



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

CLEYSYVAN DE SOUSA MACEDO

EFEITO INSETICIDA DE VICILINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO PARA MOSCAS DAS FRUTAS (*Ceratitis capitata*)

NATAL
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CLEYSYVAN DE SOUSA MACEDO

**EFEITO INSETICIDA DE VICILINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO PARA MOSCAS DAS FRUTAS
(*Ceratitis capitata*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales

NATAL
2010

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Macedo, Cleysyvan de Sousa.

Efeito inseticida de vicilinas isoladas de sementes de *Erythrina velutina* em condições de semi-campo para moscas-das-frutas (*Ceratitis capitata*)/ Cleysyvan de Sousa Macedo. – Natal, RN, 2010.

72 f.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Vicilinas – Dissertação 2. *Erythrina velutina* – 3. Proteínas de ligação a quitina – Dissertação. I. Sales, Maurício Pereira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 632.9

CLEYSYVAN DE SOUSA MACEDO

EFEITO INSETICIDA DE VICILINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO PARA MOSCAS DAS FRUTAS (*Ceratitis capitata*)

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

Aprovado em, 26 de fevereiro de 2010.

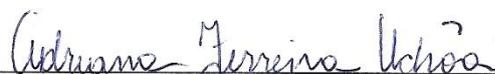
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador



Prof.ª Dr.ª Lúcia Betânia da Silva Andrade
Departamento de Biologia - UVA
1º Examinador



Prof.ª Dr.ª Adriana Ferreira Uchôa
Departamento de Biologia Celular e Genética – UFRN
2º Examinador

Dedico este trabalho aos meus pais, a meus avós, a minha noiva e aos meus amigos que continuam sempre presentes em todos os momentos de minha vida. A vocês mais uma vitória, se DEUS quiser, de muitas que ainda estão por vir.

Dedico também aos que me apoiaram mesmo não estando mais entre nós, Vovô Bubu, Titio Sizinho, Tia Nenem, Caquinha e Seu Tarcísio (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu sustento, por ter reerguido meus ombros, por ter me dado forças quando as minhas pernas já não agüentavam e a minha cabeça não sabia que rumo tomar. Agradeço por Ele, ter me mostrado várias luzes nessa reta final e por ter colocado ao meu lado anjos que chamo de amigos.

Agradeço aos meus pais, **Cleide e Ulisvan**, por custearem meus estudos, por compreenderem minha ausência e por mesmo assim permanecerem ao meu lado, sempre prontos para me receber de volta.

A meus **tios, primos e avós**, pela presença quase constante e paciência pela minha ausência.

Ao amor da minha vida, **Maria Emília**, pelos agradáveis anos de convívio, pela paciência, pela determinação, por sempre me dedicar seu tempo, seu amor, a sua amizade, por estar sempre disposta a me ajudar, mesmo quando eu não queria ser ajudado. Obrigado **Mila**, por ser uma mulher, amiga e uma companheira sem igual. A você, o meu amor!

A toda **família de Mila**, principalmente aos seus pais **Tio Tico e Tia Taís**, que me abrigaram por muitos dias durante esses anos, por todo apoio e pelo companheirismo durante todo esse período que, como eles sabem não foi fácil. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. **Maurício Pereira de Sales**, obrigado por dividir comigo seu vasto conhecimento ao longo de toda essa caminhada, por orientar essa dissertação e por estar sempre por perto nos momentos difíceis.

Ao Professor Dr. **Elizeu Antunes dos Santos**, meu muito obrigado por compreender minhas dificuldades, por sempre surgir com soluções e fazer desaparecer a maioria dos problemas que chegam até ele.

Ao Professor Dr. **Francisco Pepino**, pela parceria, pela colaboração, pela preocupação e por permitir a utilização do seu laboratório para realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. **Aldo Malavasi** e a **todos os funcionários da Biofábrica MOSCAMED** pelo fornecimento das moscas para realização dos experimentos.

Agradeço a Dra. **Adeliana Oliveira**, por toda contribuição científica ao longo de todos esses anos de convívio e pelos bons momentos divididos extra-laboratoriais .

Aos amigos **Ticiane Amorim** e **Leonardo Pepino**, inicialmente amigos de laboratório, hoje amigos de uma vida e para uma vida toda. Obrigado por me dedicarem tempo, conhecimento e carinho. Essa dissertação é nossa e mesmo que eu não seja tão bom com as palavras sempre haverá dentro de mim a doce e viva lembrança do que vocês fizeram por mim...

A Professora Dra. **Adriana Uchôa**, pelas observações sempre tão valiosas e pertinentes.

Aos **amigos do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas**, obrigado pelo prazeroso e alegre convívio durante essa caminhada.

Aos amigos da minha turma mestrado, **Sheyla Varela, Jailma Almeida, Leandro Silva, Katrine Cavalcante** e **Lígia Siqueira**, meu muito obrigado pela prazerosa convivência durante o curso.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, **Dilma Lima, Fernanda Wanderley, Roberto Dimenstein, Carlos Bola, Edda Lisboa, Hugo Alexandre, Luís Diz, Suely Chavante, João Felipe, Elizeu Antunes, Jacira Andrade, Luciana Guimarães, Julianna Andrade, João Paulo e Luciana da Mata**.

Aos demais **amigos do Departamento de Bioquímica** meu muito obrigado pelas conversas na ponte.

A equipe do **Laboratório de Moscas-das-frutas**, nas pessoas de **Raquel** e **Carmem**, pela prontidão e ajuda dispensada ao longo dos experimentos.

A minha amiga **Virgínia Penélope**, por sua amizade, por sempre está disposta a me dar um abraço e uma palavra de acalanto. E que traz no corpo a frase que melhor a define: “Onde houver tristeza que eu leve alegria”.

A **Dona Mariquinha, Galego** e **companhia** por sempre preencherem o vazio que sempre se instalava em mim, todos os dias, durante toda a minha graduação e pós-graduação.

As agências financiadoras: **CAPES** e **CNPq** pelos projetos apoiados e bolsas concedidas.

Enfim, obrigado **a todos** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Se você encontrar um caminho sem
obstáculos, ele provavelmente não leva a
lugar nenhum.**

(Frank Clark)

RESUMO

Vicilinas ligantes a quitina de sementes de *Erythrina velutina*, *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus vulgaris* foram isoladas através de procedimento que consistiu de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de afinidade em coluna de quitina. O efeito dessas vicilinas sobre fêmeas adultas de *Ceratitis capitata* foi examinada por bioensaios em condições de laboratório e por bioensaios em condições de semi-campo. O mecanismo de ação dessas vicilinas foi determinado por um ensaio de digestibilidade *in vivo* e pela propriedade de ligação a uma matriz de quitina. Entre as vicilinas testadas, a vicilina de *E. velutina* foi a única letal, causando mortalidade de 100% quando adicionada à dieta das moscas das frutas adultas na concentração de 10% (p/p). Este efeito inseticida da vicilina de *E. velutina* foi também testado em condições de semi-campo, onde concentrações de 10 % e 15% (p/p) de vicilina adicionada à dieta foram letais para fêmeas adultas de *C. capitata*. Esse efeito deletério das proteínas ligantes à quitina não foi associado somente à propriedade de ligação à quitina, visto que as outras vicilinas, além da lectina de gérmen de trigo (WGA) foram tóxicas quando adicionadas à dieta das moscas das frutas. Entretanto, a resistência/susceptibilidade dessas proteínas aos processos digestórios desses insetos poderia explicar os diferentes efeitos observados. Das proteínas ligantes à quitina, apenas aquelas refratárias à ação das enzimas digestivas nos processos digestórios teve ação inseticida. Esses resultados mostraram que vicilina de *E. velutina* é um bioinseticida com potencial de uso nos programas de controle de pragas diminuindo a população de moscas das frutas no campo.

Palavras-chave: Vicilinas. *Erythrina velutina*. *Ceratitis capitata*. semi-campo. Proteínas de ligação a quitina.

ABSTRACT

Chitin-binding vicilins from legume seeds (*Erythrina velutina*, *Canavalia ensiformes* and *Phaseolus vulgaris*) were isolated by ammonium sulfate followed by affinity chromatography on a chitin column. Effect of these vicilins on female adults of *Ceratitis capitata* was examined by bioassay and in a semi-field assay model. Mechanism of action of the vicilins was determined by *in vivo* digestibility and chitin affinity. Among the tested vicilins, *E. velutina* when added to diet caused strong effect on mortality at 10% dose. This insecticidal property was tested in a semi-field assay which showed the same effect observed in laboratory conditions, where doses of 10% and 15% were lethal to female adults of *C. capitata*. These deleterious effects were not only associated to the binding to chitin structures present in peritrophic membrane, but principally to its low digestibility in the *C. capitata* digestive tract. This fact was confirmed because chitin binding proteins as WGA and the other tested vicilins were not toxic to female adults of *C. capitata* due susceptibility of these proteins to digestive enzymes of the insects. By other side EvV was more resistant to digestive enzymes, causing deleterious effects on female adults of *C. capitata*. These results showed that EvV may be part of the pest management programs or an alternative in plant improvement program in the population control of this fructiculture pest.

Keywords: Vicilins. *Erythrina velutina*. *Ceratitis capitata*. Semi-field test. Chitin binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de Moscas-das-Frutas	18
Figura 2	<i>Ceratitis capitata</i>	21
Figura 3	Sementes de Mulungu (<i>Erythrina velutina</i>)	30
Figura 4	Sementes de leguminosas	33
Figura 5	Gaiola (PET) de bioensaio laboratorial para insetos adultos	40
Figura 6	Gaiola de bioensaio semi-campo	42
Figura 7	Perfil de eluição de EvV em cromatografia de afinidade em quitina ..	44
Figura 8	Perfil de eluição de CeV em cromatografia de afinidade em quitina ..	45
Figura 9	Perfil de eluição de PvV em cromatografia de afinidade em quitina ..	45
Figura 10	Perfil de eluição de WGA em cromatografia de afinidade em quitina.	46
Figura 11	Efeito de EvV sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> em laboratório	48
Figura 12	Efeito de CeV sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> em laboratório	48
Figura 13	Efeito de PvV sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> em laboratório	49
Figura 14	Efeito de WGA sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> em laboratório	49
Figura 15	Efeito de BSA (controle) sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> em laboratório	50
Figura 16	Efeito de EvV a 5% sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> no sistema semi-campo	51
Figura 17	Efeito de EvV a 10% sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> no sistema semi-campo	51
Figura 18	Efeito de EvV a 15% sobre a mortalidade de insetos adultos de <i>C. capitata</i> no sistema semi-campo	52
Figura 19	Eletroforese de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) da digestibilidade <i>in vivo</i> das vicilinas de CeV, PvV, EvV e WGA	53

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Ensaio para detecção de proteínas de defesa em vicilinas	46
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Biochemical Oxygen Demand (câmara de criação)
BÓRAX	Tampão tetraborato de sódio
BSA	Albumina de soro bovino
CeV	Vicilina de <i>Canavalia ensiformis</i>
DCR	Domínio reconhecedor de carboidratos
EB	Extrato bruto
EvV	Vicilina de <i>Erythrina velutina</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
HEMONORTE	Hemocentro do Rio Grande do Norte
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MIP	Manejo Integrado de Pragas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PIB	Produto Interno Bruto
PvV	Vicilina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
UH	Unidades de hemaglutinação
WGA	Lectina de Gérmen de Trigo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	FRUTICULTURA NO BRASIL	16
1.2	MOSCAS-DAS-FRUTAS	18
1.2.1	<i>Ceratitis capitata</i>	20
1.3	CONTROLE DE PRAGAS	22
1.4	SISTEMA DIGESTÓRIO DOS INSETOS	24
1.5	MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS	26
1.6	VICILINAS	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAIS	32
3.1	MOSCA DAS FRUTAS – <i>Ceratitis capitata</i>	32
3.2	SEMENTES DE LEGUMINOSAS	33
3.3	ERITRÓCITOS HUMANOS	33
3.4	REAGENTES	34
3.5	EQUIPAMENTOS	34
4	MÉTODOS	35
4.1	PURIFICAÇÃO DE VICILINAS DAS SEMENTES DE LEGUMINOSAS .	35
4.1.1	Preparo de Farinha de Sementes de leguminosas	35
4.1.2	Preparo do Extrato Bruto das Sementes	35
4.1.3	Fracionamento com Sulfato de Amônio	35
4.1.4	Obtenção da fração rica em vicilinas	36
4.1.5	Cromatografias de Afinidade de Vicilinas de Sementes	36
4.1.6	Dosagens de proteínas	37
4.1.7	Detecção de proteínas de defesa de plantas	37
4.1.7.1	Detecção de inibidores de proteinases serínicas do tipo tripsina ...	37
4.1.7.2	Detecção de Lectinas	38
4.1.8	Eletroforese em gel de poli-acrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE) de vicilinas	39

4.2	BIOENSAIOS – ATIVIDADE INSETICIDA DE VICILINAS	40
4.2.1	Bioensaios com insetos adultos de <i>C. capitata</i> em condições de laboratório	40
4.2.2	Bioensaio em semi-campo para insetos adultos de <i>C. capitata</i>	41
4.3	DIGESTIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DAS VICILINAS POR <i>C. CAPITATA</i>	43
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	ISOLAMENTO DE VICILINAS DAS SEMENTES DE LEGUMINOSAS	44
5.1.1	Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina	44
5.1.2	Detecção de proteínas de defesa de plantas	46
5.2	BIOENSAIOS	47
5.2.1	Teste de atividade inseticida por bioensaios para insetos adultos de <i>C. capitata</i> em condições de laboratório	47
5.2.2	Teste de atividade inseticida por bioensaios em sistema semi-campo para insetos adultos de <i>C. capitata</i>	50
5.3	DIGESTIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DAS VICILINAS POR <i>C. CAPITATA</i>	53
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 FRUTICULTURA NO BRASIL

As frutas são alimentos essenciais para uma dieta balanceada e saudável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Elas são consideradas, junto com as hortaliças, as principais e mais baratas fontes de vitaminas e minerais, e ainda, são ricas em fibras, desempenhando um papel importante na prevenção contra deficiências desses micronutrientes e promovendo o funcionamento saudável do intestino (NANDI; BHATTACHARJEE, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) recomendam o consumo mínimo de 400 g de frutas e verduras por dia para a prevenção de doenças crônicas como cardiopatias, câncer, diabetes tipo 2 e obesidade (DE CHAVEZ; CHAVEZ, 1998; HUNG et al., 2004; RIBOLI; NORAT, 2003). Segundo o World Health Organization (2002) estima-se que mais de 2,6 milhões de mortes a cada ano poderiam ser evitadas se o consumo de frutas e hortaliças fosse aumentado. De acordo com a FAO o mercado mundial de frutas frescas esteve em plena ascensão na última década (FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION, 2007). A produção mundial de frutas frescas cresceu cerca de 2,5% ao ano, alcançando um volume de 520 milhões de toneladas em 2005 contra 415 milhões de toneladas em 1995 (FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION, 2007). Este aumento está associado a uma maior conscientização da população para os efeitos benéficos do consumo de frutas na saúde humana, e das melhorias na logística de produção e comercialização dessas frutas e de produtos relacionados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003a, 2003b).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia (NANDI; BHATTACHARJEE, 2005), com uma produção que supera os 39 milhões de toneladas, sendo que destas, aproximadamente, 20 milhões foram destinadas aos mercados de frutas frescas. Não obstante essa colocação, o Brasil exporta pouco mais de 1% da sua produção de frutas *in natura*, ocupando o 20º lugar entre os países exportadores (SECRETARIA DE COMERCIO EXTERIOR,

2007). De 1998 a 2005 o país aumentou suas exportações em mais de 200%, passando de US\$ 120 milhões para US\$ 440 milhões obtidos na venda de frutas para o exterior (PEREIRA, 2006). Os principais destinos das frutas brasileiras são os países europeus, as Américas do Norte e do Sul, o Oriente Médio, além de perspectivas de vendas para o mercado asiático (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2005).

