carboidratos (56,8%) (Kay, 1979) e são importantes fontes destes nutrientes em várias dietas. Nestas sementes de feijão-de-corda, muito da proteína da semente (51% da proteína total da semente) é encontrada na fração globulínica (Freitas *et al.*, 2004).

As sementes de feijão-de-corda apresentam baixos níveis de defesa contra herbívoros e microorganismos. Por esta razão quando ainda no campo e no armazenamento, estas sementes são fortemente prejudicadas pelo caruncho do feijão-de-corda (*C. maculatus*) e algumas vezes pelo caruncho do feijão-comum (*Z. subfasciatus*) (Sales *et al.*, 2005).

O feijão-comum, *P. vulgaris* Linnaeus, 1753 (Fabaceae) está entre os mais importantes legumes mundiais (Figura 6), fornecendo uma das fontes primárias de proteína alimentar (particularmente em países desenvolvidos) (Cardona, 2004), em especial nos países onde o consumo de proteína animal é limitado, por razões econômicas, religiosas, culturais ou outras. No Brasil é a principal leguminosa fornecedora de proteínas, fazendo parte da dieta diária das classes sócio-econômicas menos favorecidas (Antunes *et al.*, 1995). A faseolina é a maior proteína de reserva representando 40-50% da proteína total da semente (Chagas & Santoro, 1997). Aproximadamente 80% da produção do feijão-comum ocorre em pequenas propriedades rurais em cultivos de subsistência (Cardona & Kornegay, 1999).



Figura 5 – Sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Variedade Fradinho).

Fonte: http://www.grainlegumes.com/aep/crops_species/all_species_index/cowpea

O feijão, após a colheita, pode perder sua qualidade rapidamente se armazenado de forma incorreta, especialmente devido à contaminação fúngica, infestação por insetos e processos metabólicos que reduzem a germinação e o vigor, causando, entre outros defeitos, o escurecimento do tegumento do feijão (do grupo carioca) devido à oxidação de fenóis na presença de oxigênio. A presença de insetos aumenta ainda mais as perdas qualitativas e quantitativas, pois, além destes se alimentarem do endosperma e do embrião, seu metabolismo eleva a temperatura e a umidade intergranular, criando um ambiente ideal para o desenvolvimento fúngico (Lazzari 1997). Os grãos carunchados podem tornar-se, devido ao seu mau aspecto, mau cheiro e alteração do sabor, imprestáveis para o consumo humano (Oliveira *et al.* 1979).

Muitas proteínas como as lectinas, inibidores de α -amilase, arcelinas, inibidores de tripsina e outros, enquanto protegem as sementes contra os insetos e os herbívoros, em geral não as protegem contra o ataque de outras pestes que, presumivelmente, têm co-evoluído com estas espécies (Sales *et al.*, 2000). Algumas destas pestes como o caruncho *Z. subfasciatus* ataca as sementes de feijão-comum, tanto no campo como no armazenamento, causando severas perdas para os agricultores (Schoonhoven *et al.*, 1983). Outros bruquídeos como o *C. maculatus*, uma peste das sementes de feijão-de-corda, não ataca as sementes de feijão-comum (Applebaum *et al.*, 1970).

1.3. Sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) resistentes a *Callosobruchus maculatus*

As sementes de feijão-de-corda contêm diversas proteínas que podem exercer um papel na defesa contra seu principal predador, o bruquídeo *C. maculatus*. Os estudos realizados no Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), na Nigéria, no início dos anos 70, examinaram a existência de resistência natural a *C. maculatus* em três linhagens de feijão-de-corda. Dentre os acessos selvagens investigados, TVu 2027 apresentou resistência ao inseto e após intenso programa de melhoramento no IITA, a resistência ao *C. maculatus* foi incorporada em cultivares agronomicamente aceitáveis (Singh & Rachie, 1985), como por exemplo IT81D-1032, IT81D-1064 e IT81D-1045, que apresentaram diferentes níveis de resistência ao bruquídeo (Singh & Singh, 1990; 1992).



Figura 6 – Sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* (L) Fabaceae).
(Variedade feijão-preto)

Fonte: <http://minimizeus.com/2007/07/21/as-maravilhas-do-feijao-preto/>

Inicialmente, a resistência ao bruquídeo *C. maculatus* observada em variedades de feijão-de-corda oriundas da linhagem TVu 2027, foi atribuída à presença de inibidores de proteinases serínicas em altas concentrações nessas sementes (Gatehouse *et al.*, 1979). Essa hipótese foi baseada em resultados que registram a presença de inibidores de proteinases serínicas em quantidades três vezes maiores em sementes resistentes do que em sementes susceptíveis. Entretanto estudos feitos por Xavier-Filho *et al.* (1989) e Fernandes *et al.* (1993) mostraram que não há correlação entre os níveis de inibidores de proteinases serínicas (tripsina, quimotripsina e subtilisina) ou inibidores de proteinases cisteínicas (papaína) nas sementes de feijão-de-corda com a resistência ou susceptibilidade das mesmas ao bruquídeo.

Análises das frações de proteínas das variedades de sementes resistentes indicaram que os efeitos prejudiciais observados sobre o bruquídeo *C. maculatus* foram associados com as frações globulínicas (Xavier-Filho, 1991; Macedo *et al.*, 1993), que são insolúveis em água e estão tipicamente presentes em sementes de leguminosa, associadas com os mecanismos de defesa que as plantas têm desenvolvido contra a ação de pestes e patógenos (Sales *et al.*, 2000). A presença de vicilina variante expressa nestas sementes tem sido relacionada diretamente ao efeito tóxico das globulinas ao inseto (Macedo *et al.*, 1993; Macedo *et al.*, 1995).

1.4. As vicilinas (globulinas 7S)

As vicilinas (globulinas 7S) formam uma classe bem conhecida de proteínas de reserva de plantas e nas sementes de feijão-de-corda a maior parte das proteínas presentes são vicilinas (Carasco *et al.*, 1978; Khan *et al.*, 1980) que constituem 25% do peso seco destas sementes (Casey *et al.*, 1986; Müntz *et al.*, 1986; Fotso *et al.*, 1994).

As vicilinas são moléculas oligoméricas, classificadas como globulinas 7S de acordo com o seu coeficiente de sedimentação, possuem grau variado de glicosilação (Shutov *et al.*, 1995), apresentam uma composição de aminoácidos com altas concentrações de ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, fenilalanina e leucina, mas têm, no entanto, concentrações mínimas de aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (Carasco *et al.*, 1978; Macedo *et al.*, 1995). As vicilinas são solúveis em soluções salinas (Fernandes & Xavier-Filho 1998), não possuem ligação dissulfeto em suas cadeias polipeptídicas, apresentam grande

heterogeneidade (Sales *et al.*, 2000), massa molecular em torno de 150 kDa e se agregam para formar trímeros de subunidades com massas moleculares variando entre 45-70 kDa (Fernandes & Xavier-Filho 1998). As vicilinas são codificadas por um grande número de genes (Shewry *et al.*, 1995) e as porções N-terminal das seqüências mostram similaridade com as regiões C-terminal sugerindo que essas proteínas surgem de um evento de duplicação gênica (Shewry *et al.*, 1995; Shutov *et al.*, 1995). Estruturas tridimensionais de várias destas proteínas têm sido identificadas por cristalografia de raios-X (Figura 7) confirmando a simetria da molécula e a disposição das subunidades no trímero (Ng *et al.*, 1993).

Estas proteínas de reserva parecem ser multifuncionais, fornecendo aminoácidos durante a germinação da planta e participando dos mecanismos de defesa das sementes, sendo tóxica a insetos (Macedo *et al.*, 1993; Shutov *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2000).

O mecanismo de ação das vicilinas sobre os bruquídeos ainda não está completamente esclarecido, mas a observação de que vicilinas de leguminosas se ligam à quitina (Yunes *et al.* 1998; Sales *et al.*, 2001), levou a hipótese de que estas proteínas de feijão-de-corda e outras leguminosas podem se ligar fortemente a várias estruturas contendo quitina, como as que estão presentes no intestino médio de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (Firmino *et al.*, 1996; Sales *et al.*, 1996, 2001) e nas paredes celulares ou membranas plasmáticas de fungos filamentosos e leveduras (Gomes *et al.*, 1998). Já na larva da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*, as vicilinas de feijão-de-corda do genótipo IT81D-1045 (resistente ao ataque pelo caruncho do feijão-de-corda), se ligaram à membrana peritrófica reduzindo significativamente a razão de sobrevivência deste inseto (Mota *et al.*, 2003). Estas informações confirmam a idéia da participação das vicilinas no mecanismo de defesa de sementes, em adição à função de reserva protéica.

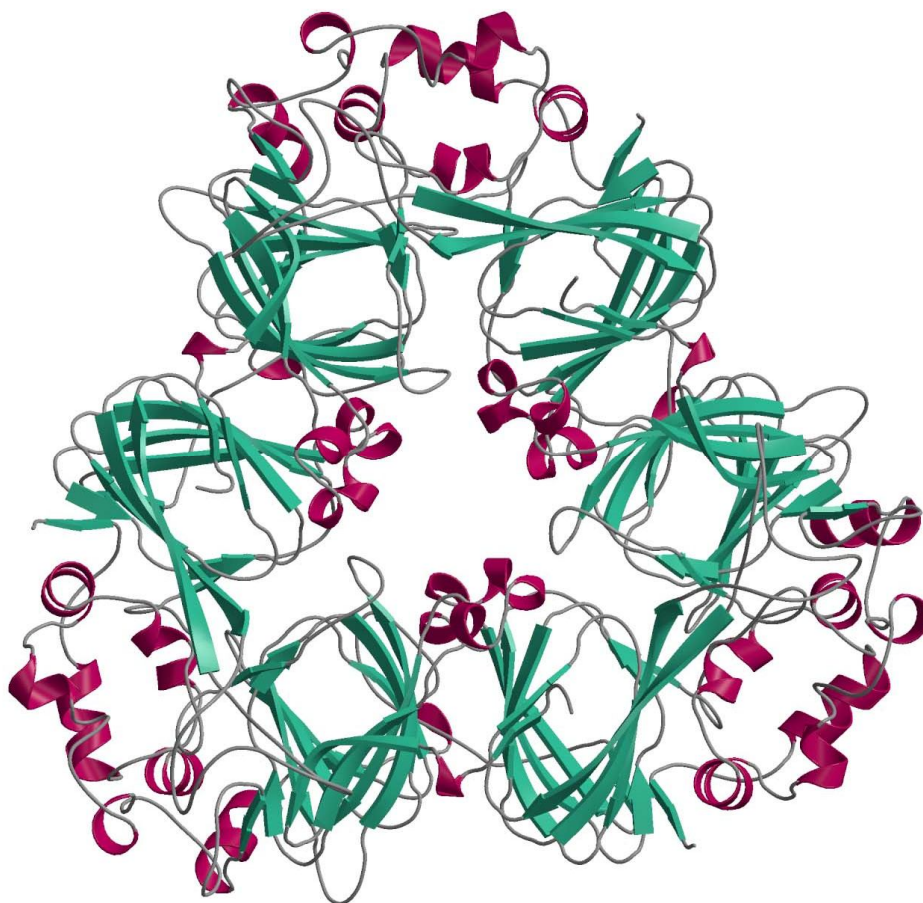


Figura 7 – Estrutura tridimensional identificada por cristalografia de raios-X de uma molécula homotrímica homologa a vicilina pertencente à superfamília das cupinas.
Fonte: http://www.scsv.ups-tlse.fr/root/equipes/proteines/theme_en.php?idth=25

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho é mostrar a absorção e a compartimentalização de vicilinas de *V. unguiculata* na hemolinfa e no corpo gorduroso dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*,

2.2. Objetivos específicos:

- 2.2.1. Investigar a presença de vicilinas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) e feijão-comum (*P. vulgaris*) na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*;
- 2.2.2. Verificar o consumo das vicilinas absorvidas durante o desenvolvimento das larvas e em insetos adultos machos e fêmeas de *C. maculatus*;
- 2.2.3. Verificar o efeito da hidratação de sementes naturais, obtidas pelo aumento do número de larvas por semente, sobre o perfil e as concentrações de vicilinas e proteínas totais na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de *C. maculatus*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Obtenção e manutenção do material biológico.

3.1.1 – Sementes

Neste trabalho foram utilizadas sementes de *V. unguiculata* (L) Walp (feijão-de-corda, cultivar Fradinho) e de *P. vulgaris* (L) Fabacea (feijão-comum) adquiridas comercialmente no mercado municipal de Campos dos Goytacazes – RJ e mantidas em frascos de vidro com tampas a temperatura ambiente.

