



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



JOSÉ THALLES JOCELINO GOMES DE LACERDA

**ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE PROTEASE DA LECTINA DE SEMENTES DE
ABELMOSCHUS ESCULENTUS L. (MOENCH) E SEUS EFEITOS SOBRE
CERATITIS CAPITATA, *MELOIDOGYNE JAVANICA* E *MELOIDOGYNE
INCOGNITA***

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

João Pessoa – PB

2015



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



JOSÉ THALLES JOCELINO GOMES DE LACERDA

**ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE PROTEASE DA LECTINA DE SEMENTES DE
ABELMOSCHUS ESCULENTUS L. (MOENCH) E SEUS EFEITOS SOBRE
CERATITIS CAPITATA, *MELOIDOGYNE JAVANICA* E *MELOIDOGYNE
INCOGNITA***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Ciências Exatas e
da Natureza, Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR.**

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha

João Pessoa - PB

2015

L131a Lacerda, José Thalles Jocelino Gomes de.

Atividade de inibição de protease da lectina de sementes de *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) e seus efeitos sobre *Ceratitis capitata*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* / José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda.- João Pessoa, 2015.

89f. : il.

Orientadora: Tatiane Santi Gadelha

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. *Abelmoschus esculentus*(AEL). 3. Atividade catalítica. 4. *Ceratitis capitata*. 5. Nematóide de galha. 6. Fungos.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



JOSÉ THALLES JOCELINO GOMES DE LACERDA

Dissertação de Mestrado avaliada em 10/04/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Tatiane Santi Gadelha (PPGBCM/DBM/UFPB)

Orientadora

Prof. Dr. Jacinto de Luna Batista (PPGA/CCA/UFPB)

Examinador externo

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias (PPGBCM/DBM/UFPB)

Examinador interno

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha (PPGBCM/DBM/UFPB)

Suplente interno

Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (PGPNSB/DCF/UFPB)

Suplente externo

Aos meus pais (Tiburcio Jocelino Neto e Mônica Maria Gomes Lacerda), pela educação e apoio dado. As minhas filhas (Laura da Paz Gomes de Lacerda e Maria Júlia Carvalho de Lacerda) que são fontes de inspiração para enfrentar obstáculos impostos pela vida.

Dedico,

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me possibilitou chegar à este momento, se mostrando presente em todas etapas e vitórias na minha vida, conquistada com muito esforço e trabalho.

Aos meus pais, que me proporcionaram, com muito esforço, uma educação de qualidade, sempre afirmando que o maior bem que os pais podem deixar é a educação.

Às minhas filhas Laura e Júlia, que inconscientemente, mantiveram-me firme durante todo este processo.

À minha namorada Talita, que me acompanhou em boa parte do processo deste trabalho, incentivando-me, sempre com muito carinho e dedicação.

À minha orientadora, professora Dra. Tatiane Santi Gadelha, pela confiança e por ter me proporcionado um enorme aprendizado profissional e pessoal.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, pelo aprendizado e amizade, em especial, ao Dr. Carlos Alberto que sempre se fez presente no desenvolvimento do meu trabalho acreditando no meu potencial e ao Dr. Sávio Torres de Farias pelo conhecimento transmitido e colaboração.

Aos meus amigos, Steno, Camila e Edilza, pela confiança e por estarem presentes ajudando à superar as adversidades.

Aos colegas da turma 2013.1 da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo trabalho em grupo e amizade construída.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pela assistência concedida para desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal da Paraíba, onde obtive minhas grandes realizações profissionais: graduação e mestrado.