A fruticultura hoje é um dos principais segmentos da agricultura brasileira, respondendo por 25% do valor da produção agrícola nacional (LACERDA; LACERDA; ASSIS, 2004). A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,9 milhões de hectares, gera seis milhões de empregos diretos, ou seja, 27% do total da mão-de-obra agrícola ocupada no país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005). O valor bruto da produção de frutas atingiu em 2005 cerca de 13,5 bilhões de reais, 14,1% do valor da produção agrícola brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

O comércio internacional de produtos alimentares é fortemente condicionado por vários mecanismos de regulação fitossanitária (FILHO; ORMOND; PAULA, 1999). Preocupados com possíveis efeitos sobre consumidores e, especialmente, sobre suas regiões produtoras, quase todos os países impõem restrições ao trânsito de alimentos (FILHO; ORMOND; PAULA, 1999; SILVA, 2000). No caso de produtos frescos, a preocupação é redobrada, pois um lote infectado pode anular esforços de erradicação de pragas ou doenças que levaram anos e custaram milhões de dólares. Nota-se que os países com regras e instituições de controle de qualidade mais rigorosas são justamente os grandes importadores: Estados Unidos, União Européia e Japão, o que torna extremamente seletivo o acesso de novos exportadores aos fluxos do comércio internacional de frutas (FILHO; ORMOND; PAULA, 1999). Para o Brasil, as moscas-das-frutas ocupam uma posição de destaque entre as maiores pragas da fruticultura brasileira (DUARTE; MALAVASI, 2000), impedindo que um maior número de agricultores possa exportar seus produtos para os grandes mercados.

1.2 MOSCAS-DAS-FRUTAS

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são insetos pragas que atacam uma grande variedade de espécies vegetais, podendo infestar flores, ramos, sementes e frutos, no entanto, os danos causados em frutos representam os maiores prejuízos para a fruticultura (DUARTE; MALAVASI, 2000; LIMA, 2001; NISHIDA, 1980). Os tefritídeos possuem ciclo de vida relativamente curto, porém apresentam metamorfose completa (holometabólicos). O desenvolvimento larval, em três instares, dá-se no interior das frutas onde a larva cresce alimentando-se da polpa e abrindo galerias, posteriormente, elas saem das frutas para empupar no solo. Após algum tempo, que varia para cada espécie, emergem os adultos, que recomeçam o ciclo (Figura 1) (DUARTE; MALAVASI, 2000; MORGANTE, 1991; SALLES, 2000a).

Os danos causados pelas moscas-das-frutas podem ser diretos, através da oviposição nos frutos e da alimentação nas fases larvais, ou indiretos, por proporcionar a invasão dos tecidos vegetais por microorganismos, tornando-os impróprios para o consumo *in natura*, e para sua utilização na indústria alimentícia (DUARTE; MALAVASI, 2000).

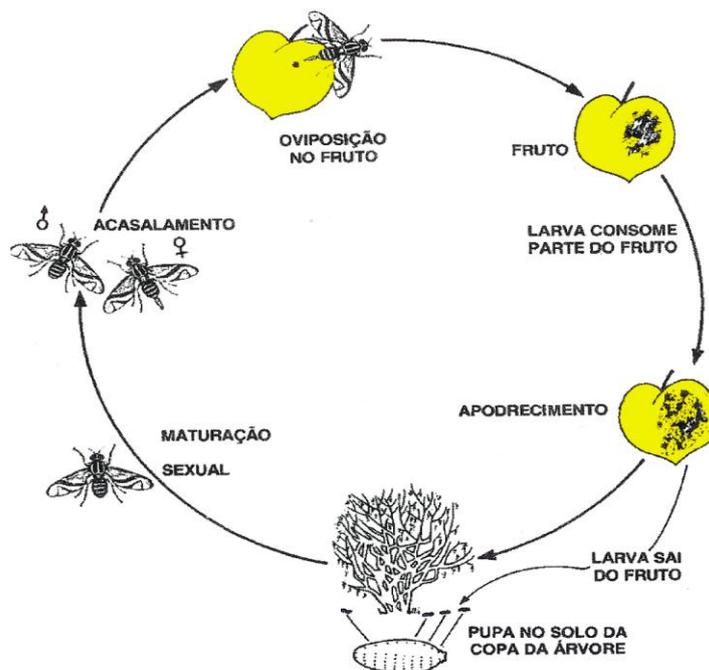


Figura 1: Ciclo de vida de Moscas-das-Frutas.
Fonte: Salles (2000).

A família Tephritidae apresenta ampla distribuição geográfica, com predominância na região Neotropical, apresentando 4.352 espécies agrupadas em 481 gêneros (NORRBOM, 2004), dos quais somente cinco são de importância econômica: *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (White; Elson-Harris). No gênero *Toxotrypana*, a única espécie de importância econômica, *T. curvicauda* (mosca-da-papaia), não ocorre no Brasil. O gênero *Bactrocera* está representado por uma única espécie no Brasil: *B. carambolae* (mosca-da-carambola), recentemente introduzida e restrita ao Oiapoque (AP) (ZUCCHI, 2000). As quatro espécies de *Rhagoletis* registradas no Brasil têm pouca importância agrícola, pois são referidas como pragas esporádicas na região Sul (ZUCCHI, 2000). O gênero *Anastrepha* é representado no Brasil por noventa e cinco espécies (URAMOTO, 2007). O Gênero *Ceratitis*, de origem sub-Saariana, é um dos mais conhecidos em todo o mundo por causa da notoriedade de uma de suas espécies, a mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata*. Mais de 100 espécies de *Ceratitis* já foram descritas e estão limitadas ao continente africano, seis das quais são pragas, atacando uma enorme variedade de plantas (CAREY, 1996). A única espécie do gênero no Brasil é a *C. capitata*, que juntamente com sete espécies de *Anastrepha* — *A. fraterculus* (Wied), *A. sororcula* (Zucchi), *A. zenildae* (Zucchi), *A. striata* (Schiner), *A. pseudoparallela* (Loew), *A. grandis* (Macquart) e *A. obliqua* (Macquart) —, representam as moscas-das-frutas mais importantes do ponto de vista econômico (ZUCCHI, 2000).

A grande variedade de hospedeiros infestados confirma as observações de Bateman (1976), que considera as espécies tropicais de “moscas-das-frutas” como tendo alta capacidade de colonização. Elas ocorrem em grande variedade de hospedeiros em regiões ecológicas bastante diversas. A medida do grau de infestação mostrou que em hospedeiros nativos, a frequência de *Anastrepha ssp.* é maior que a de *C. capitata*, invertendo-se em hospedeiros introduzidos (MALAVASI, 1977). Apesar desta preferência, já existe adaptação de *C. capitata* às frutas nativas e de *Anastrepha ssp.* aos hospedeiros introduzidos (MALAVASI; MORGANTE, 1980). A expansão de hospedeiros nas moscas-das-frutas pode ser facilitada por um comportamento de oviposição de baixa discriminação e habilidade das larvas para sobreviverem e se desenvolverem nos novos hospedeiros (FLETCHER; PROKOPY, 1991; KRAINACKER; CAREY; VARGAS, 1987).

Em muitas partes do mundo, as perdas causadas em regiões infestadas por moscas-das-frutas chegam a 100% da produção (CAREY; DOWELL, 1989; NISHIDA; BESS; OTA, 1957). Devido à sua importância econômica mundial, o comércio internacional de frutas frescas impõe normas que visam impedir a introdução de espécies que ocorrem no país exportador para o país importador, por isso um dos maiores obstáculos à produção e livre comercialização de frutas frescas entre o Brasil e o resto do mundo é a presença de moscas-das-frutas nas áreas de produção (DUARTE; MALAVASI, 2000). Tratamentos quarentenários são requeridos pelos Estados Unidos para o controle de moscas-das-frutas que infestam manga (*Mangifera indica*) e goiaba (*Psidium guajava*) no Brasil e no Peru (NASCIMENTO et al., 1992; SHARP; PICHOMARTINEZ, 1990). A adequação a essas normas e exigências dos mercados, a busca pela segurança alimentar e quarentenária, exigem rápidas mudanças nas técnicas de controle utilizadas na fruticultura brasileira (CARVALHO, 2005).

1.2.1 *Ceratitis capitata*

A mosca do mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied) é a única espécie do gênero *Ceratitis* no Brasil (ZUCCHI, 1988) (Figura 2). Essa espécie é considerada a mais cosmopolita e invasora dentre todos os tefritídeos. É a praga mais destrutiva da fruticultura mundial, devido à natureza do dano causado, ao grande número de gerações por ano e à sua grande adaptabilidade a vários tipos de hospedeiros, sendo capaz de infestar mais de 350 espécies vegetais, inclusive aquelas de importância econômica (METCALF, 1995; WEEMS, 1981). O provável centro de origem dessa espécie é a África Equatorial, mas um processo global de invasão tem ocorrido desde o século passado. No Brasil, onde sua presença foi registrada no início do século XX (IHERING, 1901), ela é considerada uma das pragas de maior importância quarentenária, ou seja, precisa passar por um período de “quarentena” antes de entrar no país importador (MALAVASI; MORGANTE, 1980).

Devido aos danos causados por moscas-das-frutas, bilhões de dólares são perdidos anualmente, portanto vários programas foram criados para controlar e

erradicar esta praga. Cada vez mais inseticidas são utilizados como forma de proteção mesmo quando a população de moscas-das-frutas ainda não atingiu o nível de dano econômico, implicando em gastos e danos ao meio ambiente (DENT, 2000).

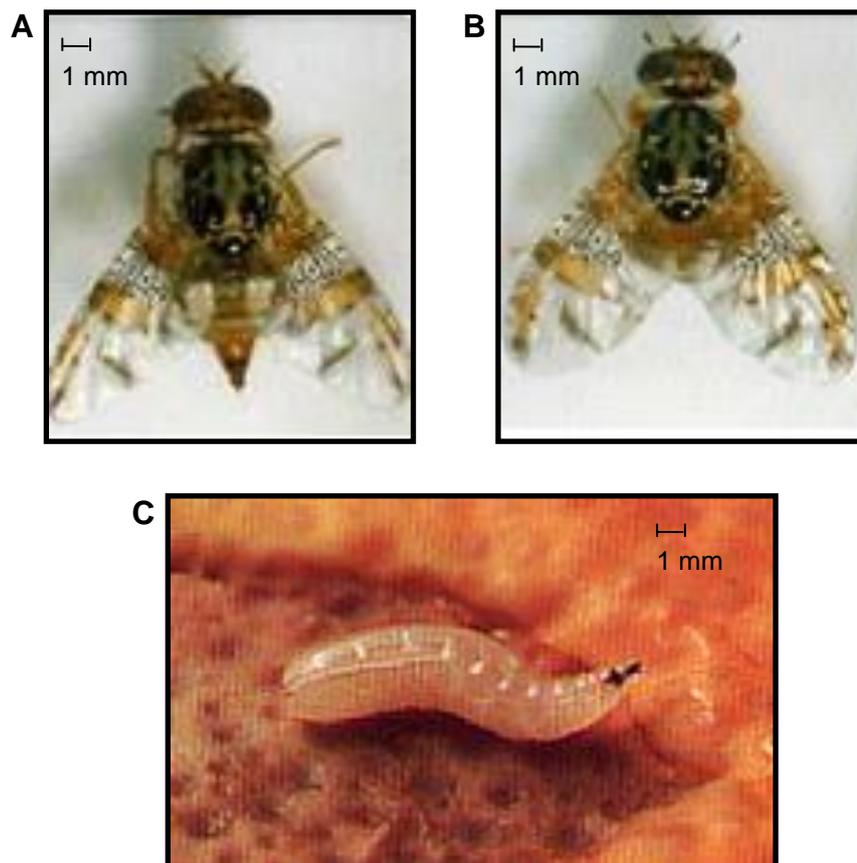


Figura 2: *Ceratitits capitata*. (A) Fêmea adulta. (B) Macho adulto. (C) Larva.

Fonte: (A) e (B) <http://www.cpatas.embrapa.br/imprensa/noticias/insetos-estereis-podem-dar-bons-frutos-no-negocio-agricola-da-manga> (18/01/2010). (C) Macedo (2005).

1.3 CONTROLE DE PRAGAS

O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações (para prevenir ou combater pragas), visando assegurar maior produtividade (CALDAS; SOUZA, 2000). Segundo Oerke et al. (1994) o ataque de insetos pragas consomem cerca de 14% da produção agrícola mundial. Atualmente a proteção da lavoura está baseada na utilização de agroquímicos, que em 2001 movimentou um mercado mundial de aproximadamente 32 bilhões de dólares, segundo a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (KIELY; DONALDSON; GRUBE, 2004). Porém, na ausência desse meio de combate às pragas, as perdas poderiam ser muito mais sérias (HILDER; BOULTER, 1999). Segundo Krattiger (1997) os danos causados na agricultura mundial sem o uso de pesticidas e outras estratégias de controle são estimados em 70% da produção agrícola, totalizando cerca de 400 bilhões de dólares por ano.

Os primeiros inseticidas realmente eficientes foram introduzidos no combate de pragas na metade do século XX, anteriormente, o controle de pragas era baseado na utilização de compostos inorgânicos como enxofre, arsênio, cianetos e boratos (CASIDA; QUISTAD, 1998), os quais apresentavam alta toxicidade e baixa especificidade, sendo tóxicos também para vertebrados (LOPEZ; FERNANDEZ-BOLANOS; GIL, 2005). A introdução dos inseticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos, todos químicos neurotóxicos, significou uma grande revolução na agricultura (ISHAAYA, 2003). Contudo, a utilização dos pesticidas constitui-se num dos mais importantes fatores de risco para o homem e para o meio ambiente (HAPEMAN et al., 2003; TILMAN et al., 2001). Apesar dos benefícios produtivos destes compostos, anualmente, 355 mil pessoas morrem em decorrência de envenenamento em todo o mundo, sendo 75% destes casos em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003c). Alguns pesticidas, dependendo da sua persistência e volatilidade, dispersam-se amplamente (GODDUHN; DUFFY, 2003; WILKENING, 2001). Cada vez mais, grandes quantidades de pesticida e seus metabólitos são detectados contaminando as águas superficiais e subterrâneas (FAVA et al., 2005; KOLPIN; SCHNOEBELN;

THURMAN, 2004; WORRALL; BESIEN, 2005), o solo (CRAVEN; HOY, 2005; SIVANESAN et al., 2004) e a atmosfera (DUBUS; HOLLIS; BROWN, 2000; DUYZER, 2003). Estes pesticidas bioacumulam ao longo de cadeias alimentares (KIDD et al., 1995), provocam impactos sobre a saúde humana e de outras espécies longe de seu local de uso/emprego até muitos anos depois de liberados (SAGIV et al., 2007; WOLKERS et al., 2006).

Em muitos países, como no Brasil, há ocorrências de casos concretos de fracassos no controle de pragas através do uso exclusivo de pesticidas, principalmente devido a problemas decorrentes da eliminação de inimigos naturais, do desenvolvimento ou do aumento da resistência e ressurgência de pragas secundárias.

O potencial acúmulo de resíduos de pesticidas no agrossistema e nos produtos vegetais causa uma crescente preocupação mundial. Além das exigências impostas pela lei, a não presença ou a não aceitação de resíduos tóxicos nos alimentos, está, a cada dia, sendo mais exigida pela sociedade (SALLES, 2000b). Devido aos aspectos ambientais negativos e a fim de superar a resistência de populações de insetos aos inseticidas neurotóxicos convencionais, a tendência nas pesquisas é a procura por pesticidas com diferentes mecanismos de ação e com baixa toxicidade para a saúde humana e para o meio ambiente (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998; GRAPOV, 1999).