3.1.2 – Insetos

Os insetos que formam a colônia de *C. maculatus* desde 1995, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro foram fornecidos originalmente pelo Professor Dr. José Higino Ribeiro dos Santos, da cultura mantida no Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará, Brasil). Os insetos da espécie *Z. subfasciatus* também foram coletados de colônias mantidas no LQFPP. Estas colônias foram iniciadas em 1995, a partir de insetos fornecidos pelo Professor F. M. Wiendl do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo.

Os insetos que formam a colônia de *C. maculatus* foram mantidos em sementes de *V. unguiculata* (variedade Fradinho) enquanto que os insetos que formam a colônia de *Z. subfascistus* foram mantidos em sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* (variedade feijão-preto). Ambos os insetos foram mantidos a 70% de umidade relativa e 28 °C em câmara de crescimento no LQFPP.

3.2 – Metodologia

Para atingir os objetivos descritos nesta dissertação, as seguintes atividades experimentais foram desenvolvidas.

3.2.1 – Purificação de vicilinas de sementes de *V. unguiculata*

As vicilinas das sementes de *V. unguiculata* (genótipo EPACE-10) foram preparadas segundo o método de Macedo *et al.* (1993) com algumas modificações. Sementes maduras de feijão-de-corda do genótipo EPACE-10 foram utilizadas. Após

a remoção do tegumento, os cotilédones foram triturados em moinho até a obtenção de uma farinha peneirada em peneira de 40 tramas/cm². A farinha de sementes de *V. unguiculata* foi extraída em 100 mM de tampão Tris/HCl, 250 mM de NaCl pH 8,0 na proporção de 1:10 (farinha : tampão de extração) sob agitação constante por três horas, a temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi descartado e as proteínas do sobrenadante submetidas a fracionamento seqüencial com sulfato de amônio a 0-70 % e 70-90 %. A fração 70-90 %, rica em globilinas, foi dialisada exaustivamente contra água destilada, liofilizada e utilizada para purificação de vicilinas. A fração rica em vicilinas (100 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose (2 x 20 cm). A coluna foi equilibrada com 50 mM de tampão Tris/HCl, pH 8,0 e eluída com gradiente de NaCl (0 a 1M), a um fluxo de 30 mL/h e foram coletadas frações de 2 mL e a absorbância lida a 280 nm. As frações enriquecidas em vicilina foram recuperadas, submetidas à diálise contra água destilada e liofilizadas.

3.2.2 – Produção de anticorpos contra vicilinas de *V. unguiculata*

3.2.2.1 – Obtenção do soro pré-imune

Coelhos de três meses de idade foram sangrados através de um corte na extremidade da orelha com um bisturi cirúrgico, para a obtenção de soro pré-imune. Após a coleta de 20 mL em béquer, este material foi deixado por 30 minutos a 37°C. Após formação do coágulo o soro foi recolhido e submetido a centrifugação a 3.000 x g por 2 minutos em uma microcentrífuga refrigerada a 4°C. Após este procedimento o soro clarificado e livre de hemácias foi armazenado a – 20°C.

3.2.2.2 – Imunização

Após a obtenção do soro pré-imune amostras de vicilinas purificadas (antígenos) foram preparadas a uma concentração de 5 mg/mL em 150 mM de solução salina (estéril). Este material foi emulsificado em adjuvante completo de Freund na proporção de 2:1 (solução de vicilina: adjuvante). O protocolo utilizado para imunização do coelho com obtenção de anticorpos policlonais foi o seguinte:

1º dia – Imunização intramuscular do antígeno + adjuvante (1,0 mL).

30º dia – Imunização subcutânea do antígeno + adjuvante (1,0 mL).

45º dia – Imunização subcutânea do antígeno + adjuvante (1,0 mL).

55º dia – Imunização subcutânea do antígeno (1,0 mL) + 1º Sangria.

65º dia – Imunização subcutânea do antígeno (1,0 mL) + 2º Sangria.

A obtenção e estocagem do soro após imunização seguiram o mesmo procedimento do soro pré-imune. Reforços (novas aplicações do antígeno) foram aplicados semanalmente e anti-soros obtidos regularmente, após o 65º dia. Os anticorpos foram utilizados em ensaios de ELISA e nos ensaios de “Western blotting”.

3.2.3 – Crescimento e dissecação de larvas

Larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias após oviposição mantidas em sementes de *V. unguiculata* (cultivar Fradinho) e de *Z. subfasciatus* de 16 dias após oviposição mantidas em sementes de *V. unguiculata* (cultivar Fradinho) e *P. vulgaris*, foram dissecadas. As larvas foram obtidas de colônias mantidas em estufa (câmara de crescimento), na qual insetos fêmeas de *C. maculatus* foram colocados para ovopositar sobre as sementes de *V. unguiculata* e de *Z. subfasciatus* foram colocados para ovopositar sobre as sementes de *V. unguiculata* e de *P. vulgaris* que foram deixadas na estufa durante os dias subseqüentes para que houvesse o desenvolvimento das larvas no interior destas sementes. Estas sementes foram abertas nas datas estipuladas, as larvas foram então retiradas e posteriormente lavadas em solução de 250 mM de NaCl e, em seguida, transferidas para uma lâmina escavada contendo 50 µL da mesma solução, onde foram dissecadas a frio sob lupa estereoscópica. As larvas foram abertas por uma incisão na porção central, para extravasamento da hemolinfa que dispersa nesta solução foi coletada com uma pipeta automática e transferida para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL mantidos em banho de gelo. Em seguida, os demais órgãos foram expostos (tomando-se o cuidado para evitar o rompimento do intestino) e o corpo gorduroso foi separado e transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL mantidos em banho de gelo. As amostras foram então congeladas e armazenadas a -20 °C até o uso.

3.2.4 – Cultivo e dissecação de insetos adultos

Insetos adultos machos e fêmeas de *C. maculatus* com 1 a 10 dias de vida após a emergência de sementes de *V. unguiculata* foram dissecados. Sementes contendo insetos adultos em seu interior e prontos para emergir, foram separadas em

potes de vidro e a emergência do inseto foi acompanhada. Assim que emergiram das sementes os insetos foram coletados e cultivados em outros vidros com tampa perfurada. Os dias de vida a partir da emergência foram então acompanhados sendo que a cada dia um grupo de insetos machos e/ou fêmeas foram dissecados em solução de 250 mM de NaCl. Para isso os insetos foram imobilizados por congelamento durante 5 minutos e transferidos para uma lâmina escavada contendo 50 µL de salina, onde foram assim dissecados a frio sob lupa estereoscópica. Em seguida, o corpo gorduroso visceral foi coletado e transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL mantidos em banho de gelo. As amostras foram então congeladas e armazenadas a -20 °C até o uso.

3.2.5 – Extração de proteínas da hemolinfa e do corpo gorduroso

Após a dissecação das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, a homogeneização somente do corpo gorduroso foi feita em 100 mM de tampão Tris/HCl, 250 mM de NaCl pH 8,0, utilizando-se um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem munido de um pistilo de teflon, em movimentos manuais, mantendo-se o material constantemente em banho de gelo, por 5 min, segundo o protocolo desenvolvido por Sammour *et al.* (1984), com algumas modificações introduzidas por Macedo *et al.* (1993 e 1995). Em seguida, o corpo gorduroso homogeneizado e a hemolinfa foram centrifugados a 10.000 x g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e congelado para análises posteriores. O sedimento foi descartado.

Os corpos gordurosos dos insetos adultos de *C. maculatus* foram submetidos ao mesmo processamento descrito para as larvas.

3.2.6 – Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram feitas de acordo com Smith *et al.* (1985), como modificado por Morton & Evans (1992), com ácido bicinconínico (BCA) e a leitura foi feita em absorvância de 560 nm, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

3.2.7 – Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)

As quantificações de vicilinas foram realizadas pelo método de ELISA segundo instruções do fabricante. Uma placa de micropoços foi sensibilizada com as amostras diluídas em 100 µL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, por

16 hs a 4° C com 100 µL/poço (20µg de proteína). A curva padrão contendo 12 amostras foi construída com vicilinas purificadas de *V. unguiculata* em concentrações crescentes de 0,0024 até 5 µg. Após sensibilização, todas as amostras contidas na placa foram descartadas e a placa foi lavada 5x (5 min/cada) com um volume de 300 µL de tampão PBS contendo 0,05% de Tween e posteriormente a cada poço foi adicionado o mesmo volume de tampão bloqueador (PBS-Tween contendo 1% de gelatina), sendo a placa incubada durante 2 h, a temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, a placa foi novamente lavada 5x (5 min/cada) com um volume de 300 µL de tampão PBS-Tween e depois a cada poço foram adicionados 50µL de anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* produzido em coelho, diluído na proporção de 1:2.000 em tampão bloqueador, por 2 h, à temperatura ambiente. Após a exposição ao anticorpo, a placa foi lavada 10x (não sendo necessário esperar entre uma lavagem e outra) com um volume de 300 µL de tampão PBS-Tween e foram adicionados 50 µL do segundo anticorpo (anti-IgG de coelho complexado a peroxidase), diluído na proporção de 1:2.000 em tampão bloqueador, por 1 h, a temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi novamente lavada 10x (não sendo necessário esperar entre uma lavagem e outra) com o mesmo volume de tampão PBS-Tween. Após as lavagens, foram adicionados a cada poço da placa 50 µL de substrato (10 mg de orto-fenil-diamina dissolvidas em 25 mL de tampão ácido, que consiste em 6,5 mL de ácido cítrico 0,1 M, 7,0 mL de fosfato de sódio 0,2 M, 10 µL de H₂O₂ (30%) e 11,5 mL de H₂O em um valor final de pH = 5,0). A placa foi deixada no escuro por cerca de 10 min a temperatura ambiente. A reação foi parada com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 3 M e a leitura da placa foi realizada a 492 nm em um leitor de ELISA.

3.2.8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

As amostras obtidas na extração de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (Laemmli, 1970). O gel de separação foi preparado misturando-se: 4,0 mL de solução acrilamida-bisacrilamida 30%, 3,3 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de persulfato de amônio 10% (APS) e 4 µL de TEMED. O gel de aplicação foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada, 500 µL de acrilamida-bisacrilamida 30%, 380 µL de tampão Tris/HCl 1,0 M pH 6,8, 30 µL de SDS 10%, 30 µL de APS 10%, e 3 µL de TEMED. O tampão de corrida utilizado na cuba de

eletroforese foi o tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8 contendo água destilada, glicerol 10%, SDS 10%, 2- β -mercapto-etanol e 1% de azul de bromofenol). A eletroforese foi processada a uma voltagem constante de 50 V até que a linha de frente corada com azul de bromofenol alcance o início do gel de separação, onde então a voltagem foi elevada até 100 V durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata para melhor visualização das bandas como descrito no item abaixo.

Foram utilizados como marcadores de massa molecular: β -galactosidase (116 kDa), glicogênio fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

3.2.9 – Coloração dos géis com nitrato de prata

As proteínas dos géis foram submetidas à revelação por precipitação com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). Os géis foram fixados em 50% de metanol, 12% de ácido acético e 50 μ L de formol (37%) (1 h), sendo um pequeno volume desta solução armazenado para parar a reação no final do experimento. Após a fixação, os géis foram lavados 2x em etanol 50% (20 min/cada) e 1x em etanol 30% (20 minutos). Após este período os géis foram tratados com 0,2 mg/mL de tiosulfato de sódio (1 min) sob agitação e lavados 3x em água destilada (20 seg./cada). Em seguida os géis foram corados com 200 mg/100 mL de nitrato de prata + 75 μ L de formol (37%) (20 min). Após este período os géis foram lavados 2x com água destilada (20 seg./cada). A revelação foi feita imergindo o gel em uma solução contendo carbonato de sódio 6 g/100 mL, 50 μ L de formol (37%) e 400 μ L de tiosulfato de sódio (1 mg/mL) deixando por 10 min. esta solução com os géis até a revelação das bandas protéicas. Foi usado o fixador armazenado no início do experimento para parar a reação, ou seja, até aparecerem bolhas de ar. Os géis foram lavados 3x em água destilada (1min/cada) e armazenados em glicerol 2%, para posterior análise e documentação.