À CAPES, pelo financiamento concedido

RESUMO

Lectina é um grupo de proteínas capaz de reconhecer e se ligar a carboidratos de forma reversível sem modifica-los por domínio não catalítico. Em vegetais, são sintetizadas como fator de resistência contra fitopatógenos por reconhecer estruturas presentes nestes parasitas e e suas características estruturais, catalíticas e carboidrato-específicos fornecem informações sobre seus mecanismos de ações em diferentes espécies de parasitas. O objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade catalítica da lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus* (AEL) e avaliar seus efeitos sobre organismos fitófagos e fitopatógenos para sua utilização como um possível defensivo agrícola. Foram realizadas análises dos peptídeos da AEL por espectrometria de massas para detecção de domínios conservados inerentes a sua propriedade molecular e realização de atividade de inibição de proteases e ensaios de toxicidade em mosca de fruta *Ceratitis capitata* e nematoides de galha *Meloydogine javanica* e *Meloydogine incógnita*, nos seus diferentes estágios de desenvolvimento através de aplicação tópica e avaliação de sua atividade fungistática sobre fungos fitopatogênicos, AEL apresentou em sua composição regiões homólogas à inibidores de protease do tipo *kunitz*, com identificação de 03 peptídeos conservados nesta classe de proteínas e atividade de inibição de protease (92%), os quais revelam sua função catalítica e direcionam seus mecanismos de ações nos diferentes parasitas. Apresentou efeito inseticida sobre larvas 3º instar e pupa, apresentou efeito nematicida sobre os nematoides de galhas, atuando principalmente sobre a eclosão das larvas, mas não apresentou atividade fungistática.

Palavras-chave: AEL, atividade catalítica, *Ceratitis capitata*, nematóide de galha, fungos

ABSTRACT

The lectins are proteins capable of recognize and bond reversibly to carbohydrates without modifying them by a non-catalytic domain. In vegetables, they are synthetized as resistance factors against phytopathogens, and since they recognize structures present in the parasites, for their structural, catalytic and carbohydrate-specific characteristics give information on the action mechanisms against different parasitic species. Our study feature its catalytic activity of the lectin extracted from *Abelmoschus esculentus* (AEL) and evaluated their effects on phytophagous and phytopathogens for its application as a potential as crop protection and. We performed peptide analysis from AEL using mass spectrometry to determine conservative domains inherent to its molecular properties and protease activity inhibition toxicity, essays toxicity on the fruit fly *Ceratitis capitata* and root knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on their different development stages through topical application, fungistatic activity on phytopathogenic fungi. AEL presents in its composition regions that are homologous to kunitz-type protease inhibitors, with the identification of conserved peptides for this class of proteins and protease inhibition activity (92%), which reveal its catalytic function and direct their action mechanisms on the different phytopathogens. It's displayed insecticide effect on 3rd instar larvae and pupae, nematocide effect for the root knot nematodes acting mainly in larve hatched but did not presented fungistatic activity.

Keywords: AEL, catalytic activity, *Ceratitis capitata*, root knot nematodes, fungi

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEL	Lectina <i>Abelmoschus esculentus</i>
AFAL	Lectina <i>Acacia farnesiana</i>
ASAL	Lectina <i>Allium sativum</i> L
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosina Trifosfato
CDPK	Quinase dependente de ciclina
CIM	Concentração inibitória mínima
Cm	Centímetro
DB	Data Bank
B.O.D	Demanda bioquímica de Oxigênio
ddH ₂ O	Água deionizada
DEAE Sephacel	Coluna cromatográfica troca iônica (diethylaminoethyl)
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EF-1 α	Fator de elongação 1 α
EF-Tu	Fator de elongação bacteriano
ETI	Imunidade efector-dependente
EV	Endovenosa
FAS	Receptor pró-apoptótico
FAK	Quinase adesão focal
g	Gramma

GNA	Aglutinina <i>Galanthus nivalis</i>
GDH	Glutamato Desidrogenase
HCl	Ácido clorídrico
HJ	Hormônio juvenil
HR	Reação de hipersensibilidade
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
J2	Juvenil de 2° estágio
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
LC/MS	Espectrometria de massa/cromatografia líquida
LAA	Lectina <i>Lutzelburgia auriculata</i>
LPR	Receptores ligantes de proteínas
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
mg	Miligrama
m/v	massa/volume
mL	mililitros
OP	Organofosforados
PAMPs/MAMPs	Padrões moleculares associados à microorganismos
PGN	Peptideoglicanos
PI-3K	Fosfatidil-inositol 3'-quinase
PRRs	Receptores de reconhecimento de patógeno
PTI/MTI	Imunidade PAMP/MAMP-dependente