Em meados de 1960 pesquisadores começaram a questionar o modelo de agricultura exclusivamente agroquímica, que com o passar do tempo provoca problemas ecológicos e economicamente insustentáveis (GEIER, 1966; KOGAN, 1998). Como consequência surgiu um novo conceito de controle de pragas visando a minimização de todos esses problemas. Este novo conceito recebeu inicialmente a denominação de Controle Integrado, evoluindo para o termo "Manejo Integrado de Pragas" (MIP) para designar o controle de insetos tendo como base a ecologia dos mesmos e envolvendo qualquer tipo de problema que limitasse a produção agrícola decorrente da competição interespecífica (patógenos, insetos, nematóides, plantas daninhas, etc.) (KOGAN, 1998). A prática do MIP foi descrita por Geier (1966) e baseia-se nos seguintes pontos: (1) como se deve modificar o sistema de vida de uma praga para reduzir a sua população a níveis toleráveis, ou seja, inferior ao nível de dano econômico; (2) aplicação do conhecimento biológico e da tecnologia

disponível para obter a modificação desejada (ecologia aplicada); e (3) uso de táticas no controle de pragas adequado à tecnologia existente, compatível com os aspectos qualitativos, econômicos e ambientais, ou seja, de aceitação econômica e social. O manejo integrado de moscas-das-frutas no Brasil utiliza basicamente a técnica do monitoramento de adultos com armadilhas, o uso de iscas tóxicas ou a pulverização de inseticida em cobertura (NASCIMENTO; CARVALHO, 2000). Havendo, portanto, uma necessidade por novos métodos alternativos eficazes de controle que mantenham a população das moscas em níveis seguros, e que possam ser associadas aos programas de manejo de pragas dentro do agronegócio.

Um dos principais objetivos de investigações básicas associadas ao manejo integrado de pragas é a perspectiva de entender e interferir nos processos vitais do inseto (genéticos – bioquímicos – morfofisiológicos), de modo que tal interferência possua escassa ou nenhuma influência sobre outros seres vivos, e ao mesmo tempo, possa servir como instrumento potencial para o controle de espécies prejudiciais (CRUZ; TAUFER; OLIVEIRA, 2000). Dentro desta perspectiva, o sistema digestório dos insetos é uma região importante de exposição destes ao meio ambiente. Dessa forma, estratégias que interfiram na bioquímica e na fisiologia desta região, visando à redução de absorção de nutrientes, seriam ferramentas potencialmente eficientes no manejo de pragas (SHEWRY; LUCAS, 1997).

1.4 SISTEMA DIGESTÓRIO DOS INSETOS

A habilidade dos insetos de se alimentar de praticamente todo tipo de matéria orgânica é o maior fator para o seu sucesso, capacitando-os para os mais diversos nichos ecológicos (WIGGLESWORTH, 1972). A grande variedade de alimentos que podem ser ingeridos pelos insetos é refletida na diversidade de estruturas das peças bucais bem como, na diversidade do trato digestório, com um alto grau de especialização que varia com o tipo particular de dieta (WIGGLESWORTH, 1972). Seu trato digestório é constituído por um tubo de células epiteliais que se estende da boca até o ânus (TERRA; FERREIRA, 1994; WIGGLESWORTH, 1972). Está dividido em três principais regiões baseado na origem embrionária e na sua fisiologia

em estomodeu (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeu (intestino posterior), onde o principal local de absorção e digestão é o intestino médio (TERRA; FERREIRA; BAKER, 1996; TERRA; FERREIRA, 1994; WIGGLESWORTH, 1972).

Os tratos digestório desses animais estão expostos a uma variedade de agentes nocivos de natureza química, física e biológica, necessitando de mecanismos para a sua proteção. Nos vertebrados, o muco é uma secreção que recobre e protege o epitélio intestinal, enquanto auxilia o processo de digestão. Nos insetos, entretanto, não se observa uma camada mucosa, propriamente dita, recobrando o trato digestório, em seu lugar, o intestino médio dos insetos é protegido por uma estrutura acelular e semipermeável denominada membrana peritrófica ou matriz peritrófica ou gel peritrófico (LEHANE, 1997; PETERS, 1992; TERRA, 2001). A membrana peritrófica é uma estrutura (WANG; GRANADOS, 1997), que difere do muco dos vertebrados pela incorporação de quitina, resultando em uma estrutura protéica reforçada por fibrilas de quitina (PETERS, 1992). É constituída principalmente por glicoproteínas e proteoglicanos (20-55%) e por quitina (3-40%) (KRAMER; HOPKINS; SCHAEFER, 1995; LEHANE, 1997) em uma organização que fornece semi-permeabilidade e elasticidade à estrutura (LEHANE, 1997). A quitina é um importante componente estrutural da membrana peritrófica, pois além de fornecer rigidez, serve também como sítio de ancoragem para proteínas como as peritrofinas (WANG; GRANADOS, 2001). A presença desta membrana define a formação de um espaço endoperitrófico, o qual contém o alimento ingerido; e o espaço ectoperitrófico correspondendo à região entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal.

A membrana peritrófica, em insetos, pode ocorrer em duas formas, definidas quanto ao seu sítio de síntese: tipo I e tipo II (PETERS, 1992; WIGGLESWORTH, 1972). A membrana peritrófica do tipo I em muitos insetos, como os hematófagos, é sintetizada por células epiteliais do intestino médio, sendo produzida em resposta a ingestão de alimento, que por descamação da superfície epitelial, dá origem a uma estrutura em forma de bolsa que recobre o alimento (LEHANE, 1997). O Tipo II de membrana peritrófica é produzida a partir de um pequeno órgão altamente especializado chamado de cárdia situado na região anterior do intestino médio. Este tipo de membrana peritrófica é constitutivamente produzida como um contínuo tubo

com estrutura altamente organizada. As mais bem caracterizadas membranas peritróficas do tipo II são de larvas de dípteros muscóides (PETERS, 1992; TELLAM; EISEMANN, 2000).

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

Diversos trabalhos demonstram que alteração na permeabilidade da membrana peritrófica pode causar a morte de insetos por desnutrição (EISEMANN et al., 1994; TELLAM; EISEMANN, 1998; WANG; GRANADOS, 2001). Esse efeito pode ser alcançado pela incorporação, na dieta destes insetos, de proteínas que tenham afinidade por quitina, como lectinas, anticorpos e vicilinas (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; HARPER; HOPKINS; CZAPLA, 1998; HOPKINS; HARPER, 2001; MACEDO et al., 2007; MOURA et al., 2007).

1.5 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

Em resposta a herbivoria excessiva dos insetos as plantas desenvolveram diversas estratégias de proteção e ou resistência. A resistência é o termo usado para descrever a capacidade das plantas em prevenir, restringir ou retardar a penetração de um predador no tecido hospedeiro (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; KOGAN, 1986). Essa resistência é baseada nos vários mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, durante a evolução (SCHULER et al., 1998). As defesas de plantas podem ser classificadas como físicas (espinhos, tricomas e tegumentos) ou químicas, se houver envolvimento de substâncias químicas nos mecanismos pelos quais elas se protegem. As defesas químicas, por sua vez, podem ser de natureza não protéica ou protéica (RYAN, 1990). Por outro lado, as defesas também podem ser agrupadas em duas categorias: defesas constitutivas,

se sua ação faz-se dentro do programa de desenvolvimento normal e contínuo da planta nos diferentes tecidos vegetais; ou induzidas quando estão envolvidas diretamente na resposta a infecção ou estímulos ambientais (CHESSIN; ZIPF, 1990). Essa resposta induzida pode resultar em efetivos mecanismos de resistência a doenças quando ela é expressa pela planta, sistemicamente. Neste caso, os agentes envolvidos induzem uma resposta do hospedeiro, não apenas em torno das partes atingidas, como também em partes da planta distantes da área onde ocorreu a injúria, sendo este processo denominado imunização sistêmica adquirida (DEAN; KUC, 1986; GOTTSTEIN; KUC, 1989). As defesas induzidas são mais importantes para as defesas de partes vegetativas das plantas, enquanto que as defesas constitutivas são mais importantes para as defesas das sementes (XAVIER-FILHO, 1993).

Diversas proteínas envolvidas no processo de defesa presentes em sementes de leguminosas foram isoladas, purificadas e caracterizadas. Entre elas estão enzimas, como quitinases (SANTOS et al., 2004) β -1,3 glucanases; inibidores de enzimas hidrolíticas, como inibidores de amilases (SAWADA; YANAGA; TASHIRO, 2006) e de proteinases (ARAUJO et al., 2005; GOMES et al., 2005b) e proteínas de reserva, como as arcelinas (MINNEY et al., 1990), vicilinas (MOURA, et al., 2007), lectinas (MORAES et al., 1996).

Muitas dessas proteínas de defesa podem ser divididas em dois principais grupos segundo a forma pelas quais podem causar efeitos tóxicos no processo de digestão dos insetos. No primeiro grupo, elas podem ser proteínas que inibem enzimas digestivas. Neste grupo estão os inibidores de α -amilases (FRANCO et al., 2000, 2005) e os inibidores de proteases (FRANCO et al., 2004; GATEHOUSE et al., 1999; GOMES, A. et al., 2005; GOMES, C. et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2003). Os efeitos tóxicos causados por estas proteínas são devidos à privação de nutrientes decorrido pela inibição seletiva de enzimas digestivas presentes no trato intestinal dos insetos (GATEHOUSE, et al., 1999; JONGSMA; BOLTER, 1997). No segundo grupo estão as proteínas que se ligam a quitina, como lectinas (DUTTA et al., 2005; GUPTA; BIRAH; RANI, 2005; MACEDO et al., 2007) e vicilinas (MACEDO et al., 1995; MOURA et al., 2007; SALES et al., 1996), e, portanto, capazes de se ligarem à membrana peritrófica interferindo na assimilação de nutrientes, e levando o inseto à morte (SALES et al., 1996).

Em estudos recentes de caracterização das enzimas proteolíticas em *C. capitata* foi verificado que estes insetos utilizam principalmente proteases alcalinas do tipo serínicas (SAN ANDRES; ORTEGO; CASTANERA, 2007; SILVA et al., 2006). Esta detecção motivou a utilização de inibidores de proteinases serínicas obtidos de sementes como promissores candidatos a bioinseticidas, atuando na inibição específica da digestão das proteínas. A utilização desses inibidores em sistema de dieta artificial afetou significativamente o desenvolvimento larval de *C. capitata*, porém, causou pouco efeito sobre a mortalidade das larvas (ARAUJO et al., 2005; GOMES, C. et al., 2005). Com relação ao efeito de proteínas que se ligam a estruturas presentes no trato digestório de insetos, muitos estudos comprovaram sua ação inseticida em dípteros (EISEMANN et al., 1994; TELLAM; EISEMANN, 1998). Contudo a potencial utilização destas proteínas no combate às moscas-das-frutas não foi testada.

1.6 VICILINAS

As vicilinas compreendem uma classe das proteínas de reserva muito bem conhecida, podendo constituir 70-80% do total das proteínas da semente. São proteínas triméricas de peso molecular entre 150 a 190 kDa, não formam pontes dissulfeto devido à ausência de resíduos de cisteína (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; PEDALINO et al., 1992). Para exemplificar, as subunidades da vicilina de ervilha são sintetizadas inicialmente como um grupo de polipeptídios de peso molecular entre 47 a 50 kDa, porém a proteólise pós-traducional e a glicosilação resultam em subunidades com pesos moleculares entre 12,5 a 33 kDa (GATEHOUSE; CROY; BOULTER, 1984). Esta característica pode também ser resultado da adição incompleta ou degradação parcial da ligação dos oligossacarídeos nas cadeias laterais dos peptídeos tornando difícil sua digestão por insetos (CHEE; JONES; SLIGHTOM, 1991; MACEDO et al., 1995). As subunidades são codificadas, na sua maioria, por 2 a 3 tipos de genes, com 3 a 4 cópias de cada tipo por genoma haplóide (BOWN; ELLIS; GATEHOUSE, 1988; GOLDBERG et al., 1981; HARADA; BARKER; GOLDBERG, 1989; SUN; SLIGHTOM; HALL, 1981;

TIERNEY et al., 1987). Observa-se que os genes de vicilinas de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Glycine max*, quando comparados, apresentam alta homologia (DOYLE et al., 1986). Cada gene tem 6 éxons e 5 íntrons (DOYLE et al., 1986; HIGGINS et al., 1988).

Em sementes de leguminosas, as vicilinas são proteínas multifuncionais, funcionando como uma fonte de aminoácidos durante a germinação e ao mesmo tempo sendo tóxica para bruquídeos (MACEDO et al., 1993; SALES et al., 2000; SHUTOV et al., 1995). Vicilinas de *Vigna unguiculata* mostraram forte associação com quitina, quitosana e quitina completamente acetilada (SALES et al., 1996). Por esta razão, estas proteínas podem se ligar à parede celular de fungos, interferindo na germinação dos esporos ou dos conídios de uma variedade de fungos (GOMES et al., 1997) e no crescimento de leveduras (GOMES et al., 1998), e ainda podem se ligar a estruturas quitinosas do intestino médio de *Callosobruchus maculatus* interferindo assim no seu desenvolvimento (AMORIM et al., 2008; MOTA et al., 2003; YUNES et al., 1998).

Portanto, vicilinas são proteínas bioativas importantes nos processos de defesa de muitas espécies de plantas. Essas proteínas possuem atividades bioinseticidas sobre diversas pragas pela associação a estruturas do epitélio e membranas peritróficas presentes no intestino de vários insetos, podendo ser usadas como aleloquímicos (toxinas) no controle de pragas importantes, seja como constituinte tóxico de iscas ou nos programas de melhoramento de plantas cultivadas por meio de técnicas de transgenia.

No Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas são realizados estudos de bioprospecção de proteínas tóxicas em sementes selvagens presentes nos biomas de mata atlântica e caatinga. Dentre essas sementes destaca-se a de mulungu (*E. velutina*) que é uma leguminosa de grande porte, endêmica de regiões semi-áridas do nordeste do Brasil (RIBEIRO et al., 2006) (Figura 3). Resultados recentes desse grupo mostraram que vicilinas extraídas das sementes desta leguminosa foram tóxicas para os bruquídeos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. No presente estudo, a vicilina de sementes de *E. velutina* foi purificada, caracterizada e utilizadas em sistema de bioensaio com o intuito de se propor um modelo de controle biorracional da população da mosca-da-fruta *C. capitata*.



Figura 3: Sementes de Mulungu (*Erythrina velutina*).
Fonte: Moura (2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial bioinseticida das vicilinas de sementes das leguminosas *Erythrina veluntina* (mulungu), *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) sobre fêmeas adultas da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar vicilinas das sementes de leguminosas *E. veluntina* (mulungu), *C. ensiformis* (feijão de porco) e *P. vulgaris* (feijão comum);
- Avaliar a atividade inseticida de vicilinas de semente de leguminosas sobre insetos adultos de *C. capitata* em laboratório;
- Avaliar a atividade inseticida de vicilinas de semente de leguminosas por bioensaio no sistema semi-campo;
- Analisar a digestibilidade *in vivo* dessas vicilinas por moscas-das-frutas adultas.

3 MATERIAIS

3.1 MOSCA DAS FRUTAS – *Ceratitis capitata*

Pupas de mosca das frutas foram gentilmente doadas pelo Professor Doutor Aldo Malavasi e oriundas da biofábrica MOSCAMED, Petrolina, PE. Após a eclosão das pupas, as moscas foram coletadas e colocadas em câmara de criação (BOD) com temperatura controlada de 26 – 28 °C e umidade relativa do ar em 60%. O esquema abaixo mostra a classificação taxonômica de *C. capitata* (Figura 2), segundo Norrbom et al., (1998):

REINO: Animalia

FILO: Artropoda

CLASSE: Insecta

ORDEM: Diptera

SUBORDEM: Brachycera

INFRAORDEM: Cyclorrhapha

SÉRIE: Schizophora

FAMÍLIA: Tephritidae

SUBFAMÍLIA: Trypetinae

TRIBO: Dacini

SUBTRIBO: Ceratitidina

GÊNERO: *Ceratitis*

ESPÉCIE: *C. capitata*

3.2 SEMENTES DE LEGUMINOSAS

As sementes secas de mulungu (*E. velutina*), foram fornecidas pela divisão técnica – setor de sementeiras do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade - Nísia Floresta, RN. As sementes de feijão de porco, *C. ensiformis* (Figura 4A), e feijão comum, *P. vulgaris* (Figura 4B), foram adquiridas no comercio local.