3.2.10 – “Western blotting”

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram imunodetectadas de acordo com a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979). As bandas protéicas do gel de poliacrilamida 12% foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose,

durante 2 h, aplicando-se uma corrente constante de 1 mA/cm². Após a eletrotransferência as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau S 0,1%, para verificar a presença das proteínas do gel na membrana, e em seguida foram bloqueadas por 2 h à temperatura ambiente com tampão PBS (136 mM de NaCl, 30 mM de KCl, 1,5 mM de KH₂PO₄ e 8 mM de Na₂HPO₄ · 7H₂O, pH 7,2 a 7,6), contendo 2% de leite em pó desnatado, para bloquear os sítios livres da membrana. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* em tampão bloqueador na proporção de 1:2.000 por 2 h à temperatura ambiente. Após as 2 h de incubação das membranas com os anticorpos, estas foram lavadas 6x (10 min/cada) com o tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho complexado a peroxidase, diluídos em tampão bloqueador na proporção de 1:2.000, por 1 h e 30 min. Passado o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas como descrito anteriormente e a revelação das bandas protéicas imunoreativas para vicilinas foi feita por uma reação com o cromógeno, diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemicals, St. Louis, MO). As membranas foram imersas em solução contendo 5 mg de DAB dissolvidos em 4,9 mL de água destilada, 300 µL de Imidazol 0,1 M, 100 µL de Tris/HCl 2 M pH 7,5, e 5 µL de H₂O₂ (30%). As membranas foram deixadas em contato com a solução reveladora por um período de 10 minutos ou até aparecerem as bandas coradas em marrom. Para parar a reação as membranas foram lavadas com água destilada.

3.2.11 – Hidratação e Infestação de sementes de *V. unguiculata* por *C. maculatus*

A partir da observação de que quanto maior o número de larvas por semente, maior é a umidade no interior desta, nós desenvolvemos um experimento onde foram utilizadas sementes de *V. unguiculata* contendo quantidades diferentes de larvas em seu interior. As sementes de *V. unguiculata* foram infestadas por fêmeas de *C. maculatus* durante algumas horas, o excesso de ovos foi retirado e nós então separamos um grupo de sementes contendo dois ovos, outro grupo contendo quatro ovos e um terceiro e último grupo contendo seis ovos por semente. Estas sementes permaneceram em estufa até as larvas chegarem ao 16º dia de vida, onde foram então dissecadas como já descrito no item 3.2.3.

4 – RESULTADOS

4.1 – Determinação da presença de vicilinas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) e feijão-comum (*P. vulgaris*) na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Nas Figuras 5 e 6, podemos observar as concentrações de vicilinas reconhecidas pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* na hemolinfa (HM) e no corpo gorduroso (CG) nas larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Nós mostramos tanto os resultados expressos em ng de vicilina por μg de proteína (Figura 8) quanto os resultados expressos em μg de vicilina por inseto (Figura 9). Quando analisamos o gráfico da figura 8, notamos que a concentração de vicilina está mais enriquecida na HM. Porém quando observamos o gráfico da figura 9, vemos que o enriquecimento de vicilina acontece no CG e não na HM. Na verdade na figura 8 não é a concentração de vicilina que é maior na HM e sim a concentração de proteína total que é menor neste tecido, deixando então a vicilina em situação de maior destaque após ser reconhecida pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata*. Já o gráfico da figura 9 (vicilina por inseto), mostra o resultado real na qual a vicilina não só foi quantificada na HM e no CG das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, como também sua concentração foi maior na HM e no CG das larvas de *C. maculatus* que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata*. Se nós compararmos as larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata* com as larvas de *Z. subfasciatus* que se alimentaram de sementes de *P. vulgaris*, observamos que a concentração de vicilina absorvida é maior nas duas espécies que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata*.

A presença de bandas protéicas reativas contra anticorpos policlonais produzidos contra vicilinas de *V. unguiculata* na HM e no CG das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foi confirmada por “Western Blotting” (Figura 10). Nós podemos observar bandas protéicas reativas contra o anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* mais aparentes nas raias que mostram resultados da HM de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* que se alimentaram de *V. unguiculata*. Nas raias que mostram resultados da HM de *Z. subfasciatus* que se alimentaram de sementes de *P. vulgaris*, o reconhecimento das três subunidades da vicilina não apareceu na membrana de nitrocelulose, devido ao fato de o anticorpo produzido ser anti-vicilina de *V. unguiculata* e não anti-vicilina de *P. vulgaris*. Este fato pode ter influenciado no

reconhecimento das três subunidades da vicilina. Já nas três raias que mostram resultados do CG, nós observamos o reconhecimento das bandas, porém menos visível do que das amostras obtidas da HM. Isso ocorreu, pois a concentração de proteína total aplicada por poço foi a mesma em todas as amostras e como no CG há uma concentração maior de proteína total do que de vicilina, o anticorpo reconheceu mais fracamente esta proteína de reserva.

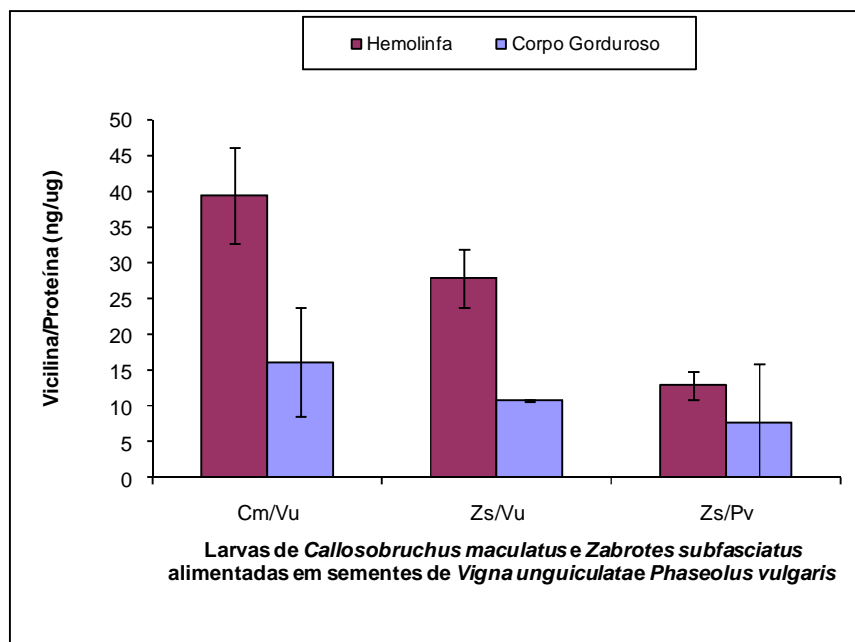


Figura 8 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por μg de proteína na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* (Cm) alimentadas em sementes de *V. unguiculata* (Vu) e das larvas de *Z. subfasciatus* (Zs) alimentadas em sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* (Pv). Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

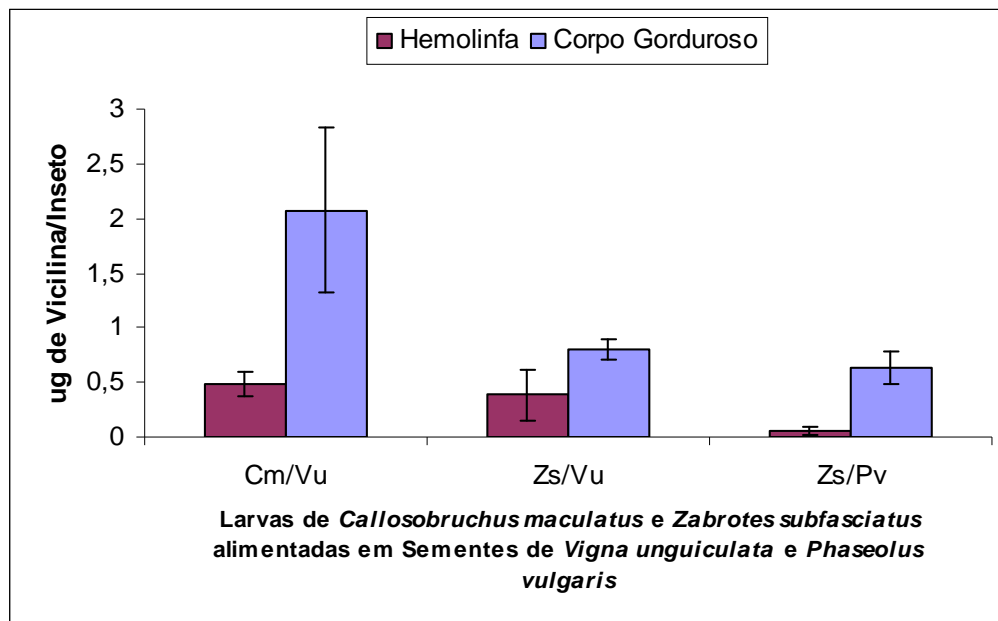


Figura 9 – Quantidade de vicilinas expressas em μg de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* e das larvas de *Z. subfasciatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris*. Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

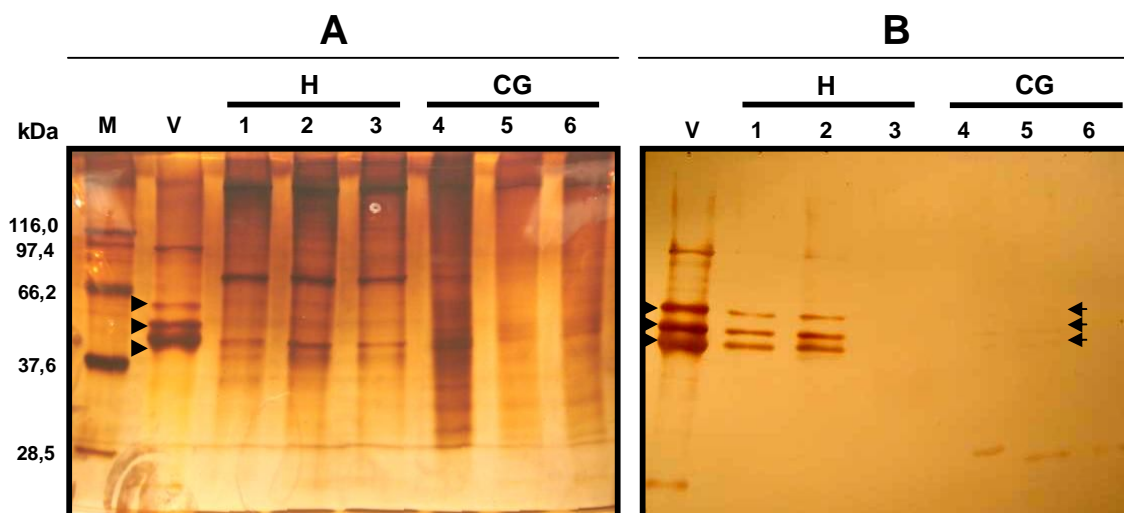


Figura 10 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa e do corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. H – Hemolinfa; CG – Corpo Gorduroso; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão; 1 e 4 – Larvas de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata*; 2 e 5 – Larvas de *Z. subfasciatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata*; 3 e 6 – Larvas de *Z. subfasciatus* alimentadas em sementes de *P. vulgaris*. As cabeças de setas indicam as três subunidades das vicilinas.

4.2 – Concentração das vicilinas absorvidas durante o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*

Nós podemos observar nas Figuras 11 e 12 que a vicilina está presente em diferentes concentrações em todos os estágios larvais e de pupa, não só nas amostras da HM, como também do CG desses animais. Nos resultados onde a concentração em ng de vicilina por μg de proteína total estão sendo comparados, nós observamos que a concentração de vicilina acompanha a concentração de proteína total nas amostras e que há um aumento desta concentração até o 16º dia de desenvolvimento e depois há um decréscimo nos próximos dias (Figura 11). Os resultados expressos em ng de vicilina por inseto mostraram este aumento nas concentrações destas proteínas de reserva até o 16º dia e a diminuição a partir deste ponto, além de identificar novamente que há uma concentração maior de vicilina no CG do que na HM destes animais (Figura 12).

A presença de vicilinas na HM e no CG das larvas de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias de *C. maculatus* que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata* foi confirmada por “Western Blotting” (Figuras 13B e 14B). Nós podemos observar nestes resultados a ocorrência de reconhecimento positivo em todos os dias de desenvolvimento larval e pupal, tanto nas amostras obtidas da HM, como nas amostras obtidas do CG das larvas de *C. maculatus*. Sendo que nas amostras do CG as bandas aparecem mais fracas, pois a concentração de proteína total neste tecido é maior do que a concentração de vicilina.