PPTH	Hormônio prototorácico
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RVL	Lectina <i>Remusatia vivípara</i>
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SKP1	Proteína quinase da fase S1
SNA-I	Lectina <i>Sambucus nigra</i>
TCTP	Proteínas tumorais controladores de tradução
TRIS	Tampão TRIS
w/v	Unidade de diluição (água/volume)
U	unidade (quantitativo)
UDA	Lectina <i>Urtica dioica</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
URM	Micoteca
μ	microgramas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida da mosca de fruta (<i>Ceratitis capitata</i>)	18
Figura 2	Anatomia do sistema endócrino presente no cérebro da mosca responsável pelo controle hormonal	20
Figura 3	Controle hormonal realizado pelo hormônio juvenil e ecdisona nas diferentes fases de desenvolvimento	21
Figura 4	Estágio de desenvolvimento do nematoide de galha <i>Meloidogyne incognita</i> e anatomia do estágio infectante	23
Figura 5	Mecanismo de infecção desencadeada pelos nematóides <i>Meloidogyne spp</i> sobre células vegetais	24
Figura 6	Produção do fator de alongação 1 α pelo nematóide <i>Meloidogyne incognita</i> raiz de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i>) e formação de células gigantes	25
Figura 7	Representação da parede celular de fungos filamentosos.	26
Figura 8	Imunidade inata da planta mediante parasitismo	31
Figura 9	Aumento de produção de lectina em <i>Nicotiana tabacum</i> mediante indução de parasitismo pela larva <i>Spodoptera littoralis</i>	32
Figura 10	A. Lectina extraída de <i>Amaranthus caudatus</i> (Amarantácea); B. Lectina extraída de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA); C. Lectina extraída de <i>Morus nigra</i> (Jacalina).	34
Figura 11	Interação da lectina de <i>Lutzelburgia auriculata</i> com a membrana plasmática do fungo <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	36
Figura 12	Organograma do processo de digestão enzimática da lectina para avaliação analítica de seus peptídeo.	39

ARTIGO

- Figura 1** Peptídeos da AEL encontrados como homólogos do inibidor de tripsina da semente de *Theobroma cacao* 68
- Figura 2** Análise dos MS/MS por *sequenciamento de novo*. (A) Alinhamento convergente da sequência CPELVVQR (98%). (B) Determinação da sequência SWFKLESANVPGSYK a partir do peptídeo com maior ALC e de peptídeos menores 70
- Figura 3** Análise dos MS/MS por *sequenciamento de novo*. (A) Determinação da sequência LCLTSTVSVK baseado confiabilidade da posição dos aminoácidos. (B) Determinação da sequência WLWGAGG baseado confiabilidade da posição dos aminoácidos 71
- Figura 4** Avaliação *in vitro* da atividade inseticida da AEL e dos organofosforados nas fases de larva de 1º instar (A), 2º instar (B), 3º instar (C) e pupa (D) de *Ceratitis capitata* 74
- Figura 5** Avaliação das alterações morfológicas causadas por AEL e organofosforados em *Ceratitis capitata* 75
- Figura 6** Atividade *in vitro* da AEL (0.5 mg/mL) sobre eclosão de larvas dos *M. javanica* e *M. incognita* 77
- Figura 7** Avaliação *in vitro* da atividade da AEL (0.5 mg/mL) sobre larvas juvenis (J2) de *M. javanica* e *M. incognita* 78
- Figura 8** Análise comparativa da atividade da AEL (0.5 mg/mL) sobre a eclosão de larvas e mortalidade de J2 de *M. javanica* e *M. incognita* 79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 <i>Ceratitits capitata</i>	17
2.2 Nematóides de galha (<i>Meloidogyne spp</i>)	21
2.3 Fungos	26
2.4 Mecanismos de defesa das plantas	28
2.4.1 Imunidade inata da planta e produção de lectinas	30
2.5 Usos experimentais de lectinas vegetais contra insetos, nematóides e fungos.....	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Materiais	38
4.1.1 Purificação e isolamento da AEL	38
4.1.2 Redução, alquilação e digestão da AEL.....	38
4.1.3 Coleção de larvas e pupas da mosca de fruta (<i>Ceratitits capitata</i>).....	39
4.1.4 Coleção de ovos e larvas juvenis de segundo estágio (J2) dos nematóides <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	40
4.1.5 Coleção de fungos	40
4.2 Metodologias	40
4.2.1 Análise por cromatografia líquida de alta performace (HPLC) acoplada espectrometria de massas (LC/MS/MS).....	40
4.2.2 Ensaio enzimático para determinar a atividade de inibição tríptica.....	41
4.2.3 Efeito inseticida de AEL em larvas e pupas da mosca de fruta (<i>Ceratits capitata</i>)....	42
4.2.4 Efeito nematicida da AEL - Inibição da eclosão de larvas e mortalidade de juvenis (J2).....	43