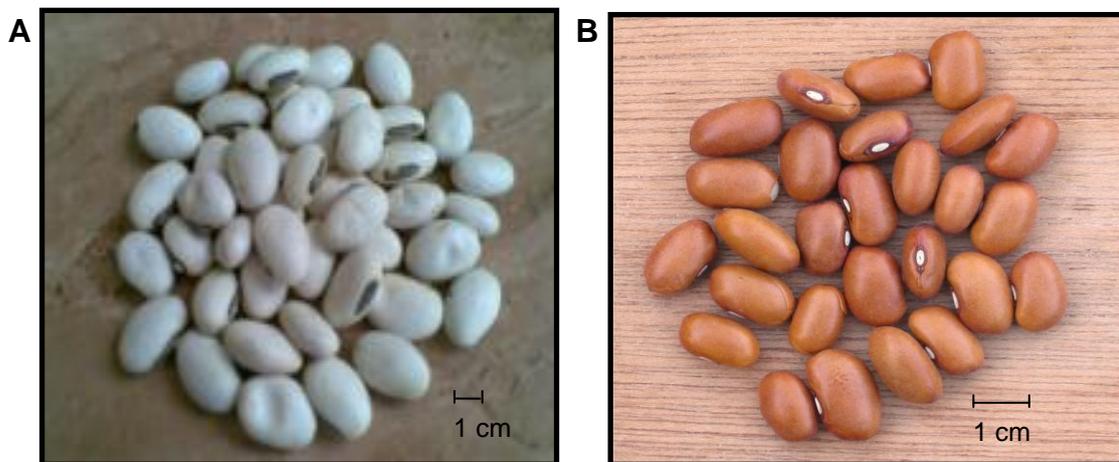


Figura 4: Sementes de leguminosas. (A) *C. ensiformis*. (B) *P. vulgaris*.

Fonte; (A) indonetnetwork.co.id/trade/Agraris/495.html (2010).

(B) commons.wikimedia.org/wiki/File:Bruine_boon_N...(2010).

3.3 ERITRÓCITOS HUMANOS

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

3.4 REAGENTES

- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).
- Comassie Blue G250 e R250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- Acrilamida (Reidel – germany Co.);
- N,N-metileno-bis-acrilamida (Reidel – germany Co.);
- Temed (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA);
- Comassie Blue G250 e R250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- Quitina de carapaça de lagosta, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

Os outros materiais de grau analítico utilizados foram adquiridos no comércio local.

3.5 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético Tecnal TE-081;
- Banho Maria (Tecnal - Te 056)
- Balança analítica eletrônica – BEL Engineering.
- Balança eletrônica –Tecnal (mod. B-tec 2200)
- Centrífuga HITACHI CR G (HITACHI, Tokio)
- Espectrofotômetro Phamacia Biotec (mod, ultrospec 2100 - pro)
- Gaiolas de alumínio e telas de nylon (1 m x 0,50 m x 0,50 m)
- Microcentrífuga para Eppendorf 5410
- Fonte de eletroforese Biorad (mod. Power pac 300)
- Sistema de eletroforese vertical Amersham Biosciences;
- Moinho Tecnal (TE 631/2)
- Microscópio óptico Olympus BX60
- pHmetro Analyser (pH 300)

4 MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE VICILINAS DAS SEMENTES DE LEGUMINOSAS

4.1.1 Preparo de Farinha de Sementes de leguminosas

Sementes secas de *E. velutina* (mulungu), *C. ensiformis* (feijão de porco) e *P. vulgaris* (feijão comum) foram descascadas e depois trituradas em moinho elétrico e peneiradas para a obtenção de uma farinha de granulação fina.

4.1.2 Preparo do Extrato Bruto das Sementes

As farinhas de granulação fina das sementes foram homogeneizadas com tampão tetraborato de sódio (Bórax) 50 mM, pH 7,5, na proporção de 1:10 (m/v), sob agitação constante durante um período de duas horas, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, filtrado em lã de vidro, foi então denominado de extrato bruto (EB).

4.1.3 Fracionamento com Sulfato de Amônio

O extrato bruto foi fracionado com duas faixas de concentração de sulfato de amônio: 0-70% e 70-90% de saturação. Após cada etapa de fracionamento, a amostra foi mantida a uma temperatura de 4°C, por aproximadamente 16 horas e posteriormente centrifugada a 12000 x g durante 30 minutos, a 4°C. As frações 0-70% foram ressuspensas com tampão Bórax 50 mM, pH 7,5, sendo denominadas

de F0-70% (fração albumínica) e então guardadas a 4°C. As frações 70-90% foram ressuspensas com tampão Bórax 50 mM, pH 7,5 e denominadas de F70-90% (fração globulínica, que é rica em vicilinas).

4.1.4 Obtenção da fração rica em vicilinas

As frações F70-90% das sementes de leguminosas foram dialisadas contra água destilada até a formação de um precipitado. Essas frações foram então centrifugadas a 12.000 x g a 4°C e os precipitados foram ressuspensos no menor volume de água destilada e liofilizado.

4.1.5 Cromatografias de Afinidade em coluna de quitina das Vicilinas de Sementes

A quitina comercial foi tratada fervendo-a em HCl 0,1 M por 15 minutos, para expor um maior número de resíduos de N-acetil-glicosamina, em seguida, foi acomodada em uma coluna (4 x 1,5 cm) e equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Nesta coluna foram aplicados 15 mg de Fração 70-90%, fração globulínica rica em vicilinas, os quais foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. O pico não retido foi eluído com tampão de equilíbrio. Na eluição das proteínas retidas (vicilinas) foi utilizado como eluente uma solução de tampão Glicina 0,1 M, pH 2,0 para liberar o material retido. A eluição foi acompanhada por leitura das frações/tubos a 280 nm. A lectina de gérmen de trigo (WGA) foi aplicada na coluna para um controle positivo da matriz de quitina. Proteínas não ligantes à quitina (inibidor de tripsina de soja, albumina sérica bovina) foram passadas como controle negativo da afinidade da matriz de quitina (dados não mostrados).

4.1.6 Dosagens de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina para a curva padrão.

4.1.7 Detecção de proteínas de defesa de plantas

4.1.7.1 Detecção de inibidores de proteinases serínicas do tipo tripsina

- Preparo do substrato Azocaseína 1%

Essa solução foi preparada pesando-se 1 grama de azocaseína para 100 mL de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. A suspensão foi fervida por 15 minutos e após resfriamento o volume foi completado com água destilada. A solução foi reservada em congelador até sua utilização.

- Ensaio de inibição de proteinases serínicas do tipo tripsina

Foram realizados ensaios para a detecção inibidores de proteinases serínicas do tipo tripsina segundo o método de Xavier-Filho e Campos (1989), com adaptações. Alíquota de 10 µl da solução de tripsina bovina (0,3 mg/mL tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5) foi pré-incubada com 390 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e 100 µl das vicilinas (2 mg/ml), por 10 min, a 37 °C. Após o tempo de pré-incubação foram adicionados 200 µl de solução de azocaseína 1%, e a mistura de reação permaneceu por mais 20 minutos nas mesmas condições. A reação foi parada pela adição de 300 µl de solução de TCA 20%. O material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g e alíquotas de 500 µl do sobrenadante foram alcalinizadas com o mesmo volume de NaOH 2 N. O efeito das vicilinas sobre a atividade proteolítica a

pH 7,5 foi observado pela medida da absorbância a 440 nm originada dos peptídeos diazotizados. Os ensaios foram realizados em triplicatas e provas em branco foram feitas.

4.1.7.2 Detecção de Lectinas

- Lavagem dos Eritrócitos para Ensaio de Hemaglutinação

Alíquotas de 2 mL de sangue foram lavadas com 8 mL de solução salina fisiológica e centrifugadas a 924 x g, até a obtenção de uma massa de eritrócitos íntegros livre de soro e material hemolisado.

- Tratamento de Eritrócitos com Papaína

Uma solução estoque de papaína a 1% em solução salina foi preparada e mantida a 4 °C por 24 horas com agitação ocasional. A solução foi estocada em alíquotas de 3 mL de papaína a -20 °C. Quando necessário, foi diluído na proporção 1:10 (v/v) com tampão SORENGEN (3 partes de NaH₂PO₄ 0,067 M e 1 parte de KH₂POH, 0,067 M).

A solução de papaína foi adicionada a massa de eritrócitos, previamente lavado, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C, com agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e seu precipitado foi lavado seis vezes com solução salina gelada. O hematócrito foi realizado e as hemácias foram diluídas a 4% em solução salina

- Ensaio de Hemaglutinação das frações ricas em vicilinas

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de 96 poços com fundo em "V" por meio de diluição seriada das amostras testes (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...), tanto na presença quanto na ausência dos íons metálicos: Ca⁺², Mn⁺² e Mg⁺² (200 mM). No primeiro poço foram adicionados 25 µL da amostra e 25 µL de

uma suspensão de eritrócitos a 4% tratados enzimaticamente enquanto que, a partir do segundo em diante foram adicionados 25 μ L de solução salina contendo ou não íons, 25 μ L da amostra diluída seriadamente e 25 μ L de uma suspensão de eritrócitos a 4%, submetidos a tratamentos enzimáticos. A reação foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. O grau de aglutinação foi observado visualmente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), que foi definido como o inverso da maior diluição da amostra que tenha apresentado nítida aglutinação (MOREIRA; PERRONE, 1977).

4.1.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE) de vicilinas

Com o intuito de avaliar o grau de pureza das amostras protéicas, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e 15% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado com 1,25 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; água destilada 2,425 mL; 50 μ L de SDS 10%; 5 μ L de TEMED concentrado e 25 μ L de persulfato de amônio 30%. O gel de concentração continha 0,33 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 625 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,5 mL de água destilada; 25 μ L de SDS 10%; 5 μ L de TEMED e 12,5 μ L de persulfato de amônio. O tampão de corrida consistia de Tris 25 mM; glicina 192 mM e SDS 10%. Uma vez diluída em tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol, em um volume de 20 μ L, a alíquota foi aplicada no gel (10 x 14 cm, com espaçadores de 0,75 mm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 20 mA por, aproximadamente, 2 horas.

Após a eletroforese o gel foi corado segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Coomassie Blue R 250 a 1%, etanol 40% e ácido acético 10 % em água destilada. As bandas protéicas foram descoradas após a imersão do gel em uma solução descorante (etanol 30% e ácido acético 10%). Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados marcadores padrão de proteínas.

4.2 BIOENSAIOS – ATIVIDADE INSETICIDA DE VICILINAS

4.2.1 Bioensaios com insetos adultos de *C. capitata* em condições de laboratório

Para avaliar o efeito das frações protéicas sobre a sobrevivência de insetos adultos de *C. capitata* as vicilinas foram adicionadas à dieta dos insetos adultos nas concentrações finais de 0; 5, 10 e 15% (p/v). A dieta padrão adaptada de Macedo (2007) foi composta por uma solução aquosa de sacarose 20%, NaCl 0,9%, benzoato de sódio 0,03% e sulfato de amônio 0,1% como fonte extra de nitrogênio. Neste bioensaio 20 fêmeas adultas de *C. capitata* foram colocadas em gaiolas feitas com garrafas PET nas quais as dietas foram oferecidas (Figura 5). Controles com água e dieta padrão com BSA nas concentrações finais de 0; 5, 10 e 15% (p/v) foram realizados. Também foi usada, como controle positivo, a lectina de gérmen de trigo (WGA), uma proteína ligante à quitina. O tempo do bioensaio foi de 6 dias e a cada 24 h as dietas foram trocadas e contabilizado o número de insetos mortos. Os experimentos foram feitos em triplicatas e as gaiolas ordenadas de forma aleatória.

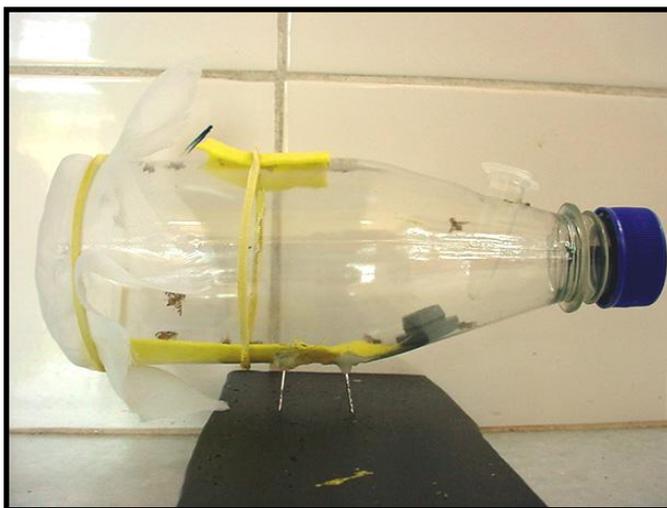


Figura 5: Gaiola (PET) de bioensaio laboratorial para insetos adultos.
Fonte: Macedo (2007).

4.2.2 Bioensaio em semi-campo para insetos adultos de *C. capitata*

Para avaliar o potencial inseticida dessas vicilinas foi realizado um teste em semi-campo com as frações protéicas utilizando gaiolas de alumínio, medindo 1 m x 0,5 m x 0,5 m, com faces de tela plástica branca. Nessas gaiolas foi colocada uma goiabeira de aproximadamente 0,7 m de altura, que foi assentada sobre uma mesa plástica (Figura 6A). Dentro de cada gaiola foram colocadas armadilhas Jacksons, específicas para o controle de *C. capitata*, sem adesivos na base, presas ao caule da planta. Dentro das armadilhas foram disponibilizadas as dietas. A dieta padrão foi composta por uma solução aquosa de sacarose 20%, NaCl 0,9%, benzoato de sódio 0,03% e sulfato de amônio 0,1%. A vicilina *E. velutina* foram adicionadas à dieta dos insetos adultos nas concentrações finais de 0; 5, 10 e 15% (p/v). Neste bioensaio 20 fêmeas adultas de *C. capitata* foram colocadas nas gaiolas nas quais as dietas foram oferecidas (Figura 6B e 6C). O tempo do bioensaio foi de seis dias sendo as dietas trocadas a cada 12 h e contabilizado o número de insetos mortos a cada 24 h. Os experimentos foram feitos em triplicatas e as gaiolas ordenadas de forma aleatória.



Figura 6: Gaiola de bioensaio semi-campo. (A) Gaiola com uma muda de goiabeira dentro. (B) Gaiola com armadilha Jacksons presa à goiabeira. (C) Detalhe da armadilha Jacksons com os comedouros e dois insetos próximos a eles.

4.3 DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* DAS VICILINAS POR *C. CAPITATA*

O ensaio de digestibilidade *in vivo* com insetos adultos de *C. capitata* foi realizado com 30 fêmeas, separadas em gaiolas e submetidas a uma dieta contendo 20% de sacarose, NaCl 0,9%, benzoato de sódio 0,03% e sulfato de amônio 0,1% por um período de 24 horas. Após esse período os insetos foram transferidos para gaiolas limpas e submetidos à dieta contendo 10% de vicilinas e mantidas por períodos de 3 horas. As fezes que ficaram aderidas nas paredes das gaiolas foram coletadas e dissolvidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e centrifugadas. O precipitado foi descartado e as proteínas presentes no sobrenadante foram visualizadas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) na concentração de 15%.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os dados obtidos nos bioensaios foi realizada uma análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Turkey, ao nível de 5% de significância. Todos os cálculos foram feitos no sistema Statistica '99 versão 6.0. O LT_{50} (tempo letal exigido para matar 50% dos insetos) foi calculado pela Probit Analysis (Finney, 1971) usando o Polo-PC (software LeOra, 1987).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO DE VICILINAS DAS SEMENTES DE LEGUMINOSAS

5.1.1 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina.