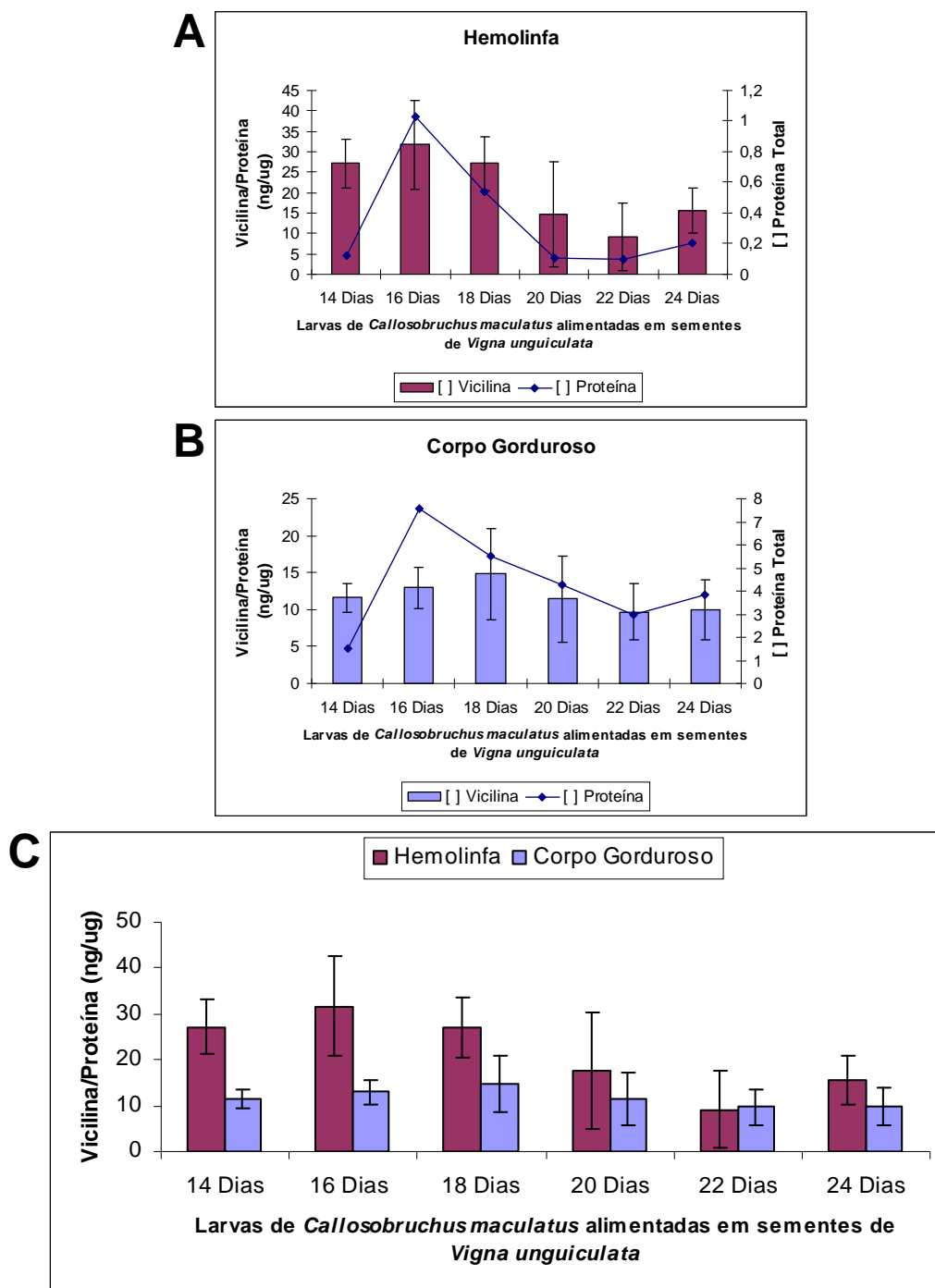


Figura 11 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por μg de proteína na hemolinfa (A) e no corpo gorduroso (B) das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias alimentadas em sementes de *V. unguiculata*. Em C está a união dos dois gráficos (A e B). Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

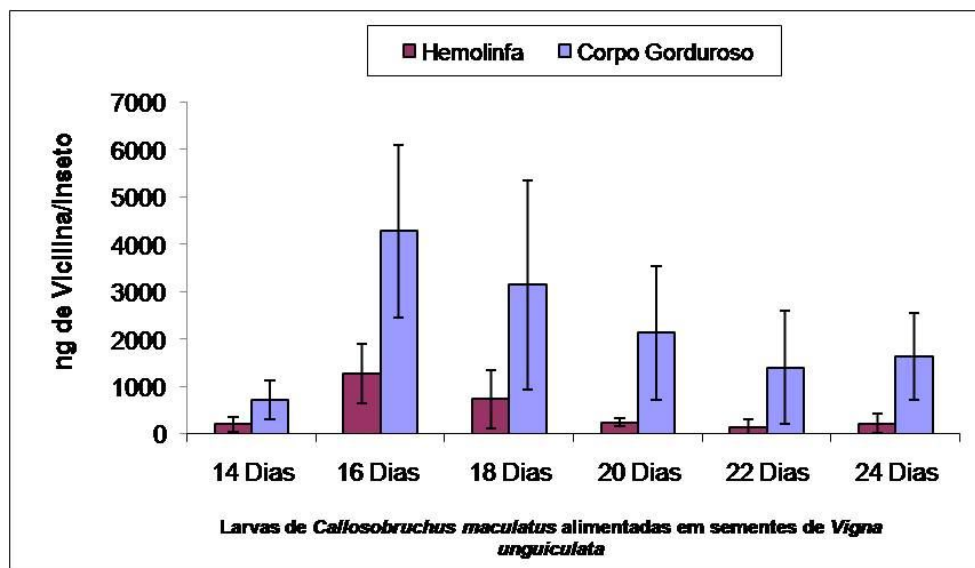


Figura 12 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias alimentadas em sementes de *V. unguiculata*. Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

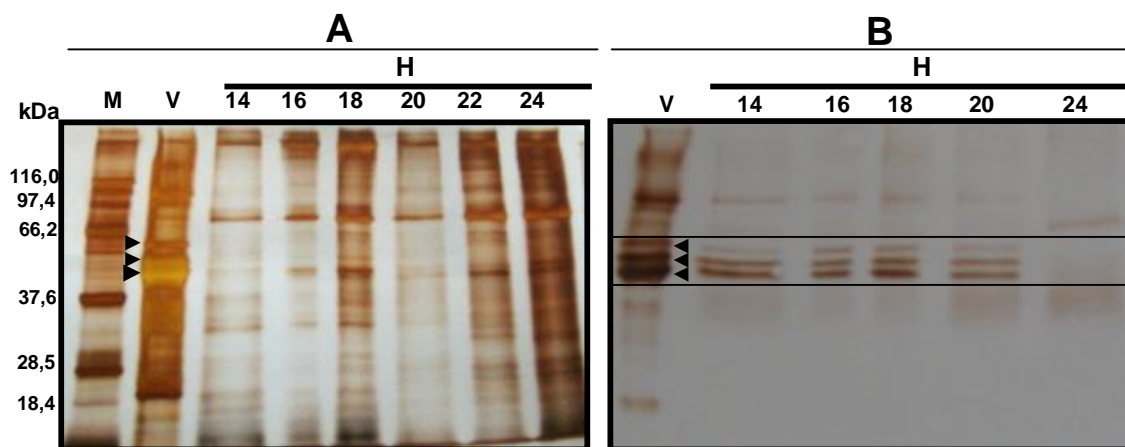


Figura 13 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20 e 24 dias. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. H – Hemolinfa; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão. As cabeças de setas indicam as três subunidades das vicilinas.

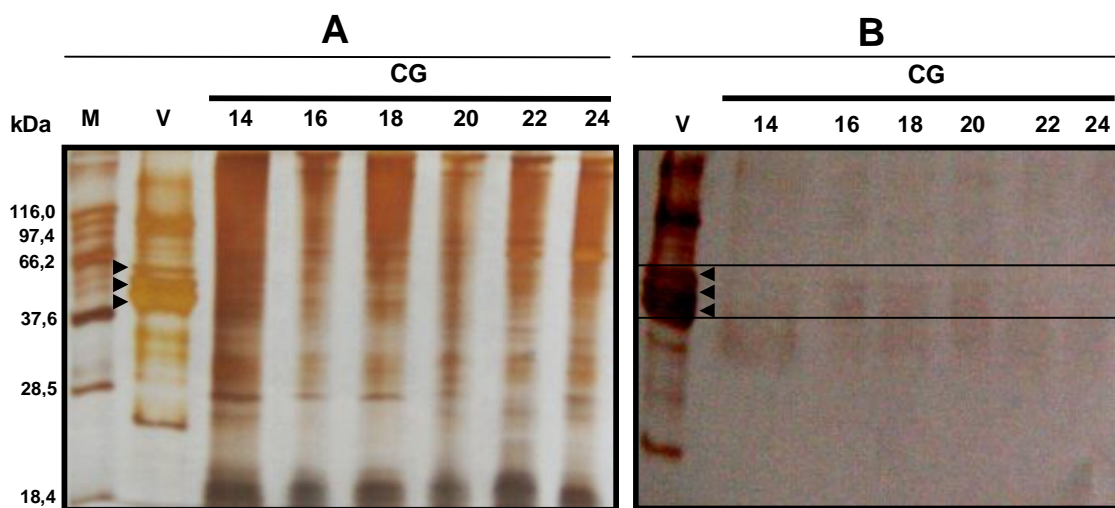


Figura 14 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* de 14, 16, 18, 20 e 24 dias. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. CG – Corpo Gorduroso; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão. As cabeças setas indicam as três subunidades das vicilinas.

4.3 – Consumo das vicilinas absorvidas em *C. maculatus* de ambos os sexos

Podemos observar na Figura 15 que a vicilina está presente em todos os 10 dias após a emergência do *C. maculatus* das sementes de *V. unguiculata* e que a concentração de proteína total está diminuindo. Mas ao observamos as barras relativas as concentrações de vicilinas, notamos que estas não sofrem diminuição acompanhando as concentrações de proteínas totais. Já ao observamos a Figura 16 (Vicilina/Inseto), notamos que as concentrações de vicilinas estão diminuindo logo após a emergência destes insetos das sementes de *V. unguiculata*. Observamos também a partir destes resultados que as concentrações de vicilinas são maiores em fêmeas do que em machos.

A presença de vicilinas foi confirmada por “Western Blotting” no CG destes insetos (Figuras 17B e 18B). Nós podemos observar nas duas Figuras que o reconhecimento das bandas protéicas reativas contra anticorpos policlonais produzidos contra vicilinas de *V. unguiculata* se encontra em uma posição mais abaixo, se comparado com as bandas da molécula de vicilina padrão, sugerindo uma possível degradação destas moléculas.

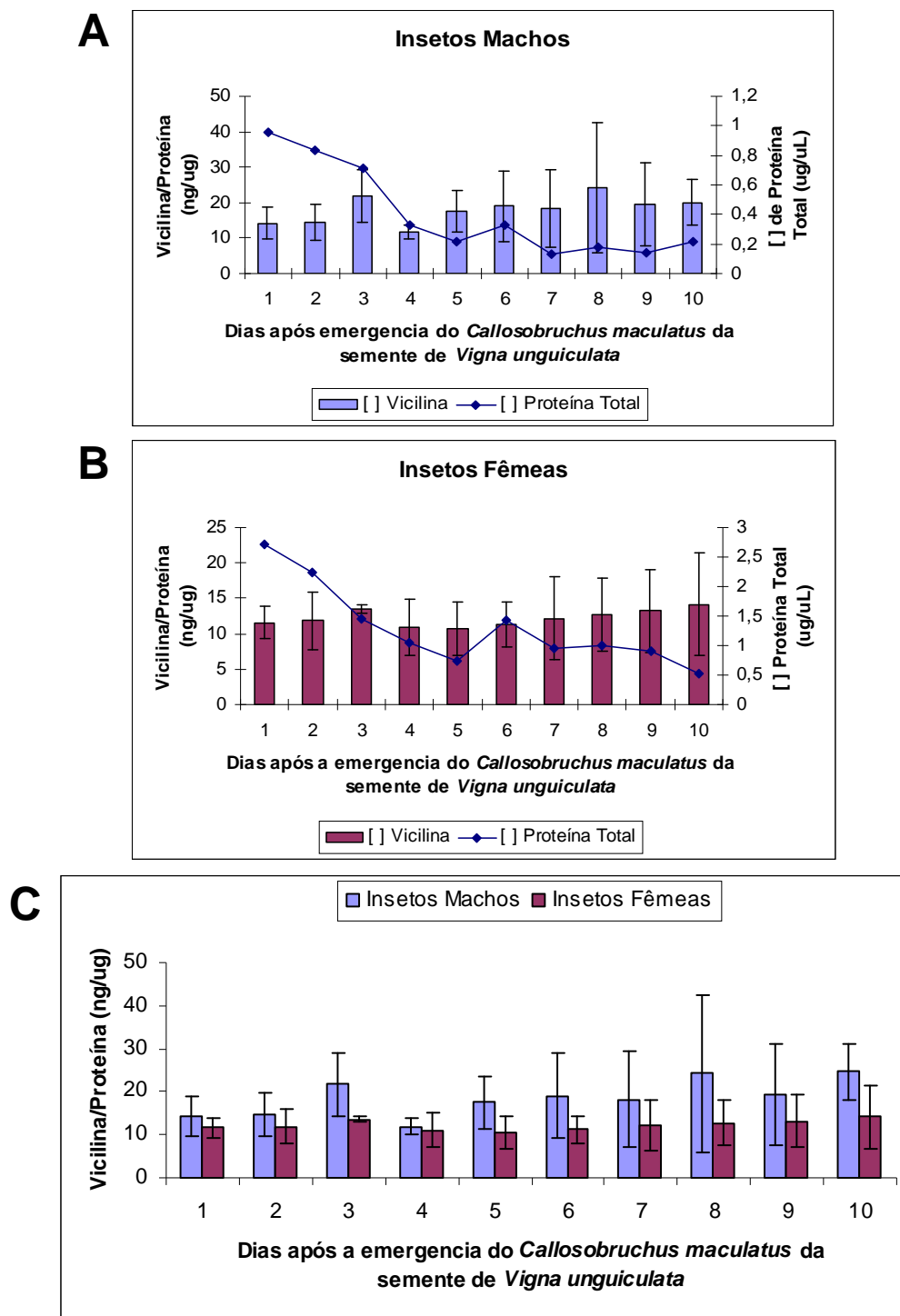


Figura 15 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por μg de proteína no corpo gorduroso de insetos machos (A) e de insetos fêmeas (B) de *C. maculatus* com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. Em C está a união dos dois gráficos (A e B). Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

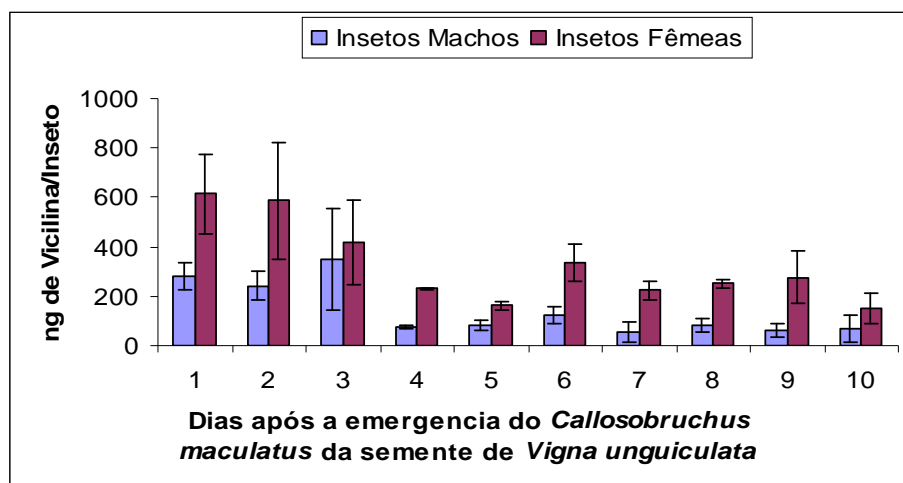


Figura 16 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por inseto no corpo gorduroso de *C. maculatus* adultos de ambos os sexos com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

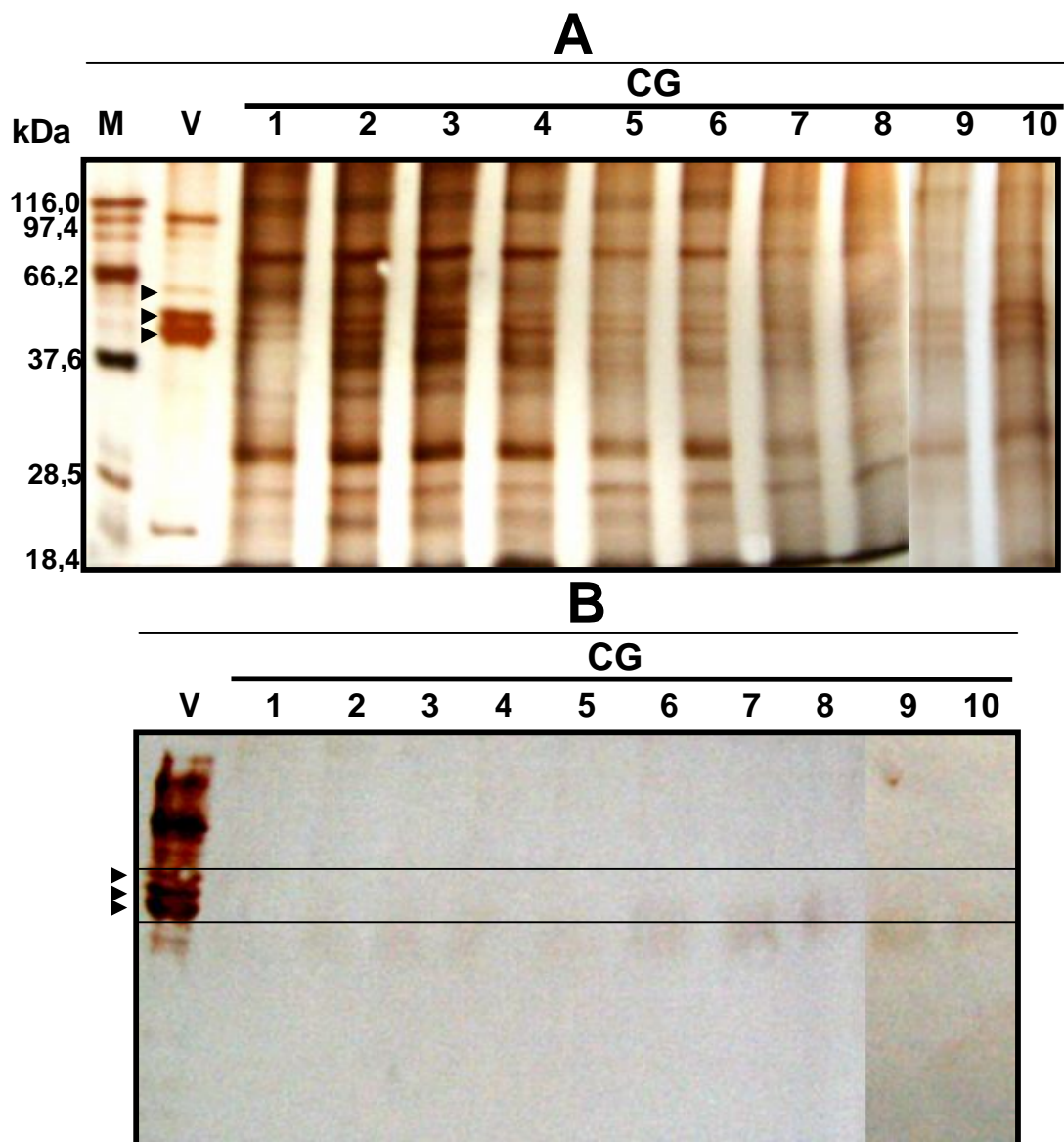


Figura 17 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso de adultos de *C. maculatus* machos com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. SDS-PAGE 12% corado por prata (**A**) e “Western blotting” (**B**). CG – Corpo Gorduroso; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão. As cabeças de setas indicam as três subunidades das vicilinas.

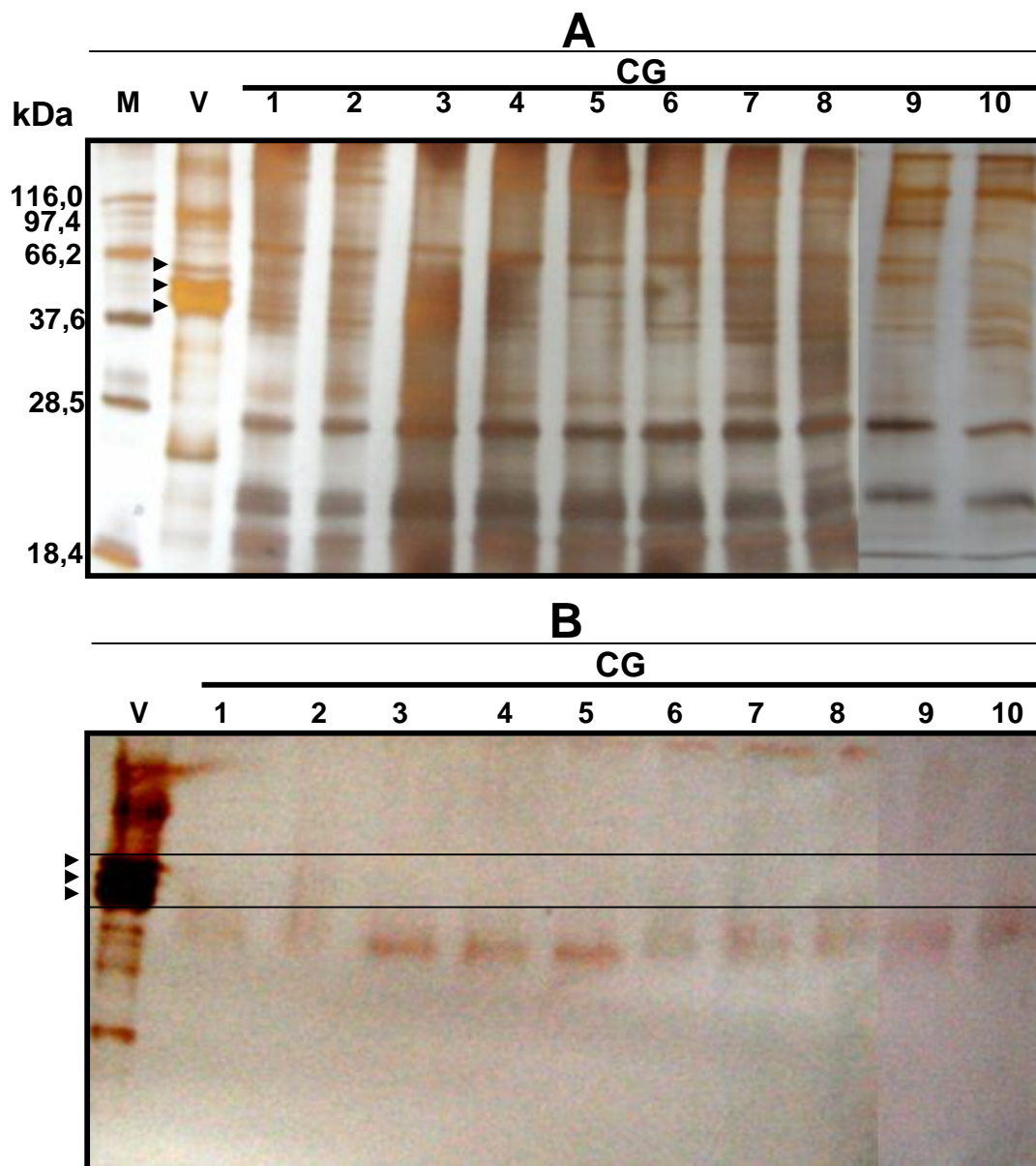


Figura 18 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas do corpo gorduroso de *C. maculatus* adultos fêmeas com 1 a 10 dias após a emergência de sementes de *V. unguiculata*. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. CG – Corpo Gorduroso; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão. As cabeças de setas indicam as três subunidades das vicilinas.

4.4 – Efeitos da hidratação de sementes naturais, obtidas pelo aumento do número de larvas por semente, sobre as concentrações de vicilinas e proteínas totais na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de *C. maculatus*

As Figuras 19 e 20 mostram que há uma diferença significativa nas concentrações de vicilinas tanto na HM quanto no CG das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* contendo 2, 4 e 6 larvas por semente. Em ambos os resultados, nós observamos que a concentração de vicilina parece aumentar na HM e diminuir no CG a medida que mais larvas são encontradas dentro da semente de *V. unguiculata*.

A presença de vicilinas na HM e no CG destas larvas, foi confirmada por “Western Blotting” (Figura 21B). Nós podemos observar que a uma mesma concentração de proteínas totais aplicadas por poço do gel de eletroforese (50µg para amostras da HM e 100µg para amostras de CG), ocorreu o reconhecimento diferencial das três subunidades da vicilina pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* em todas as raias, mesmo sendo as amostras obtidas de larvas de mesma idade (16 dias) alimentadas no mesmo tipo de semente.