As frações protéicas F70-90%, frações globulínicas ricas em vicilinas, provenientes da precipitação com sulfato de amônio foram submetidas a cromatografia em matriz de quitina com a finalidade de isolar as vicilinas de *E. velutina*, *C. ensiformis* e *P. vulgaris* (Figuras 7 a 9). Lectina de gérmen de trigo (WGA) foi usada para testar a afinidade da matriz de quitina (Figura 10). Os perfis cromatográficos dessas frações apresentaram picos protéicos definidos após a eluição com tampão glicina 0,1 M, pH 2,0 revelando componentes com afinidade pela matriz de quitina (Figuras 8 a 10). As proteínas eluídas foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Os liofilizados foram submetidos a outras análises.

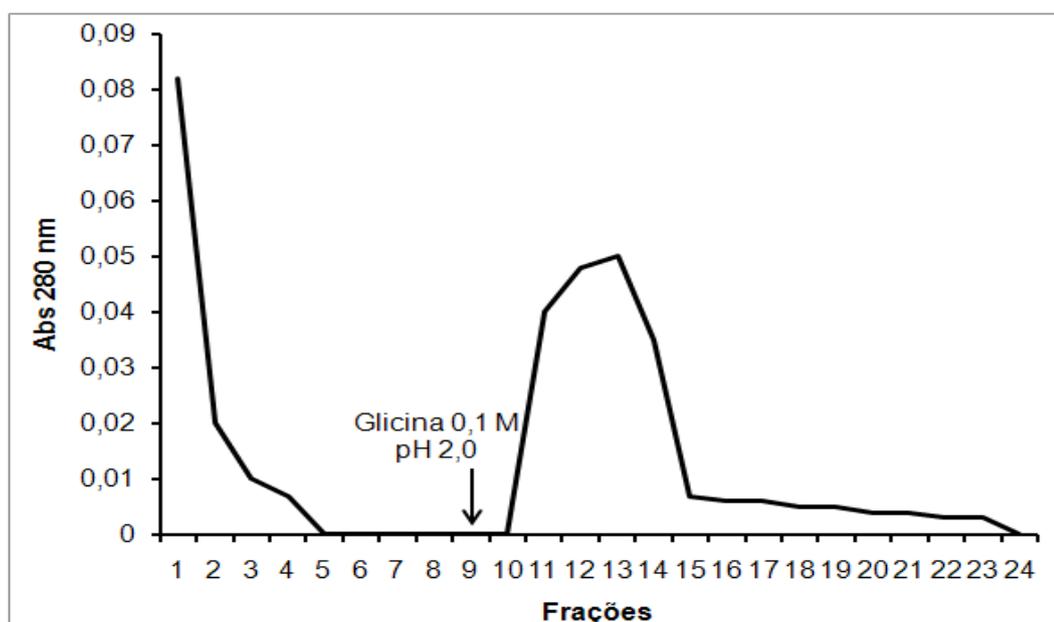


Figura 7: Perfil de eluição de EvV em cromatografia de afinidade em quitina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas absorvidas foram eluídas com glicina 0,1 M, pH 2,0 em fluxo constante de 2 mL/min, a absorbância medida a 280 nm.

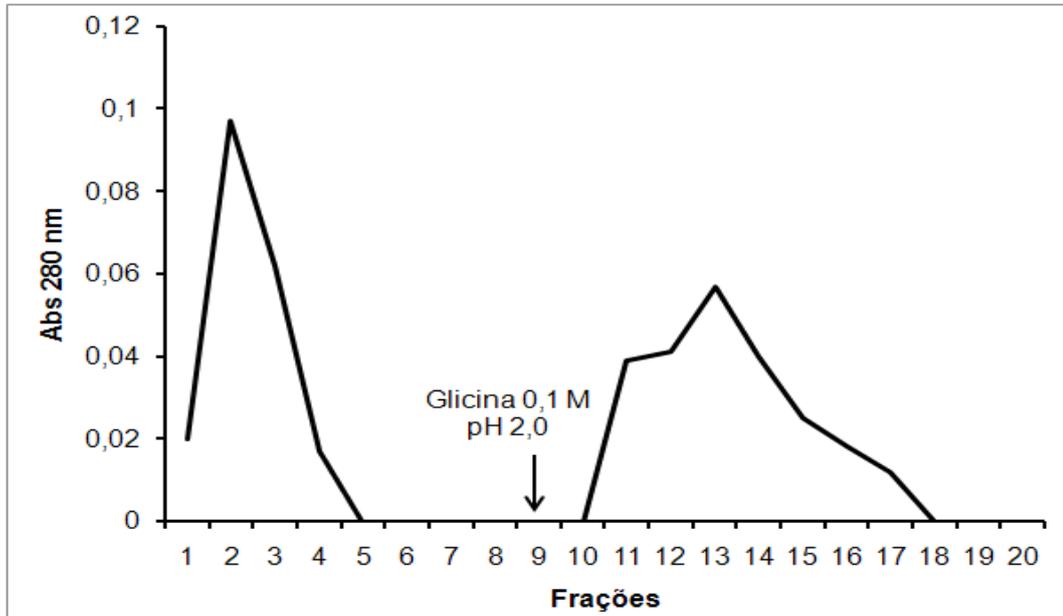


Figura 8: Perfil de eluição de CeV em cromatografia de afinidade em quitina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas absorvidas foram eluídas com glicina 0,1 M, pH 2,0 em fluxo constante de 2 mL/min, a absorbância medida a 280 nm.

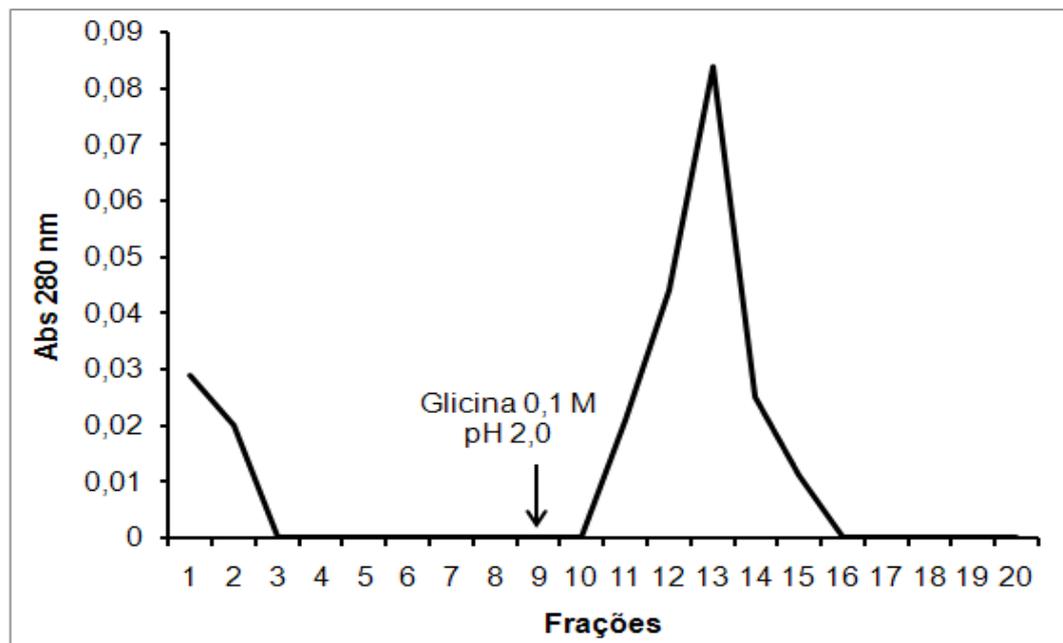


Figura 9: Perfil de eluição de PvV em cromatografia de afinidade em quitina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas absorvidas foram eluídas com glicina 0,1 M, pH 2,0 em fluxo constante de 2 mL/min, a absorbância medida a 280 nm.

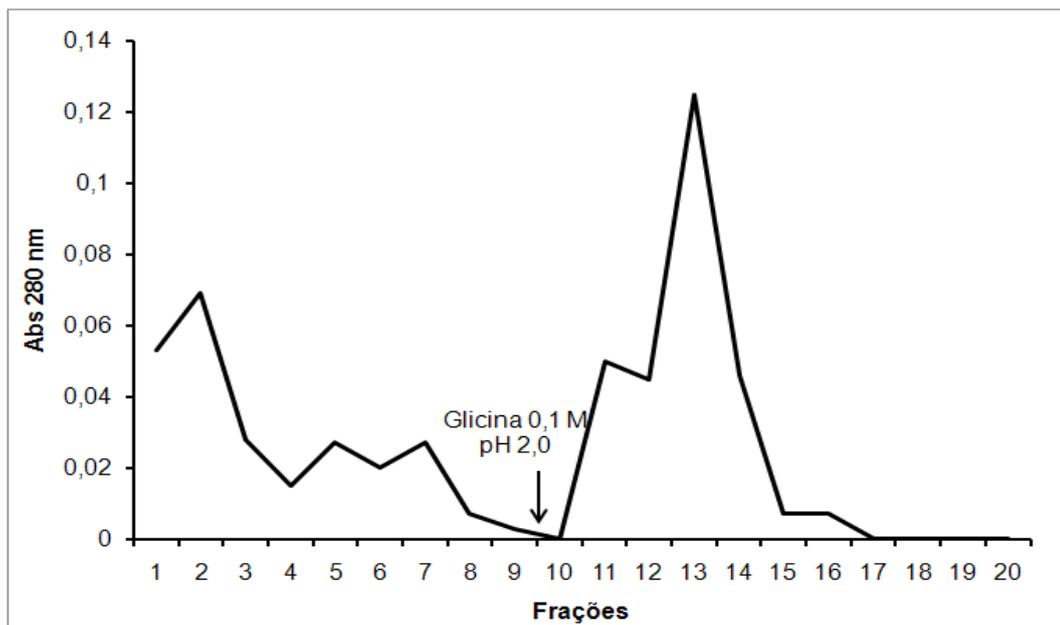


Figura 10: Perfil de eluição de WGA em cromatografia de afinidade em quitina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas absorvidas foram eluídas com glicina 0,1 M, pH 2,0 em fluxo constante de 2 mL/min, a absorbância medida a 280 nm.

5.1.2 Detecção de outras proteínas de defesa de plantas

Durante a etapa de isolamento das vicilinas de *E. velutina*, *C. ensiformis* e *P. vulgaris* por afinidade à quitina, ensaios para a detecção de outras proteínas de defesa ligantes, como inibidores de proteinases serínicas e lectinas, à quitina foram realizados. No entanto, não foram detectados, no material eluído da matriz de quitina. WGA apresentou título de hemaglutinação de 16 UH (unidade de hemaglutinação).

Tabela 1: Ensaio para detecção de proteínas de defesa contaminantes em preparações de vicilinas.

Vicilinas	Inibidores de tripsina	Lectinas
<i>C. ensiformes</i>	ND	ND
<i>E. velutina</i>	ND	ND
<i>P. vulgaris</i>	ND	ND

ND: não detectável

5.2 BIOENSAIOS

5.2.1 Teste de atividade inseticida por bioensaios para adultos de *C. capitata* em condições de laboratório

Os efeitos das vicilinas de *E. velutina*, *C. ensiformis*, *P. vulgaris* e de WGA sobre a mortalidade dos insetos adultos foram avaliados em um sistema de bioensaio, onde concentrações crescentes de vicilinas foram adicionadas à dieta. O período experimental estabelecido no bioensaio foi de seis dias, durante os quais a mortalidade foi monitorada nos diversos tratamentos. Durante o bioensaio todas as moscas submetidas ao tratamento com água, ou seja, sem alimento algum, morreram nas primeiras 24 horas de experimento.

Nos tratamentos em que as vicilinas de *E. velutina* foram adicionadas à dieta nas concentrações de 5, 10 e 15% observou-se grande mortalidade, principalmente na maior concentração, atingindo uma mortalidade de 100% ao final do experimento (Figura 11) .

Nos tratamentos com as vicilinas de *C. ensiformis* (Figura 12), *P. vulgaris* (Figura 13) e WGA (Figura 14), a mortalidade observada não diferenciou estatisticamente do controle da dieta sem proteína.

O controle com BSA adicionado à dieta dos insetos, nas mesmas concentrações de 5, 10 e 15%, também apresentou taxa de mortalidade semelhante ao da dieta sem proteína (Figura 15).

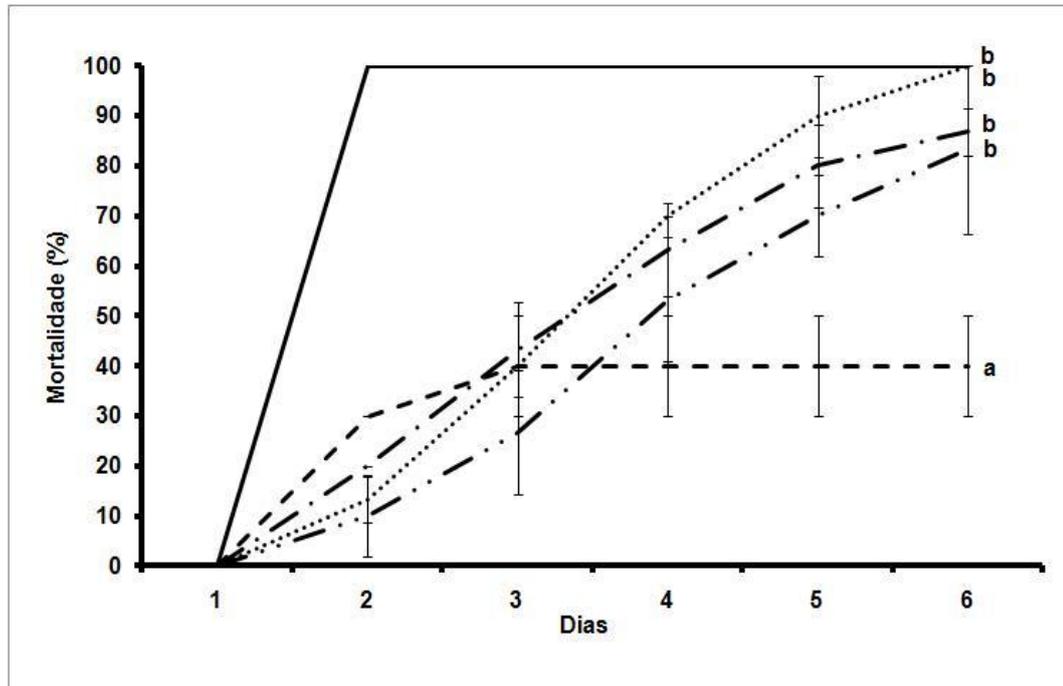


Figura 11: Efeito de EvV sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* em laboratório. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (- · - ·) EvV 5%, (- · - ·) EvV 10%, (·····) EvV 15%.