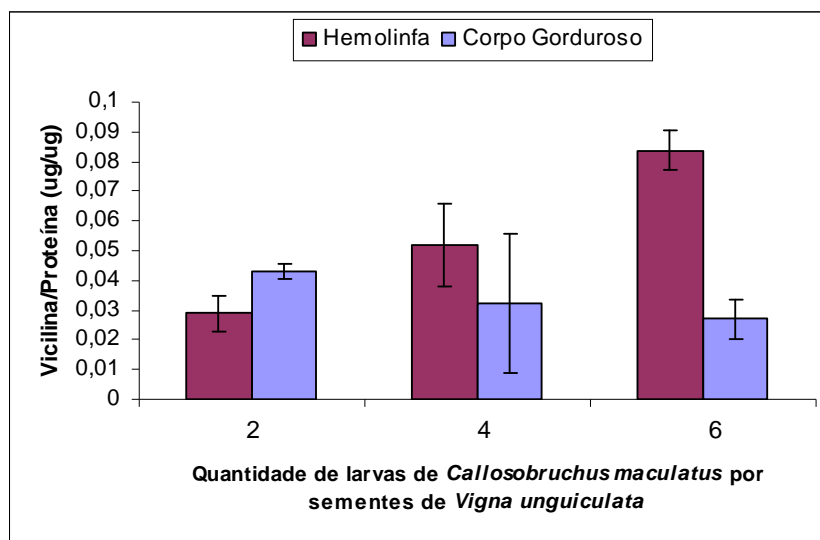


Figura 19 – Quantidade de vicilinas expressas em ng de vicilina por μg de proteína na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com quantidades diferentes destes insetos. Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

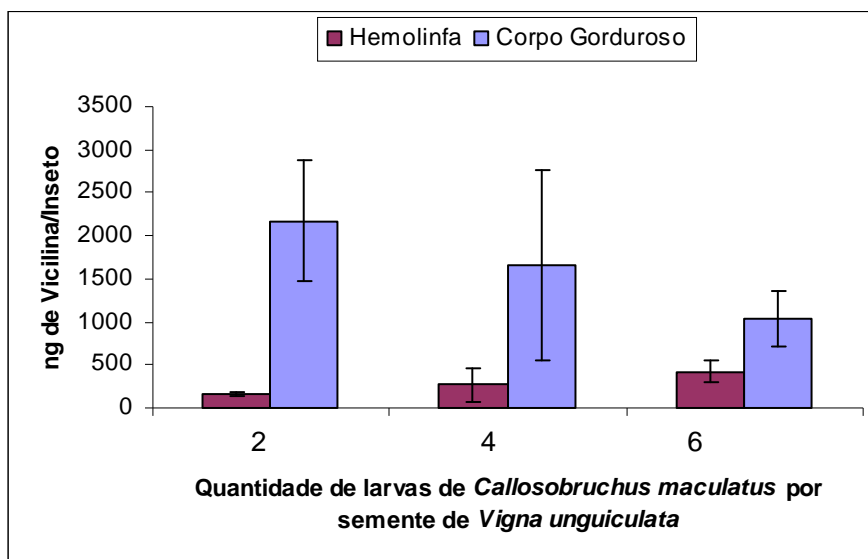


Figura 20 – Quantidade de vicilinas expressas em μg de vicilina por inseto na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com quantidades diferentes destes insetos. Os histogramas correspondem às médias de ensaios em triplicata representativos de três lotes independentes.

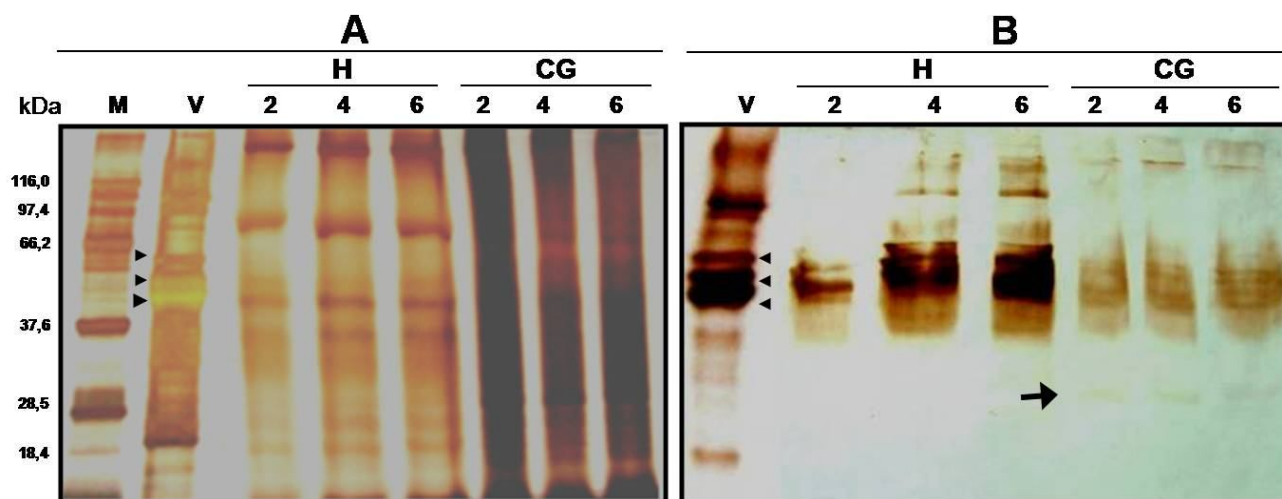


Figura 21 – Visualização eletroforética de proteínas extraídas da hemolinfa e do corpo gorduroso das larvas de 16 dias de *C. maculatus* alimentadas em sementes de *V. unguiculata* com 2, 4 e 6 larvas por semente. SDS-PAGE 12% corado por prata **(A)** e “Western blotting” **(B)**. H – Hemolinfa; CG – Corpo Gorduroso; M – Marcador de massa molecular; V – Vicilina padrão. As cabeças de setas indicam as três subunidades das vicilinas.

5 – DISCUSSÃO

A toxicidade de vicilinas tem sido correlacionada com sua resistência à proteólise pelas enzimas digestivas do bruquídeo *C. maculatus* e proteases exógenas e com sua capacidade de ligação às células epiteliais do intestino médio de *C. maculatus* (Sales *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993). Moléculas de vicilinas têm sido observadas como capazes de interagir com quitina (Sales *et al.*, 1996; Firmino *et al.*, 1996) e com a membrana peritrófica em larvas do lepidóptero *D. saccharalis* (Mota *et al.*, 2003) e do coleóptero *Tenebrio molitor* (Paes *et al.*, 2008). Sales *et al.* (2001) detectaram imunologicamente vicilinas nas bordas das microvilosidades do intestino médio de larvas de *C. maculatus*.

A interação de proteínas de sementes, com propriedades de ligação a carboidratos, com o intestino e membranas peritróficas, e seus subseqüentes efeitos tóxicos, têm sido registrados em diversos insetos (Eisemann *et al.*, 1984; Harper *et al.*, 1998; Habibi *et al.*, 2000; Fitches *et al.*, 2001). Recentes estudos têm fornecido evidência de que a possibilidade de absorção, internalização e ação de moléculas de proteínas em órgãos internos, além de ser um processo importante, são comuns nestes animais. Paes *et al.* (2000) mostraram que proteínas tóxicas a bruquídeos, como por exemplo, as arcelinas, não somente se ligam à parede do intestino, mas são também encontradas nos órgãos internos das larvas de *Z. subfasciatus*. Fitches *et al.* (2001; 2002) mostraram que lectinas como, por exemplo, as GNA e PHA têm sido capazes de se ligar ao tecido do intestino médio e são detectadas em órgãos internos das larvas da mariposa do tomate *Lacanobia oleracea* (Fitches *et al.*, 2001; 2002).

Uchôa *et al.* (2006) em resultados recentes confirmaram o transporte de vicilinas do lúmen do intestino médio para dentro da hemolinfa de *C. maculatus* e mostraram que estas proteínas também foram detectadas nos túbulos de Malpighi e no corpo gorduroso 48 h após a ingestão. Como proteínas de reserva, as vicilinas servem primariamente como uma fonte de nitrogênio orgânico e esqueletos de carbono para reações biossintéticas na planta em crescimento. Alternativamente, os seus aminoácidos componentes podem ser usados para estimular o metabolismo energético (Schlereth, *et al.*, 2001). Por serem consideradas proteínas multifuncionais, funcionando como uma fonte de aminoácidos durante a germinação da planta e ao mesmo tempo sendo tóxica a bruquídeos (Macedo *et al.*, 1993; Shutov *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2000), uma das hipóteses que foi investigada neste

trabalho teve como finalidade examinar se a absorção e o acúmulo de vicilinas pela hemolinfa e pelo corpo gorduroso dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, estavam relacionadas a sua posterior mobilização como reserva protéica.

Complementando então os resultados obtidos por Uchôa *et al.* (2006), nossos experimentos mostram as concentrações (Figuras 5 e 6) e a presença (Figura 7B) de moléculas de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* na hemolinfa e no corpo gorduroso, não só de larvas de 16 dias de *C. maculatus* mantidas em sementes de *V. unguiculata* como também de larvas de *Z. subfasciatus* mantidas em sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris*. Na Figura 7B nós podemos observar que houve um reconhecimento diferencial das vicilinas de *V. unguiculata* e de *P. vulgaris* nas larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Esses dados nos levam a acreditar que o anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* não reconheceu da mesma maneira a proteína de reserva (faseolina) presente nas sementes de *P. vulgaris*. Já pelo método de ELISA, nós conseguimos quantificar estas proteínas. Através destes resultados nós sugerimos então que a absorção de vicilinas pelas larvas é um evento que faz parte do plano de adaptação e desenvolvimento normal dos insetos pertencentes à ordem Coleoptera.

O transporte de vicilinas para a hemolinfa das larvas de *C. maculatus* é semelhante a resultados obtidos por vários outros autores. Sugimura *et al.* (2001) mostraram que a molécula de urease de folhas de amoreira, foi absorvida intacta do lúmen intestinal para a hemolinfa de larvas do bicho-da-seda, *B. mori*; Casartelli *et al.* (2005) mostraram que a molécula de albumina foi translocada através da barreira intestinal da larva *B. mori*, em uma forma não processada, através do mecanismo da transcitose; Jeffers *et al.* (2005) mostraram que a molécula de proteína BSA e o anticorpo policlonal anti-BSA cruzaram o sistema digestivo dos insetos da broca do broto de tabaco de quarto instar, *Heliothis virescens* e se acumularam na hemolinfa destes insetos; Trung *et al.* (2006) mostraram também que uma proteína tóxica chamada Butal T que só aparecia na hemolinfa de larvas de lepidópteros quando injetada diretamente neste tecido, foi detectada neste mesmo órgão após ser ingerida oralmente por estes insetos quando sofreu uma recombinação com a GNA (ButalT/GNA).

Nos resultados obtidos por Uchôa *et al.* (2006), as determinações das concentrações de vicilinas nas carcaças e no intestino médio das larvas do segundo instar de *C. maculatus* foram mostradas ocorrer desde o início do seu período de

alimentação. Nossos resultados mostram as concentrações de vicilinas na hemolinfa e no corpo gorduroso de larvas de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias de *C. maculatus* que se alimentaram de *V. unguiculata*. Nas Figuras 8 e 9 observam-se as diferentes concentrações das vicilinas em todos os estágios larvais e de pupa, não só nas amostras da hemolinfa como também do corpo gorduroso destes animais e nas Figuras 10B e 11B observamos a presença destas moléculas em todos os estágios de desenvolvimento. Notamos que há um aumento nas concentrações destas proteínas de reserva até o 16º dia e em seguida estas começam a diminuir, quando já em estágio de pupa. Podemos sugerir a partir destes resultados que estas proteínas estão sendo consumidas pelas pupas como reserva energética, já que estas não se alimentam.

Casartelli *et al.* (2007) com o propósito de obter um conhecimento mais profundo deste processo de transporte de proteínas cruzando o epitélio intestinal, investigaram a absorção da HRP, uma glicoproteína de 40 kDa, pelo intestino médio de larvas do bicho-da-seda *B. mori in vitro*. Logo em seguida estes mesmos autores (Casartelli *et al.*, 2008), após examinarem em cultura o mecanismo responsável pela internalização da albumina-(FITC) por células colunares obtidas do intestino médio de larvas *B. mori*, concluíram que existe um receptor envolvido na endocitose de proteínas pelo intestino médio destes insetos. Uchôa *et al.* (2006), analisaram através de experimentos envolvendo vicilinas acopladas também a FITC que ocorre a ligação destas proteínas a uma fração rica em microvilosidades intestinais, o que pode estar relacionado à presença de receptores para vicilinas nas membranas das microvilosidades dos intestinos de larvas de *C. maculatus*.

Vinson & Iwantsch (1980) consideram o corpo gorduroso dos insetos, como o principal órgão de armazenamento de compostos metabolicamente ativos, constituindo-se numa das maiores fontes de nutrição para parasitóides e predadores. Resultados obtidos por nós mostram a presença (Figuras 10B e 11B) e as diferentes concentrações de vicilinas (Figuras 8 e 9) no corpo gorduroso de *C. maculatus* adultos de ambos os sexos com 1 a 10 dias após a emergência das sementes de *V. unguiculata*. Observamos através do método de ELISA um decréscimo das concentrações de vicilinas com o passar dos dias após a emergência destes insetos e pelo “Western Blotting” o reconhecimento das bandas reativas ao anticorpo anti-vicilina em uma posição mais abaixo se comparado com a molécula de vicilina padrão. Esses dados são também muito interessantes, pois

sugerem que há o consumo de vicilinas pelos insetos após dias de emergência, principalmente nas fêmeas, estando então de acordo com o fato de que no estágio adulto estes não se alimentam.