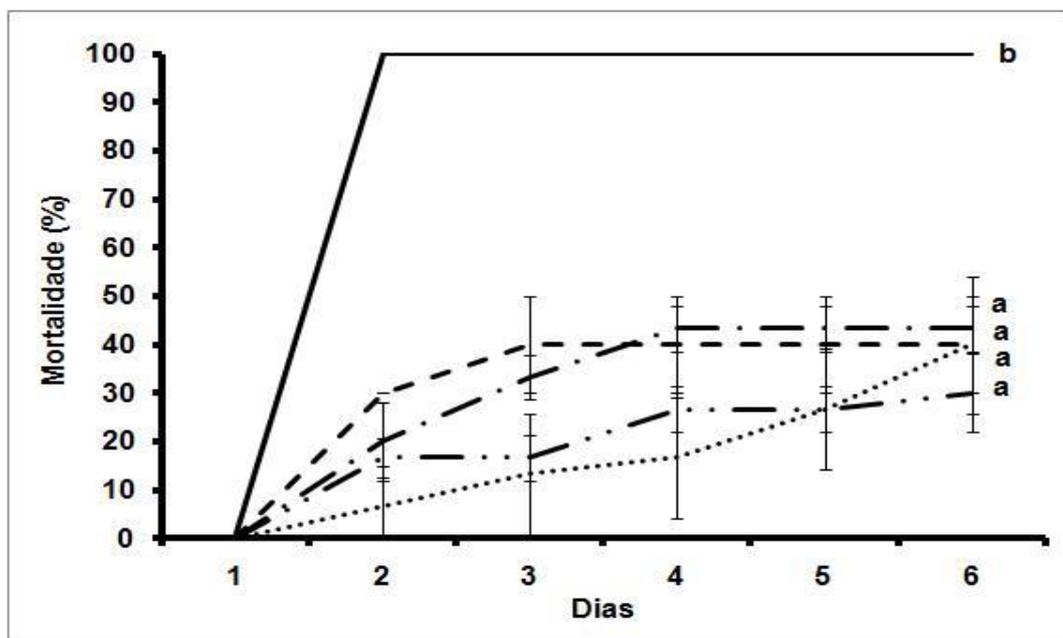


Figura 12: Efeito de CeV sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* em laboratório. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (- · - ·) CeV 5%, (- · - ·) CeV 10%, (·····) CeV 15%.

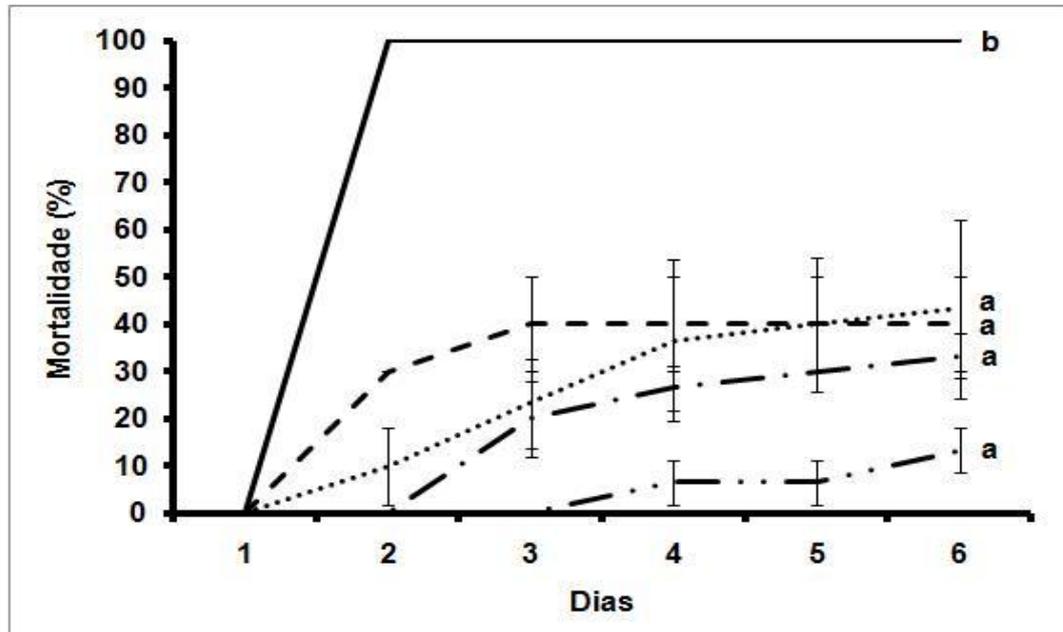


Figura 13: Efeito de PvV sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* em laboratório. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (- · - ·) PvV 5%, (— · —) PvV 10%, (·····) PvV 15%.

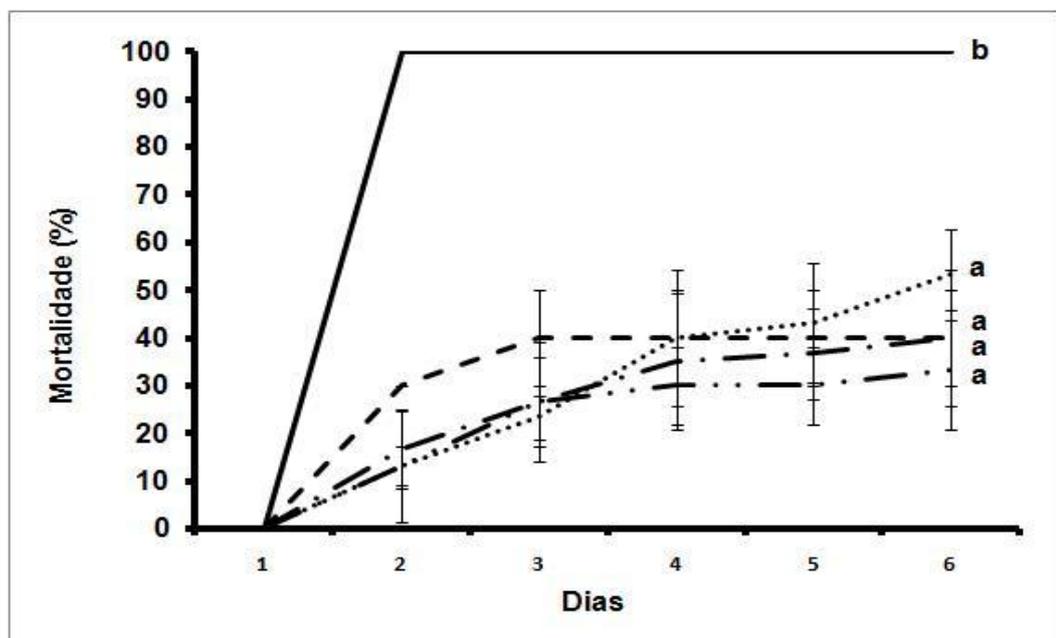


Figura 14: Efeito de WGA sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* em laboratório. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (- · - ·) WGA 5%, (— · —) WGA 10%, (·····) WGA 15%.

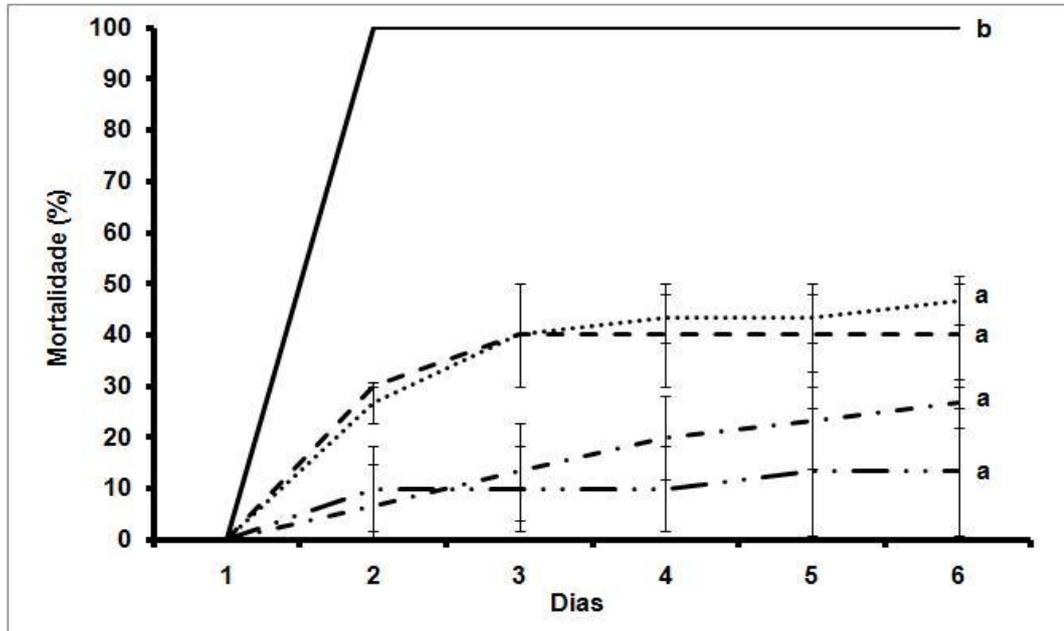


Figura 15: Efeito de BSA (controle) sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* em laboratório. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (— · · —) BSA 5%, (— · —) BSA 10%, (······) BSA 15%.

5.2.2 Teste de atividade inseticida por bioensaios em sistema semi-campo para insetos adultos de *C. capitata*

Por apresentar grande atividade inseticida no bioensaio em condições de laboratório, a vicilina de *E. velutina* foi testada no sistema semi-campo. O efeito sobre os insetos adultos foi avaliado nas doses de 5, 10 e 15% (p/v) adicionadas à dieta dos insetos (Figura 16 a 18). O período experimental estabelecido no bioensaio também foi de seis dias, durante os quais a mortalidade foi monitorada nos diversos tratamentos. Semelhante ao resultado do bioensaio em laboratório, essa vicilina, causou mortalidade nas três concentrações testadas, apresentando um melhor efeito bioinseticida nas concentrações de 10% (Figura 17) e 15% (Figura 18) de vicilina (p/v). Durante o bioensaio as moscas submetidas ao tratamento com água, morreram nos primeiros dias de experimento.

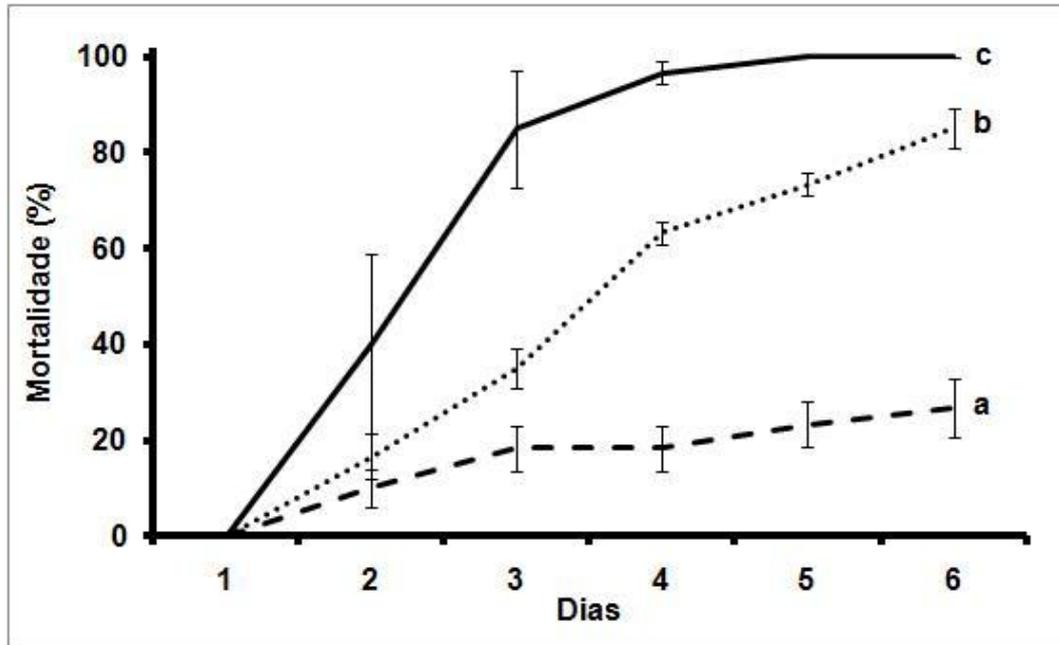


Figura 16: Efeito de EvV a 5% sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* no sistema semi-campo. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (.....) EvV 5%.

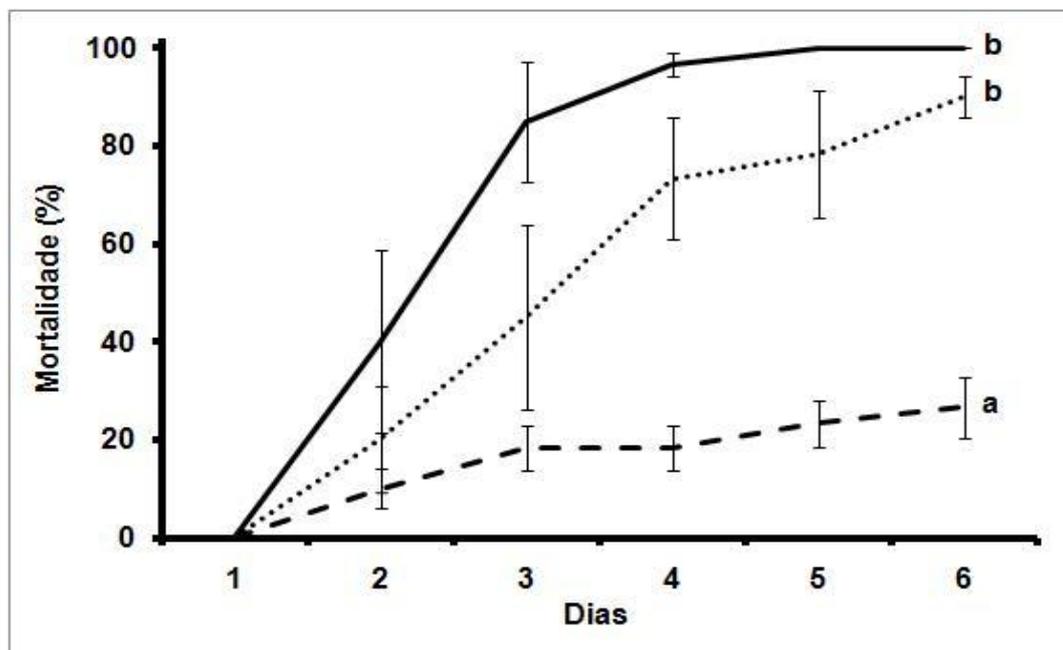


Figura 17: Efeito de EvV a 10% sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* no sistema semi-campo. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—) Água, (---) Dieta sem proteína, (.....) EvV 10%.

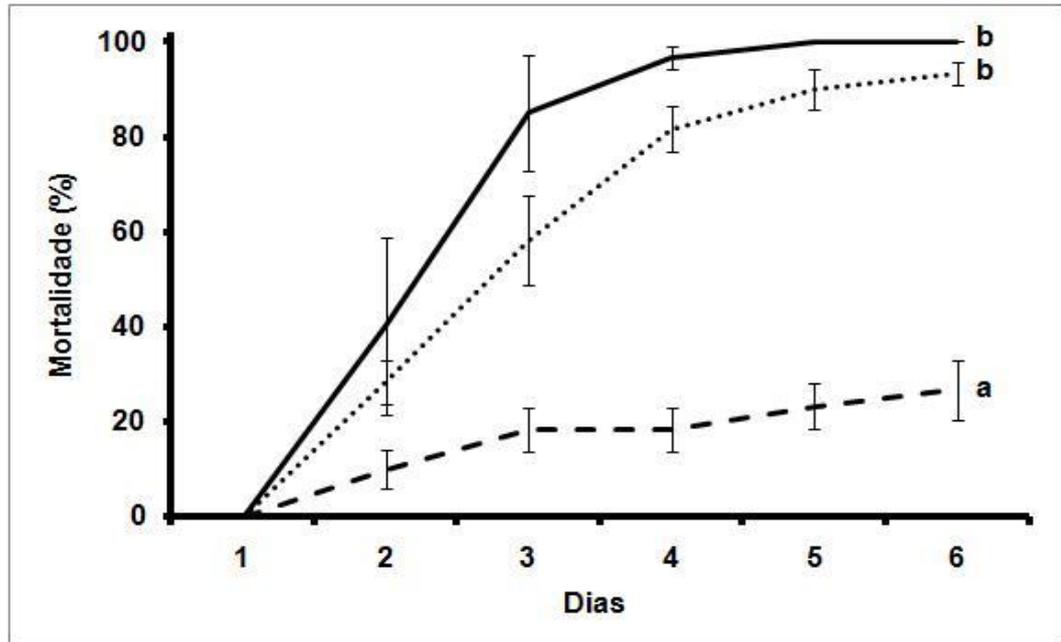


Figura 18: Efeito de EvV a 15% sobre a mortalidade de insetos adultos de *C. capitata* no sistema semi-campo. Para o mesmo dia, médias com símbolos iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. (—)Água, (---)Dieta sem proteína, (.....)EvV 15%.

Para avaliar qual concentração teria uma letalidade maior, ou mais rápida, foi calculado o LT_{50} , que é o tempo necessário para matar 50% da população testada. As LT_{50} encontradas foram de 56,7 horas para a concentração de 5% de EvV, 47,6 horas para 10% e de 36,8 horas para a concentração de 15% de EvV. As moscas alimentadas com água obtiveram LT_{50} de 21,7 horas e as alimentadas apenas com a dieta sem proteína foi de 143,4 horas.

5.3 DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* DAS VICILINAS POR *C. CAPITATA*

A digestibilidade das vicilinas de *E. velutina*, *C. ensiformis* e *P. vulgaris* foi avaliada *in vivo* quando insetos adultos foram alimentados com dietas contendo vicilinas a 10% (p/v). Dietas contendo 10% de WGA foram utilizadas como controle. Os insetos tiveram suas fezes colhidas 3 horas após a adição da dieta. As proteínas extraídas das fezes foram submetidas a uma SDS-PAGE. Os resultados mostraram que as vicilinas de diferentes origens apresentam padrões diversos de digestão pelos insetos. A vicilina de *E. velutina* foi a mais refratária à digestão pelos insetos. Para as outras vicilinas após 3 horas de hidrólise foi observado digestão da banda característica de vicilinas. WGA foi a mais susceptível à digestão pelas enzimas do inseto.

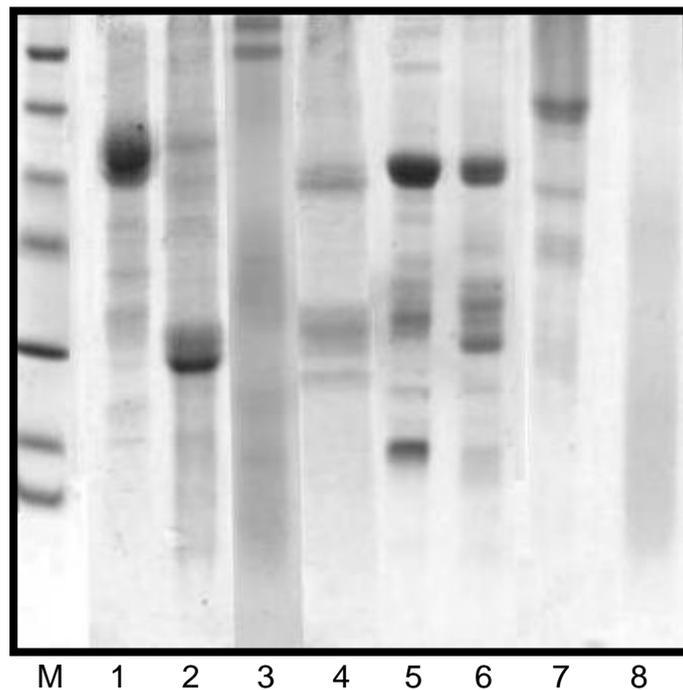


Figura 19: Eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) da digestibilidade *in vivo* das vicilinas de CeV, PvV, EvV e WGA. M – marcador de peso molecular (β -galactosidase 116.0 kDa; albumina sérica bovina 66.2 kDa; ovoalbumina 45.0 kDa; lactato desidrogenase 35.0 kDa; enzima de restrição Bsp98 25.0 kDa; β -lactoalbumina 18.4 kDa, lisozime 14.4kDa); 1 – CeV não digerida; 2 – CeV após 3h de digestão. 3 – PvV não digerida, 4 – PvV após 3h de digestão, 5 – EvV não digerida 6 – EvV após 3h de digestão, 7 – WGA não digerida 8 – WGA após 3h de digestão.

6 DISCUSSÃO

Devido a grandes perdas nas lavouras, a busca por produtos que possam combater ou controlar as pragas e patógenos na agricultura tem motivado a criação e desenvolvimento de uma variedade de pesticidas que reduzam as perdas para o produtor. Porém, estudos toxicológicos sobre os efeitos agudos e crônicos da exposição a estas substâncias mostraram que muitos desses pesticidas sintéticos são altamente tóxicos, não somente para o organismo alvo, mas também aos outros animais, inclusive o homem. Devido a isso, é preciso buscar novas alternativas mais prudentes, com diferentes mecanismos de ação e que sejam ambientalmente sustentáveis para o controle de pragas (LOPEZ; FERNANDEZ-BOLANOS; GIL et al., 2005).

Por milhares de anos, plantas e herbívoros têm co-evoluido e, como resultado, as plantas desenvolveram diversos mecanismos que conferiram proteção contra a herbivoria de patógenos, insetos, pássaros e mamíferos. Vários tipos de compostos tóxicos são naturalmente sintetizados e depositados nos diversos órgãos das plantas como uma forma de garantir a integridade do genoma contra essa herbivoria (KOGAN, 1986). Os tecidos das plantas podem acumular constitutivamente, ou depois de induzidos, uma grande quantidade de compostos que promovem resistência contra patógenos e fitófagos. Dentre estes compostos estão as lectinas, inibidores de proteinases, inibidores de α -amilases, quitinases e vicilinas, que recentemente foram incluídas dentro do grupo de proteínas de defesa das plantas (SALES; MACEDO; XAVIER-FILHO, 1992; MACEDO et al., 1993; SALES et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2002; ARAUJO et al., 2005).

Para as sementes de leguminosas, as vicilinas possuem dupla função, fornecendo aminoácidos para a germinação e crescimento da plântula e agindo na defesa durante o período de quiescência (MACEDO et al., 1993; SHUTOV et al., 1995; SALES et al., 2001). Vários estudos mostraram as propriedades de defesa das vicilinas de leguminosas contra insetos, como a vicilina de *V. unguiculata* contra os bruquídeos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (SALES et al., 2005), contra as larvas de lepidóptera *Diatraea saccharalis* (MOTA et al., 2003). Essa mesma vicilina também foi testada contra as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida*

albicans, demonstrando serem eficazes na inibição do crescimento desses organismos (GOMES et al., 1998). A vicilina de *Enterolobium contortisiliquum* foi testada contra as larvas dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, com LD₅₀ de 1,11% e LD₅₀ de 0,43%, respectivamente, para o fungo fitopatogênico *Fusarium solani*, esta vicilina inibiu o crescimento a concentrações de 10 e 20 µg/mL (MOURA et al., 2007).

Vicilinas de leguminosas apresentam a capacidade de ligarem-se a matrizes quitinosas como a vicilina de *V. unguiculata*, como observado por Sales et al. (1996). Yunes et al. (1998) relataram que vicilinas de feijão azuki (*V. angularis*), soja (*Glycine max*) e fava (*V. lunatus*) também se ligavam à quitina. Neste estudo foi demonstrado que essa propriedade das vicilinas de se ligarem a matrizes quitinosas parece ser uma propriedade geral, pois também foi demonstrado nesse trabalho que as vicilinas de mulungu (*E. velutina*), assim como foram repetidos os resultados obtidos por Yunes et al. (1998) feijão de porco (*C. ensiformis*) e feijão comum (*P. vulgaris*), têm afinidade pela matriz de quitina. Outros tipos de proteínas de defesa de plantas também possuem capacidade de se ligar a matrizes quitinosas, como as lectinas (SANTI-GADELHA et al., 2006) e quitinases (KRISHNAVENI et al., 1999; TAIRA et al., 2001; SANTOS et al., 2004). Já foi demonstrado que as proteínas ligantes à quitina apresentam atividades entomotóxicas e anti-fúngicas.

As propriedades bioinseticidas de vicilinas já foram testadas e há relatos mostrando que estas proteínas são inseticidas a baixas concentrações, como demonstrado por Macedo et al. (1993) que observaram que vicilinas de *V. unguiculata* resistente apresentaram um LD₅₀ de 2%. Posteriormente, Yunes et al. (1998) relataram que as vicilinas de *C. ensiformis* e *P. vulgaris* apresentaram atividade entomotóxica contra *C. maculatus*. Em 2008, Macedo et al. mostraram que EvV apresentou toxicidade para as larvas de *C. capitata*, com um LD₅₀ de 0,14% e um ED₅₀ de 0,12%. Amorim et al. (2008) observaram que 0,23% de EvV foi suficiente para causar a mortalidade de 50% da população (LD₅₀) e que 0,27% dessa vicilina afetou o desenvolvimento e reduziu em 50% a massa das larvas (ED₅₀) de *Plodia interpunctella*.

Para a mosca-das-frutas (*C. capitata*) o principal método de controle é o uso de pesticidas sintéticos que agredem o meio ambiente e são tóxicos para várias outras espécies. Com isso, a obtenção de novos biocompostos que possam ser

utilizados no controle dessa praga tem sido prospectados por vários grupos de pesquisa. Proteínas antimetabólicas, como o inibidor de tripsina de *Crotalaria pallida* testado contra as enzimas digestivas de larvas de moscas-das-frutas, apresentou uma inibição de 100% em testes *in vitro*. Entretanto, testes *in vivo* mostraram que estes inibidores apresentaram baixo poder inseticida com mortalidade de 27% e redução da massa das larvas de 44,4% (GOMES, C. et al., 2005b). Outro inibidor que apresentou efeito deletério sobre as enzimas digestivas de *C. capitata* foi o extraído das sementes de *Pithecelobium dumosum* (PdKI-2) descrito por Oliveira et al., (2007), que reduziu 70,3% da atividade trípica *in vitro*. As proteínas do látex de *Calotropis procera*, quando testadas contra larvas de terceiro instar, obtiveram um LD₅₀ de 4,61% e também causaram redução no peso das larvas, com ED₅₀ de 3,07% (RAMOS et al., 2007). Estes resultados demonstraram que os inibidores de enzimas proteolíticas apresentam alta atividade *in vitro*, mas que estas atividades foram superadas pelo inseto quando os inibidores foram fornecidos na dieta das larvas e dos insetos adultos. Portanto uma nova classe de proteínas que atingisse outro alvo nos insetos pragas deveria ser testada. As proteínas ligantes à quitina mostraram ser um excelente candidato, pois o alvo no intestino dos insetos seria a quitina presente na matriz peritrófica. A matriz peritrófica é uma matriz que protege o inseto da abrasão de partículas presentes no alimento e qualquer rompimento desta matriz causa a morte do inseto. Neste estudo foi mostrado que algumas proteínas ligantes à quitina, do tipo vicilinas, são deletérias a determinados insetos pragas. Para as moscas-das-frutas nem toda vicilina causa efeito inseticida, como visto por Macedo et al. (1993), Yunes et al. (1998), Moura et al. (2007) para os bruquídeos dos feijões, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Essa propriedade inseticida parece estar associada a determinadas famílias de insetos pragas.

Neste trabalho foi demonstrado que as vicilinas de *E. velutina*, isoladas afetam diferentemente as fêmeas adultas de *C. capitata*. Apesar da afinidade dessas vicilinas por quitina, apenas a de *E. velutina* apresentou propriedades inseticidas para os insetos a doses de 10 e 15% (p/v) quando adicionada na dieta. Esta vicilina foi também letal para as larvas de *C. capitata*, apresentando um LD₅₀ de 0,14% (MACEDO et al., 2008). Diferentemente dos bruquídeos (MACEDO et al., 1993; MOURA et al., 2007; YUNES et al., 1998) que são afetados por vicilinas de várias origens, as fêmeas adultas de *C. capitata* parecem ser apenas afetadas por

aquelas vicilinas ligantes à quitina que são refratárias a digestão pelas enzimas do inseto adulto. As vicilinas de *C. ensiformis* e *P. vulgaris* tiveram seus processos de digestão iniciados nas primeiras 3 horas de sua ingestão pelos insetos, mostrando serem mais susceptíveis ao ataque pelas enzimas digestivas das fêmeas adultas de *C. capitata*. A vicilina de *E. velutina* começou a ser digerida apenas 3 horas após serem ingeridas pelo inseto, indicando que estas são mais refratárias ao ataque pelas enzimas digestivas dos insetos adultos. Esta propriedade parecer ser geral para os insetos adultos desta espécie de praga, indicando que o mecanismo de ação das proteínas deletérias não foi somente baseado na associação com a quitina alvo presente na membrana peritrófica dos insetos. Proteínas ligantes à quitina são bastante tóxicas para várias ordens de insetos (SALES et al., 1996) e também para fungos (GOMES et al., 1997). Por exemplo, WGA, a lectina de gérmen de trigo, mostrou ser bastante tóxica quando adicionada à dieta de insetos produzindo 50% de mortalidade a doses de 0,01 a 0,59% da lectina, para diferentes espécies de insetos pragas (CHRISPEELS; RAIKHEL., 1991), tais como: *C. maculatus* (Coleoptera), *Diabrotica undecimpunctata* (Lepidoptera), *Ostrinia nubilalis* (Homoptera) e *Lucina cuprina* (Diptera). Entretanto, quando WGA foi adicionada a 5% (p/v) na dieta de fêmeas adultas de *C. capitata*, esta proteína não apresentou nenhum efeito tóxico para estes insetos. Possivelmente a grande susceptibilidade da lectina para as enzimas digestivas de *C. capitata* poderia explicar a anulação do efeito tóxico, o qual foi observado para outros insetos pragas de diversas ordens. WGA foi completamente digerida nas primeiras 3 horas após ingestão dessa proteína, mostrando que não somente a propriedade de ligação à quitina responde pelo efeito tóxico desta molécula e das outras vicilinas testadas. Para alguns insetos o seu aparato digestório pode protegê-lo dos efeitos deletérios de algumas proteínas tóxicas. No caso da vicilina de *E. velutina*, além da propriedade de ligação à quitina presente na membrana peritrófica, a sua resistência à digestão pelas enzimas digestivas do inseto nas primeira horas após ingestão poderiam explicar a toxicidade desta vicilina. Com isso, a vicilina de *E. velutina* foi escolhida como candidata para os testes em semi-campo o qual comprovou que mantém seu efeito tóxico a concentrações de 10% e 15% (p/v) quando adicionada à dieta de fêmeas adultas de *C. capitata*, com LT_{50} de 56,7 horas para a concentração de 5% de EvV, 47,6 horas para 10% e de 36,8 horas para a concentração de 15% de EvV.

A vicilina de *E. velutina* é, portanto, um excelente candidato para ser empregado como um bioinseticida biodegradável, atóxico para humanos e animais, de fácil isolamento e de grande atividade tóxica no controle da população de insetos adultos de *C. capitata*.