Outra hipótese a ser investigada neste trabalho e que tem como objetivo explicar o porquê da absorção de vicilinas por órgãos internos dos insetos da ordem coleoptera, esta relacionada com as respostas de organismos vivos ao estresse abiótico. As respostas ao estresse osmótico mostram notáveis similaridades quando observamos a partir de uma ampla distancia evolucionária entre as espécies. Famílias de genes codificando proteínas funcionalmente distintas, mas estruturalmente relacionadas tem sido definido como uma superfamília (Hood *et al.*, 1985). Diferentes autores têm mostrado que as vicilinas pertencem a uma superfamília que tem evoluído de um grupo de proteínas antigas que participaram em processos básicos de hidratação e dessecação celular durante a germinação de sementes (Bäumlein *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1996). Desta forma, foi descrito na literatura que as espirulinas (específicas da esporulação de mixomicetos) e as germinas (específicas da germinação de milho), assim como as globulinas de reserva de sementes, são expressas em tecidos que toleram a dessecação e a rápida re-hidratação (Bernier *et al.*, 1987; Lane *et al.*, 1991; revisado por Shutov & Bäumlein, 1999; revisado por Dunwell *et al.*, 2000).

A nossa hipótese, portanto, se baseia no fato de que como os bruquídeos se desenvolvem dentro de sementes secas e suas células ficam expostas ao estresse osmótico, as larvas destes insetos para se adaptarem a este ambiente seco de modo a evitar o possível estresse em suas células e garantir a sobrevivência e perpetuação da espécie, desenvolveram a capacidade de absorver e acumular as vicilinas (globulinas de reserva 7S).

A partir da observação de que muita larva no interior da semente aumenta a umidade desta, nós desenvolvemos um experimento onde foram utilizadas diferentes quantidades de larvas por sementes, com o objetivo de verificar se uma semente com menor quantidade de larva (mais seca) e uma semente com maior quantidade de larva (mais úmida) apresenta diferenças quanto às concentrações de vicilinas nas amostras obtidas da hemolinfa e do corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus*. Nossos resultados foram bastante interessantes. Observamos que a concentração de vicilina aumenta na hemolinfa com o aumento do número de larvas por sementes e já no corpo gorduroso ocorre o contrário (Figuras 19 e 20).

Assumindo então que mais larva na semente provoque o aumento da umidade em seu interior, o que acontece é que a vicilina se desloca do corpo gorduroso para a hemolinfa. Sugerimos que este fenômeno acontece, pois se o ambiente no interior da semente está mais úmido então a vicilina não precisa se acumular no corpo gorduroso, para proteger as suas células, permanecendo então na hemolinfa. Agora se o ambiente no interior da semente começa a ficar mais seco a vicilina se acumula no corpo gorduroso na tentativa talvez de proteger esse órgão contra a dessecação celular.

Na Figura 21B nós podemos observar a presença das subunidades de vicilina reconhecidas pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* em todas as amostras. Foram aplicadas as mesmas quantidades de proteínas totais em todas as raias do gel de eletroforese (Hemolinfa=50µg e Corpo Gorduroso=100µg) e todas as amostras foram obtidas de larvas de 16 dias, só que com quantidades diferentes destas em cada semente. Notamos uma diferença bastante significativa nas amostras da hemolinfa, onde parece haver um aumento no reconhecimento das moléculas de vicilina pelo anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* da raia 2 até a raia 6. Já em todas as amostras do corpo gorduroso observamos bandas protéicas reconhecidas pelo anticorpo anti-vicilina, com peso molecular em torno de 30 Kda e que não aparecem nas amostras da hemolinfa.

Castillo *et al.* (2000) descreveram uma proteína (p16) no núcleo de embriões de ervilha dormente (*Pisum sativum*), que tem como precursor o polipeptídeo p54 que foi descrito por estes autores como pertencente à superfamília das vicilinas devido ao seu gene (*psp54*) ser expresso durante o processo de dessecação celular. Algum tempo depois, Castillo *et al.* (2005), analisando seqüências e modelagens 3D observaram que o polipeptídeo p54 pertence na realidade a uma outra superfamília de proteínas (chamadas cupina), mas continua relacionado, só que em menor extensão, a proteínas de reserva de sementes do tipo vicilina.

Acreditamos que nossos resultados a este respeito terão um grande impacto nas áreas de estudo da interação inseto-planta.

6 – CONCLUSÕES

6.1. As vicilinas estão presentes e com perfis diferentes na hemolinfa e no corpo gorduroso não só das larvas de *C. maculatus* que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata* como também das larvas de *Z. subfasciatus* que se alimentaram de sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris*;

6.2. As vicilinas apresentam concentrações mais baixas na hemolinfa e no corpo gorduroso das larvas de *Z. subfasciatus* quando comparadas as larvas de *C. maculatus*;

6.3. Durante o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*, as vicilinas além de estarem presentes, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 dias após a ovoposição, elas apresentam perfis diferentes, aumentando sua concentração até o 16º dia e em seguida diminuindo;

6.4. As vicilinas se apresentam em concentrações maiores no corpo gorduroso quando comparado a hemolinfa não só nas larvas de *C. maculatus*, mas também nas larvas de *Z. subfasciatus*;

6.5. As vicilinas estão presentes nos insetos adultos machos e fêmeas de *C. maculatus* do 1º ao 10º dia após a emergência das sementes de *V. unguiculata*;

6.6. A concentração das vicilinas é mais alta em insetos fêmea do que em insetos machos de *C. maculatus*;

6.7. A concentração de vicilina é mais alta tanto em insetos machos quanto em insetos fêmea nos primeiros dias após a emergência das sementes de *V. unguiculata*, decrescendo nos dias subseqüentes;

6.8. A concentração de vicilinas aumenta na hemolinfa e diminui no corpo gorduroso de *C. maculatus* com o aumento da umidade nas sementes de *V. unguiculata*.

7 – BIBLIOGRAFIA

- Abrol, D.P. (1999). Pulse susceptibility to *Callosobruchus chinensis* (L.) (Bruchidae: Coleoptera) under field conditions. *Journal of Tropical Agriculture*, 76:150.
- Antunes, P.L., Bilhalva, A.B., Elias, M.C., Soares, G.J.D. (1995). Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. *Revista Brasileira de Agrociência*, 1(1):12-18.
- Apodaca, G. (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic*, 2(3):149-159.
- Applebaum, S.W., Tadmor, U., Podoler, M. (1970). The effect of starch and of a heteropolysaccharide fraction from *Phaseolus vulgaris* on development and fecundity of *Callosobruchus maculatus* (F.). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 13:61-70.
- Bastos, J. A.M. (1981). Principais pragas de cultivares e seus controles. Nobel, p. 50-84.
- Bäumlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I.A., Shutov, A.D. (1995). Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 41:1070-1075.
- Bernier, F., Lemieux, G., Pallotta, D. (1987). Gene families encode the major encystment-specific proteins of *Physarum polycephalum* plasmodia, *Gene (Amst)*, 59:265-277.
- Bewley, J.D., Black, M. (1994). Seeds: physiology of development and germination, 2ed, Plenum Press, 445p.
- Blum, H., Beier, H., Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 8:93-99.
- Braun, H., Czihal, A., Shutov, A.D., Bäumlein, H. (1996). A vicilin-like seed of cycads: similarity to sucrose-binding proteins, *Plant Molecular Biology*, 31:35-44.
- Brusca, R.C., G.J. Brusca. 2007. Invertebrados. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2ª ed. 968p.
- Carasco, J.F., Croy, R., Derbyshire, E., Boulter, D. (1978). The isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their sequential synthesis in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 29:309-323.

- Cardona, C., Kornegay, J. (1999). Bean germplasm resources for insect resistance. In: Clement, S.L., Quisenberry, S.S. (Eds.), *Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 85-99.
- Cardona, C. (2004). Common beans: Latin America. In: Farrell, G., Hodges, R.J. (Eds.), *Crop Post-harvest: Science and Technology*. Durbles, Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 145-150.
- Casartelli, M., Cortia, P., Leonardia, M.G., Fiandraa, L., Burlinib, N., Pennacchioc, F., Giordanaa B. (2005). Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *Journal of Insect Physiology*, 51:933-940.
- Casartelli, M., Corti, P., Cermenati, G., Grimaldi, A., Fiandra, L., Santo, N., Pennacchio, F., Giordana, B. (2007). Absorption of horseradish peroxidase in *Bombyx mori* larval midgut. *Journal of Insect Physiology*, 53(6):517-25.
- Casartelli, M., Cermenati, G., Rodighiero, S., Pennacchio, F., Giordana, B. (2008). A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the mid gut of an insect (*Bombyx mori*, Lepdoptera). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295:1290-1300.
- Casey, R., Domoney, C., Ellis, N. (1986). Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surveys of Plant Molecular Biology and Cell Biology*. 3:2-95.
- Castillo, J., Rodrigo, M.I., Márquez, J.A., Zúniga, A., Franco, L. (2000). A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *European Journal Biochemistry*, 267:2156-2165.
- Castillo, J., Genove, A., Franco, L., Rodrigo, M.I. (2005). A multifunctional bicupin serves as precursor for a chromosomal protein of *Pisum sativum* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 56(422):3159-3169,
- Chagas, E.P., Santoro, L.G. (1997). Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(1):17-26.
- Chapman, R.F. (1982). *The Insects: Structure and Function*. 3 ed. Cambridge: Harvard University Press. p.
- Chapman, R.F. (1998). *The insects: structure and function*. 4 ed. Cambridge University Press, 770 pp.
- Costa, C. (1999). Coleoptera Linnaeus, 1758. In: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Joly, C.A. and C.E.M. Bicudo (orgs.). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.

- Credland, P.F., Dendy, J. (1992). Intraespecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 65:39-47.
- Dendy, J., Credland, P.F. (1991). Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59:9-17.
- Dunwell J.M., Khuri, S., Gane, P.J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:153-179.
- Eisemann, C.H., Donadson, R.D., Pearson, R.D., Cadogan, L.C., Vuocolo, T., Tellam, R.L. (1984). Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72:1-10.
- EMBRAPA (2004). Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins. Glossário. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/glossario.htm>> Consultado em 02/06/2007 às 15h55min.
- (FAOSTAT data, 2004, <<http://faostat.fao.org/>>).
- Fernandes, K.V.S., Sabelli, P.A., Paul Barratt, D.H., Richardson, M., Xavier-Filho J., Shewry P.R. (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 23:215-219.
- Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1998). The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 4:241-245.
- Ferreira, A.M. (1960). Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh.) (Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. *Garcia Orta*, 8(3):559-581.
- Firmino, F., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Gomes, V.M., Miranda, M.R.A., Domingues, S.J.S., Xavier-Filho, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29:749-756.
- Fitches, E., Ilett, C., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, L.N., Greene, R., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. (2001). The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and

- transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae lectin binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology*, 47:1389-1398.
- Fitches, E., Audsley, N., Gatehouse, J.A., Edwards, J.P. (2002). Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1653-1661.
- Fotso, M., Azanza J.L., Pasquet R., Raymond J. (1994). Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae) seed storage proteins. *Plant Systematics and Evolution*, 191:39-56.
- Freire Filho, F.R., Cardoso, M.J., Araújo, A.G. de. (1983). Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 18(112):136-137.
- Freitas, R.L., Teixeira, R.T., Ferreira, R.B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1682-1687.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., G.C.; Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002). *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba, Fealq, 920p.
- Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Dobbie, P., Kilminster, A.M., Boulter, D. (1979). Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30:948-958.
- Gomes, V.M., Okorokov, L.A., Rose, T.L., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1998). Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochemica Biophysica Acta*, 1379:207-216.
- Guazzelli, R.J. (1988). Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. EMBRAPA/CNAPAF, Goiânia, Goiás, Brasil. In: Araújo, J.P.P., Watt, E.E. (Eds.) (1988) – O caupi no Brasil, Brasília, IITA/EMBRAPA, 722p.
- Guzmán-Maldonado, S.H., Marín-Jarillo, A., Castellanos, J.Z., González De Mejía, E., Acosta-Gallegos, J.A. (1996). Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Stored Products Research*, 32:53-58.