7 CONCLUSÕES

1. Vicilina de *E. velutina* foi deletéria nas concentrações de 10 e 15% (p/v) quando adicionada à dieta de fêmeas adultas de *C. capitata* em condições de laboratório.
2. Vicilina de *E. velutina* foi deletéria nas concentrações de 10 e 15% (p/v) quando adicionada à dieta de fêmeas adultas de *C. capitata* em condições semi-campo.
3. Vicilina de *E. velutina* foi tóxica para fêmeas adultas de *C. capitata*, devido a suas propriedades de ligação à quitina associada à resistência a digestão pela enzimas dos insetos.
4. Vicilina de *E. velutina* poderia ser indicada como um bioinseticida para ser utilizado nos sistemas integrados de combate a insetos adultos de moscas-das-frutas, com a vantagem de ser biodegradável e atóxico para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, T. M. L.; MACEDO, L. L. P.; UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; PITANGA, J. C. M.; MACEDO, F. P.; SANTOS, E. A. AND SALES, M. P. Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes during the Development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). **J. Agric. Food Chem**, [S.l.], v. 56, p. 7738–7745, 2008.
- ARAUJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L. P.; GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M. S.; FRANCO, O. L.; BLOCH-J, C.; SALES, M. P. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (Fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 53, n. 11, p. 4381-4387, 2005.
- BOWN, D.; ELLIS, T. H. N.; GATEHOUSE, J. A. The Sequence of a Gene Encoding Convicilin from Pea (*Pisum sativum*-L) Shows That Convicilin Differs from Vicilin by an Insertion near the N-Terminus. **Biochemical Journal**. [S.l.] v. 251, n. 3, p. 717-726, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of die-binding. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 72, p. 218-254, 1976.
- CALDAS, E. D.; DE SOUZA, L. C. K. R. Chronic dietary risk assessment for pesticide residues in Brazilian food. **Revista De Saude Publica**. [S.l.], v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.
- CAREY, J. R. The future of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* invasion of California: A predictive framework. **Biological Conservation**, [S.l.], v. 78, n. 1-2, p. 35-50, 1996.
- CAREY, J. R.; DOWELL, R. V. Exotic fruit fly pests and California agriculture. . **California Agriculture**, [S.l.], v. 43, p. 38-40, 1989.
- CARVALHO, R. D. S., Importância econômica das moscas-das-frutas (Tephritidae). In 1 ed.; MINISTERIO DA AGRICULTURA, P. E. A., Ed. EMBRAPA: Cruz das Almas, 2005.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, [S.l.], v. 43, p. 1-16, 1998.
- CHEE, P. P.; JONES, J. M.; SLIGHTOM, J. L. Expression of Bean Storage Protein Minigene in Tobacco Seeds - Introns Are Not Required for Seed Specific Expression. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 137, n. 4, p. 402-408, 1991.

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

CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. – Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, [S.I.], 3: 1- 9, 1991.

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

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

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

DE CHAVEZ, M. M.; CHAVEZ, A. Diet that prevents cancer: Recommendations from the American Institute for Cancer Research. **International Journal of Cancer**, [S.I.], p. 85-89, 1998.

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

DENT, D., **Insect pest management**. CAB International: London, 2000.

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

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

DOYLE, J. J.; SCHULER, M. A.; GODETTE, W. D.; ZENGER, V.; BEACHY, R. N.; SLIGHTOM, J. L. The Glycosylated Seed Storage Proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* - Structural Homologies of Genes and Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 261, n. 20, p. 9228-9238, 1986.

DUARTE, A. L.; MALAVASI, A., Tratamentos Quarentenários. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importancia econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado**. Holos: Ribeirão Preto, 2000.

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

DUTTA, I.; SAHA, P.; MAJUMDER, P.; SARKAR, A.; CHAKRABORTI, D.; BANERJEE, S.; DAS, S. The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, [S.I.], v. 3, n. 6, p. 601-611, 2005.

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

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

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

FAOSTAT-FAO STATISTICS DIVISION ProdSTAT: Crops. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em 06 jan 2010.

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

FILHO, P. F.; ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L. D., Fruticultura Brasileira: A busca de um modelo exportador. In Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES: Rio de Janeiro, 1999.

FINNEY, D. J., **Probit analysis**. Cambridge University Press. Cambridge, England, 1971.

FLETCHER, B. S.; PROKOPY, R. J., Host location and oviposition in tephritid fruit flies. In: BAILEY, W. J.; RIDSDILL-SMITH, J. **Reproductive Behaviour of Insects: Individuals and Populations**. Chapman & Hall: New York, 1991. p. 139-171.

FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MAGALHAES, C. P.; MONTEIRO, A. C. S.; BLOCH, C.; MELO, F. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 81-89, 2004.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; MENDES, P. A.; PAES, N. S.; YOKOYAMA, M.; COUTINHO, M. V.; BLOCH, C.; GROSSI-DE-SA, M. F. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* alpha-amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 53, n. 5, p. 1585-1590, 2005.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH, C.; SILVA, C. P.; DE SA, M. F. G. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, [S.l.], v. 267, n. 8, p. 2166-2173, 2000.

GATEHOUSE, A. M. R.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; BABBE, S. M.; NEWELL, C. A.; GATEHOUSE, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, [S.l.], v. 45, n. 6, p. 545-558, 1999.

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

GEIER, P. W. Management of Insect Pests. **Annual Review of Entomology**, [S.l.], v. 11, n., p. 471, 1966.

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

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

GOMES, A. D. G.; DIAS, S. C.; BLOCH, C.; MELO, F. R.; FURTADO, J. R.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F.; FRANCO, O. L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, [S.l.], v. 140, n. 2, p. 313-319, 2005.

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

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

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

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

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

GUPTA, G. P.; BIRAH, A.; RANI, S. Effect of plant lectins on growth and development of American bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 75, n. 4, p. 207-212, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

HUNG, H. C.; JOSHIPURA, K. J.; JIANG, R.; HU, F. B.; HUNTER, D.; SMITH-WARNER, S. A.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, [S.l.], v. 96, n. 21, p. 1577-1584, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp?o=20&i=P>>. Acesso em 06 jan 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. **Exportação por país de destino**. Disponível em: <www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>. Acesso em 06 jan 2010.

IHERING, H., Laranjas bichadas. **Rev. Agrícola**, [S.l.], p 179-181, 1901.

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

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, [S.l.], v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.

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

KIELY, T.; DONALDSON, D.; GRUBE, A. Pesticides Industry Sales and Usage: 2000 and 2001 Market Estimates. In Ed. **U.S. Environmental Protection Agency. Office of Prevention, P., and Toxic Substances**, 2004.

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

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

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

KRAINACKER, D. A.; CAREY, J. R.; VARGAS, R. I. Effect of Larval Host on Life-History Traits of the Mediterranean Fruit-Fly, *Ceratitis capitata*. **Oecologia**, [S.l.], v. 73, n. 4, p. 583-590, 1987.

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

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

KRISHNAVENI, S.; LIANG, G. H.; MUTHUKRISHNAN, S.; MANICKAM, A. Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. **Plant Sci**, [S.l.], v.144 (1), p.1-7, 1999.

LACERDA, M. A. D.; LACERDA, R. D.; ASSIS, P. C. O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de biologia e ciências da terra**, [S.l.], v. 4, n. 1, 2004.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, [S.l.], n. 227, p. 680-685, 1970.

LEHANE, M. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, [S.l.], v. 42, p. 525-550, 1997.

LIMA, I. S., Semioquímicos das moscas-das-frutas. In: VILELA, E. F.; LUCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas.** Ribeirão preto: Holos, 2001. p. 121-126.

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

MACEDO, L. L. P. **Atividades de frações proteicas de *Erythrina velutina* sobre o desenvolvimento larval de *Ceratitis capitata* (diptera: tephritidae).** 2005. 74 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

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

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

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

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

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S.l.], v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MALAVASI, A. Aspecto da biologia populacional e genética de *Anastrepha* (Diptera:tephritidae) na região de Ribeirão Preto - São Paulo. Tese de doutorado, IB/USP, São Paulo, SP, 1977.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Biologia de “moscas – das - frutas” (Diptera : Tephritidae). II: Índice de Infestação em diferentes hospedeiros e localidades. **Revista Brasileira de Biologia**, [S.l.], v. 40, p. 17-24, 1980.

METCALF, R., Biography of the medfly. In: MORSE JG; METCALF RL; JR, C.; RV, D. **The Medfly in California: Defining Critical Research**, Eds. University of California, Center for Exotic Pest Research: Riverside, California, 1995. p. 43–48.

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

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

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C., Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 59, n. 5. p. 783-787. 1977.

MORGANTE, J. S., Moscas-das-frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle. In *Boletim Técnico*, Brasília, 1991; Vol. 2, p 19.

MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, L. L. P.; VIANNA, A. L. B. R.; ANDRADE, L. B. S.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, E. A.; DE SALES, M. P. Effects of a chitin binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 260-266, 2007.

MOURA, F. T. **Vicilinas de sementes de leguminosas selvagens: purificação, caracterização, efeito deletério e mecanismo de ação para bruquídeos e fungos fitopatogênicos**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

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

NANDI, B. K.; BHATTACHARJEE, L. In Why Fruits and Vegetables? Their contribution to improving nutrition in Developing countries, **FAO Sub Regional Workshop on Quality and Safety of Fresh Fruits and Vegetables**. FAO: 2005.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. D. S., Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importancia econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

NASCIMENTO, A. S.; MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; DUARTE, A. L. A. Hot-Water Immersion Treatment for Mangoes Infested with *Anastrepha-Fraterculus*, *Anastrepha-Obliqua*, and *Ceratitis-Capitata* (Diptera, Tephritidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 85, n. 2, p. 456-460, 1992.

NISHIDA, T. Food System of Tephritid Fruit-Flies in Hawaii. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 245-254, 1980.

NISHIDA, T.; BESS, H. A.; OTA, A. Comparative Effectiveness of Malathion and Malathion-Yeast Hydrolysate Bait Sprays for Control of the Melon Fly. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 50, n. 5, p. 680-684, 1957.

NORRBOM, A. L. **Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Classification & Diversity**. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Tephclas.htm>>. Atualizado em 17/12/2004. Acessado em 07 jan 2010,

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W.; F, S.; A, W., **Crop Production and Crop Protection - Estimated Losses In Major Food and Cash Crops**. Elsevier: Amsterdam, 1994.

OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; ANA H. A. MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH JR., C.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SALES, M. P. Activity toward Bruchid Pest of a Kunitz-Type Inhibitor from Seeds of the Algaroba Tree (*Prosopis juliflora* D.C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.l.], 72, 122–132, 2002.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S. AND SALES, M. P. Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 55. p. 7342-7349. 2007

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

PEREIRA, B., Altos e baixos - Mercado internacional. Frutas e Derivados - **Instituto Brasileiro De Frutas - IBRAF** Dez 2006, p 20, 2006.

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

RAMOS, M. V., FREITAS, C. D. T., STANISÇUASKI, F., MACEDO, L. L. P., SALES, M. P., SOUSA, D. P., CARLINI, C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, [S.l.], n. 173, p. 349–357, 2007.

RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B., Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **SciELO**, [S.I.], vol. 39, p 263-270, 2006.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am J Clin Nutr**, [S.I.], v. 78, n. 3 Suppl, p. 559-569, 2003.

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

SAGIV, S. K.; TOLBERT, P. E.; ALTSHUL, L. M.; KORRICK, S. A. Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. **Epidemiology**, [S.I.], v. 18, n. 1, p. 120-129, 2007.

SALES, M. P.; MACEDO, M. L. R. & XAVIER-FILHO, J.. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain, and brichid midgut proteinases. **Comp. Biochem. And phisiol**, [S.I.], v. 103B, p. 945 – 950, 1992.

SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, J. Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.I.], v. 29, n. 3, p. 319-326, 1996.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, [S.I.], v. 124, n. 2, p. 515-522, 2000.

SALES, M. P., PIMENTA, P. P., PAES, N. S., GROSSI-DE-SÁ, M. F., XAVIER-FILHO, J. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Braz. J. Med. Biol. Res**, [S.I.], n. 34, p. 27-34. 2001.

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. 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**, [S.I.], n.142 (A), p. 422 – 426. 2005.

SALLES, L. A., Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importancia econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado**. Holos: Ribeirão Preto, 2000a.

SALLES, L. A., Manejo Integrado de Pragas em Pomares de Frutíferas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos** UFSM/CCR/DFS; Palloti: Santa Maria, 2000b. p. 219-226.

SAN ANDRES, V.; ORTEGO, F.; CASTANERA, P. Effects of gamma-irradiation on midgut proteolytic activity of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera :

Tephritidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 11-19, 2007.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. D. A.; ARAGAO, K. S.; de OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. D. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. D. O.; DE ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, [S.l.], v. 350 (4), p. 1050–1055, 2006.

SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. A chitinase from *Adenantha pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. **Plant Science**, [S.l.], v. 167, n. 6, p. 1203-1210, 2004.

SAWADA, S.; YANAGA, Y.; TASHIRO, M. Structure and stability of alpha-amylase inhibitors from the seeds of Shirohanamame (*Phaseolus coccineus* L.), Murasakihanamame (*Phaseolus coccineus* L.), Toramame (*Phaseolus vulgaris* L.) and Uzuramame (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, [S.l.], v. 53, n. 10, p. 534-541, 2006.

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

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR - SECEX. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Acesado em 07 jan 2010.

SHARP, J. L.; PICHOMARTINEZ, H. Hot-Water Quarantine Treatment to Control Fruit-Flies in Mangoes Imported into the United-States from Peru. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 83, n. 5, p. 1940-1943, 1990.

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

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

SILVA, F. C. B. L.; ALCAZAR, A.; MACEDO, L. L. P.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; ABREU, L. R. D.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 36, n. 7, p. 561-569, 2006.

SILVA, O. L. R. E., Controle do trânsito de hospedeiros de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importancia econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

- SIVANESAN, S. D.; KRISNAMURTHI, K.; WACHASUNDER, S. D.; CHAKRABARTI, T. Genotoxicity of pesticide waste contaminated soil and its leachate. **Biomedical and Environmental Sciences**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 257-265, 2004.
- SUN, S. M.; SLIGHTOM, J. L.; HALL, T. C. Intervening Sequences in a Plant Gene - Comparison of the Partial Sequence of Cdna and Genomic DNA of French Bean Phaseolin. **Nature**, [S.l.], v. 289, n. 5793, p. 37-41, 1981.
- TAIRA, T.; YAMAGAMI, T.; ASO, Y.; ISHIGURO, M.; ISHIHARA, M. Localization, accumulation, and antifungal activity of chitinases in rye (*Secale cereale*) seed. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, [S.l.], v.65 (12), p. 2710–2718, 2001.
- TELLAM, R. L.; EISEMANN, C. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 30, n. 12, p. 1189-1201, 2000.
- TELLAM, R. L.; EISEMANN, C. H. Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-instar larval antigens. **International Journal for Parasitology**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 439-450, 1998.
- TERRA, W.; FERREIRA, C.; BAKER, J., Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, J.; BILLINGSLEY, P. **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman and Hall, 1996. p. 206-233.
- TERRA, W. R. Physiology and Biochemistry of Insect Digestion - an Evolutionary Perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 21, n. 4, p. 675-734, 1988.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, [S.l.], v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.
- TIERNEY, M. L.; BRAY, E. A.; ALLEN, R. D.; MA, Y.; DRONG, R. F.; SLIGHTOM, J.; BEACHY, R. N. Isolation and Characterization of a Genomic Clone Encoding the Beta-Subunit of Beta-Conglycinin. **Planta**, [S.l.], v. 172, n. 3, p. 356-363, 1987.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, [S.l.], v. 292, n. 5515, p. 281-284, 2001.
- URAMOTO, K. **Diversidade de moscas-das-frutas (Diptera, Tephriidae) em pomares comerciais de papaia e em áreas remanescentes da Mata Atlântica e suas plantas hospedeiras nativas, no município de Linhares, Espírito Santo**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Espírito Santo, 2007.

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

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S.I.], v. 47, n. 2, p. 110-118, 2001.

WEBER, K.; OSBORNE, M. The reability of molecular weight determination by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel eletroforesis. **Journal of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WEEMS, H. V. J., Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae). In **Entomology Circular. Fla. Dept. Agric. and Consumer Serv., Division of Plant Industry**, 1981.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M., **Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics** CAB International: Wallingford, 1992; p 600.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. [S.I.], 2002.

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **The world report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fruit and vegetable promotion initiative**. Geneva, 2003a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO and FAO announce a unified approach to promote fruit and vegetable consumption**. Geneva, 2003b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **The world health report 2003 - shaping the future**. Geneva, 2003c.

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

XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Proteinase Inhibitors. In: **Toxicants of Plant Origin**, [S.I.], v III, Cap. 1, Cheeke, P. R. Ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989.

XAVIER-FILHO, J., Sementes e suas defesas contra insetos. In: **Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos**. Organização dos Estados Americanos (OEA): 1993. p. 1-31.

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

ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Dip., Tephritidae) no Brasil: taxonomia, distribuição geográfica e hospedeiros. In: **ENCONTRO SOBRE MOSCAS-DAS-FRUTAS**. Campinas: Fundação Cargill, 1988.

ZUCCHI, R. A., Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 13-24.

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](#)