- Habibi, J., Backus, E.A., Huesing, J.E. (2000). Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus herperus* Knight. *Journal of Insect Physiology*, 46:611-619.
- Haines, C.P. (1991). Insects and arachnids of tropical stored products: Their biology and identification. 2ª edição. Kent, *Natural Resources Institute*, 246 p.
- Harper, S.M., Hopkins, T.L., Czapla, T.H. (1998). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in european corn borer (*Ostrina nubilalis*) larvae. *Tissue and Cell*, 30:166-176.
- Hohmann, C.L., Carvalho, S.M. (1989). Pragas e seu controle, p. 217-246. In: Carvalho, S.M., Carneiro, R.G., Mariot, E.J., Assumpção, L.C., Junior, R.P.L., Pereira, L.R., Siqueira, D.R.S., Hauagge, R. and Postiglioni, S.R. (Eds.). O Feijão no Paraná. Londrina, IAPAR, Circular 63:303 p.
- Hood, L., Kronenberg, M., Hunkapillar, T. (1985). T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family, *Cell*, 40: 225-229.
- Howe, R.W., Currie, J.E. (1964). Some laboratory observations of the rates of development, mortality and oviposition of several species of bruchidae breeding in stored pulses. *Bulletion of Entomological Research*, 31:95-119.
- Jeffers, L.A., Thompson, D.M., Ben-Yakir, D., Roe, R.M. (2005). Movement of proteins across the digestive system of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. The Netherlands Entomological Society. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117:135-146.
- Jensen, P.V., Børgesen, L.W. (2000). Regional and functional differentiation in the fat body of pharaoh's ant queens, *Monomorium pharaonis* (L.). *Arthropod Structure and Development*, 29:171-184.
- Johnson, C.D. (1989). Adaptive radiation of *Acanthoscelides* in seeds: examples of legume-bruchid interactions. In: Stirton, C.H., Zarucchi, J.L. (Eds.). Advances in legume biology. *Monographs in Systematic Botany*, 29:747-779.
- Kay, D.E. (1979). Food legumes. *Tropical Products Institute*. Crop and Product Digest. Vol. 3. London.
- Khan, M.R.I., Gatehouse, J.A., Boulter, D. (1980). The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Experimental Botany*, 31:1599-1611.

- Kompella, U.B., Lee, V.H.L (2001). Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46:211–245.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lane, B.G., Bernier, F., Dratewka-Kos, E., Shafai, R., Kennedy, T.D., Pyne, C., Munro, J.R., Vaughan, T., Walters, T., Altomare, F. (1991). Homologies between members of the germin family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germ proteins and certain *Physarum* spherulins, *Journal Biology Chemistry*, 266:10461-10469.
- Langyintuo, A., Lowenberg-DeBoer, J., Faye, M., Lambert, D., Ibro, G., Moussa, B., Kergna, A., Kushwaha, S., Musa, S., Ntougam, G. (2003). Cowpea supply and demand in West and Central Africa. *Field Crops Research*, 82:215-231.
- Lawrence, J.F., Britton, E.B. (1991). Coleoptera. In: CSIRO ed. The Insects of Australia. 2.ed. Victoria, Melbourne University, 2:543-683.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Bechaut, M., Blagrove, R.J., Colman, P.M. (1994). Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *Journal of Molecular Biology*, 238:748-776.
- Lazzari, F.A. (1997). Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2 ed. Ed. autor, Curitiba, 140p.
- Lima, A.M.C. (1952-56). Insetos do Brasil, Coleópteros. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Agronomia, vols. 7-10.
- Locke, M., Collins, J.V. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *Journal of Cell Biology*, 36:453-483.
- Macedo, M.L.R., Andrade, L.B.S, Moraes, R.A., Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105(1):89-94.
- Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Xavier-Filho J. (1995). Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible and resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28:183-190.

- Maréchal, R., Mascherpa, J.M., Stainier, F. (1978). Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*, 28:1-273.
- Mbata, G.N. (1993). Evaluation of susceptibility of varieties of cowpea to *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus subinnotatus* (Pic.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 29:207-213.
- Meik, J., Dobie, P. (1986). The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 42:151-158.
- Messina, F.J., Renwick, J.A.A. (1985). Resistance to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in selected cowpea lines. *Environmental Entomology*, 14:868-872.
- Morton, R.E., Evans, T.A. (1992). Modifications of the bicinchoninic acid proteins assay to eliminate lipid interference in determining protein content. *Analytical Biochemistry*, 204:332-334.
- Mota, A.C., DaMatta, R.A., Lima Filho, M., Silva, C.P., Xavier-Filho J. (2003). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *Journal of Insect Physiology*, 49:873-880.
- Müntz, K., Horstmann, C., Schlesier, B. (1986). Seed proteins and their genetics in *Vicia faba* (L.). *Zentralbl*, 105:107-120.
- Ng, N.Q., Maréchal, R. (1985). Cowpea taxonomy, origin germ plasm. In: Sinch, S.R., Rachie, K.O., (Eds.). Cowpea research, production and utilization. Chichester, John Wiley, p. 11-21.
- Ng, J.D., Ko, T.P., McPherson, A. (1993). The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiology*, 101:729-744.
- Okamoto, C.T. (1998). Endocytosis and transcytosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29:215-228.
- Oliveira, A.M., Pacova, B.E., Sudo, S., Rocha, A.C.M., Barcellos, D.F. (1979). Incidência de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) e *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) (Coleoptera, Bruchidae) em diversos cultivares de feijão armazenado. *Annals of the Entomological Society*, 8:47-55.

- Padulosi, S., Ng N.Q. (1997). Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh, B.B., Mohan, R., Dashiell, K.E. and Jackai, L.E.N. (Eds.). *Advances in Cowpea Research*. Tsukuba, IITA JIRCAS. p. 1-12.
- Paes, N.S., Gerhardt, I.R., Coutinho, M.V., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., Chrispeels, M.J., Grossi-de-Sá, M.F. (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of the bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *Journal of Insect Physiology*, 46:393-402.
- Paes, E.V., Uchôa A.F., Silva, C.P., Fernandes, K.V.S., Oliveira, A.E.A., Xavier-Filho, J. (2008). Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129:11-17.
- Pereira, P.R.V.S., Almeida, L.M. (2001). Chaves para identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18(1):271-283.
- Pimbert, M., Pierre, D. (1983). Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus*. *Ecological Entomology*, 8:87-94.
- Pimbert, M. (1985). A model of host plant change of *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Bruchidae) in a traditional bean cropping system in Costa Rica. *Biological Agriculture and Horticulture*, 3:39-54.
- Price, G.M. (1969). Protein synthesis and nucleic acid metabolism in the fat body of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Insect Physiology*, 15:931-944.
- Quintela, E.D., Neves, B.P. das, Quinderé, M.A.W., Roberts, D.W. (1991). Principais plagas del *caupi* en el Brasil. Goiânia: Embrapa-Cnpaf. (Embrapa-Cnpaf. Documentos, 35).
- Rees, D. (2004). *Insects of stored products*. CSIRO Publishing, Canberra, Australia.
- Sahoo, L., Sugla, T., Jaiwal, P.K. (2003). In vitro regeneration and transformation of cowpea, mungbean, urdbean and azukibean. In: *Biotechnology for the improvement of legumes Part-B*, pp. 89-120, Kluwer, Netherlands.
- Sales, M.P., Macedo, M.L.R., Xavier-Filho, J. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103B: 945-950.

- Sales M.P., Pereira S.T., Gomes V.M., Fernandes K.V.S., Pimenta P.P.P., Grossi-de-Sá M.F., Xavier-Filho J. (1996). Localization of vicilins (7S) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds in structures from larvae midgut of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. In Abstracts of XXV Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, São Paulo, Brazil, p. 30.
- Sales M.P., Gerhardt I.R., Grossi-de-Sá M.F., Xavier-Filho J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*, 124:515-522.
- Sales, M.P., Pimenta, P.P., Paes, N.S., Grossi-de-sá, M.F., Xavier-Filho, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:27-34.
- Sales, M.P., Andrade, L.B.S., Ary, M.B., Miranda, M.R.A., Teixeira, F.M., Oliveira, A.S., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (2005). Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace-10) *Vigna unguiculata* seeds: relationship with trypsin inhibitor and vicilin excretion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 142:422-426.
- Sammour, R.H., Gatehouse, J.A., Gilroy, J., Boulter, D. (1984). The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformes*) to pea vicilin and its separation from α -mannosidase. *Planta*, 161:61-70.
- Schlereth, A., Standhardt, D., Mock, H.P., Muntz, K. (2001). Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in rotein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta*, 212:718-727.
- Schoonhoven A.V., Cardona, C., Valor, J. (1983). Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in noncultivated common bean accessions. *Journal of Economic Entomology*, 76:1255-1259.
- Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7:945-956.
- Shutov, A.D., Karhovskaya, I.A., Braun, H., Bäumlein, H., Muntz, K. (1995). Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *Journal of Molecular Evolution*, 41:1057-1069.

- Shutov, A.D., Blattner, F.R., Bäumlein, H. (1999). Evolution of structurally conserved protein module from *Archaea* to plants. *Trends in Genetics*, 15:348-349.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Isejima, E.M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D. (2001). Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:41-50.
- Singh, S.R. (1978). Pests of grain legumes and their control in Nigeria. In: Singh, S.R., Van Emden, H.F., Taylor, T.A. (Eds.), Resistance to Pests of Cowpeas in Nigeria. *Academic Press*, New York, 267-297.
- Singh, S.R., Rachie, K.O. (1985). Cowpea research, production and utilization. John Wiley and Sons Ltd. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 460p.
- Singh, B.B., Singh, S.R. (1990-1992). Breeding for bruchid resistance in cowpea. *IITA Research*, 5, 1-5.
- Singh, B.B., Ehlers, J.D., Sharma, B., Freire Filho, F.R. (2000). Recent progress in cowpea breeding. In: Proceedings of world cowpea conference III, 4-7. IITA, Ibadan, Nigeria, pp. 22-40.
- Smith, D.S. (1968). Insect cells: structure and function. Edinburgh, UK: Oliver and Boyd, 223-233.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85.
- Smith, P.L., Wall, D.A., Gochoco, C.H., Wilson, G. (1992). Routes of delivery: case studies: oral absorption of peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8:253-290.
- Snodgrass, R.E. (1956). Anatomy of the honey bee. Comstock, New York, 334p.
- Southgate, B.J. (1979). Biology of the bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 24(1):449-473.
- Stanley, D.W., Bedick, J.C. (1997). Home Page. Entomology 401/80. Insect Physiology 311, Plant Industry Bldg (<http://entomology.unl.edu/ent801/ent801home.html>).
- Steele, W.M., Mehra, K.L. (1980). Structure, evolution and adaptation to farming system and environment in *Vigna*. In: Summerfield, D.R., Bunting, A.H. (Eds.). Advances in legume science. *England Royal Botanic Gardens*, 459-468p.

- Sugimura, M., Hirayama, C., Nakamura, M. (2001). Selective transport of the mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 47:1133-1138.
- Swaan, P.W. (1998). Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharmaceutical Research*, 15:826-834.
- Tarver, M.R., Shade, R.E., Shukle, R.H., Moar, W.J., Muir, W.M., Murdock, L.M., Pittendrigh, B.R. (2007). Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). *Pest Management Science*, 63:440-446.
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, G. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:4330-4335.
- Trung, N.P., Fitches, E., Gatehouse, J.A. (2006). A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnology*, 6:18.
- Tuma, P.L., Hubbard A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiology Review*, 83:871-932.
- Uchôa, A.F., DaMatta, R.A., Retamal, C.A., Albuquerque-Cunha, J.M., Souza, S.M., Samuels, R.I., Silva, C.P., Xavier-Filho, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal Insect Physiology*, 52(2):169-78.
- Verdecourt, B. (1970). Studies in the leguminosae – Papilionoidea for the flora of tropical East Africa. IV. *Kew Bulletin*, 24:597-569p.
- Verzár, F., McDougall, E.J. (1936). Absorption from the Intestine. London, Longmans.
- Vinson, S.B., Iwantsch G.F. (1980). Host suitability for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 25:397-419.
- Wigglesworth, V.B. (1943). The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 131, 313-339.
- Wigglesworth, V.B. (1972). Circulatory system and associated tissues. In: *The principles of insect physiology*, 7 ed, London. Published by Chapman and Hall, 411-475p.

- Wigglesworth, V.B. (1974). The circulatory system and associated tissues. In: *Insect Physiology*, Seventh Edition, Chapman and Hall, London, 33-45p.
- Williams, J.O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigéria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 26:5-10.
- Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P., Ary, M.B., Silva, C.P., Carvalho, M.M.M., Macedo, M.L.R., Lemos, F.J.A., Grant, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea *Vigna unguiculata* and resistance to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 37:1139-1145.
- Xavier-Filho, J. (1991). The resistance of seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, (II), 75-77.
- Xavier-filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra insetos. Organização dos Estados Americanos. OEA, 1-31.
- Yunes, A.N.A., Andrade, M.T., Sales, M.P., Morais, R.A., Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M., Xavier-Filho, J. (1998). Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *L. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(1),111-116.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)