4.2.5 Atividade fungistática.....	44
-----------------------------------	----

REFERÊNCIAS

5. RESULTADOS	59
---------------------	----

5.1 ARTIGO - ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE PROTEASE DA LECTINA DE SEMENTES DE <i>ABELMOSCHUS ESCULENTUS</i> L. (MOENCH) E SEUS EFEITOS SOBRE <i>CERATITIS CAPITATA</i> , <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i> E <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>	59
--	----

6. CONCLUSÕES.....	81
--------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Lectina vegetal é um grupo heterogêneo de proteínas com propriedades biológicas relacionadas a capacidade de reconhecer e ligar-se reversivelmente a carboidratos específicos através de um domínio não catalítico (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). São caracterizadas por interagir com monossacarídeos, contudo, sua afinidade com carboidratos simples é geralmente inferior quando comparado às estruturas mais complexas, tais como N-glicanos (MANDAL; KISHORE; BREWER, 1991; GARCIA-PINO et al., 2007). Elas também podem apresentar especificidade por glicoconjugados (galactose e ácido siálico) presentes em organismos fora do reino vegetal, que são menos abundantes ou ausentes em plantas. Estes carboidratos presentes em organismos, como vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos fitófagos, possibilitam o seu reconhecimento e interação por esta classe de proteínas (HOPKINS; HARPER, 2001; RIPOLL et al., 2003; WONG et al., 2010), que as tornam ferramentas importantes em estudos sobre processos fisiológicos e fitopatológicos em plantas e seu uso no controle de pragas.

Devido às variações na eficiência de controle de parasitismo pelas diferenças na concentração do composto ativo entre plantas e, principalmente, os efeitos residuais que apontam à necessidade de várias aplicações destes em períodos curtos (COSTA et al., 2004), a utilização destas moléculas tornam-se mais promissoras quando usadas para indução de resistência em plantas geneticamente modificadas (MACEDO et al., 2015). A lectina de *Oryza sativa* quando expressa de forma heteróloga em *Nicotiana tabacum* foi responsável por causar altos índices de mortalidade em larvas de *Spodoptera exigua* quando as folhas deste vegetal foram introduzidas em sua dieta (AL ATALAH et al., 2014). Apesar da importância do ligante específico e da sua estrutura molecular para compreender suas atividades (VAN DAMME et al., 2008), evidências demonstram que o tamanho da molécula pode ser um fator determinante para descrever seu mecanismo de ação e melhor aplicabilidade (WALSKI et al., 2014). O uso destas proteínas pela biotecnologia pode revelar um promissor controle alternativo à fitoparasitose para reduzir os custos da produção agrícola (POPPY; SUTHERLAND, 2004).

De acordo com as características relacionadas às estas propriedades, a lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus*, um vegetal popularmente conhecido como quiabeiro, pertencente à família Malvaceae e amplamente cultivado na América, Ásia e sul da Europa,

torna-se um instrumento de interesse para este fim. A lectina extraída de *Abelmoschus esculentus* (AEL) apresenta-se como uma proteína monomérica de 10,29 kDa ou como um dímero de 20,58 kDa e tem especificidade por manose, galactose e frutose, descrita com propriedade farmacológicas (SOARES et al., 2012; MONTE et al., 2014).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Ceratitis capitata*

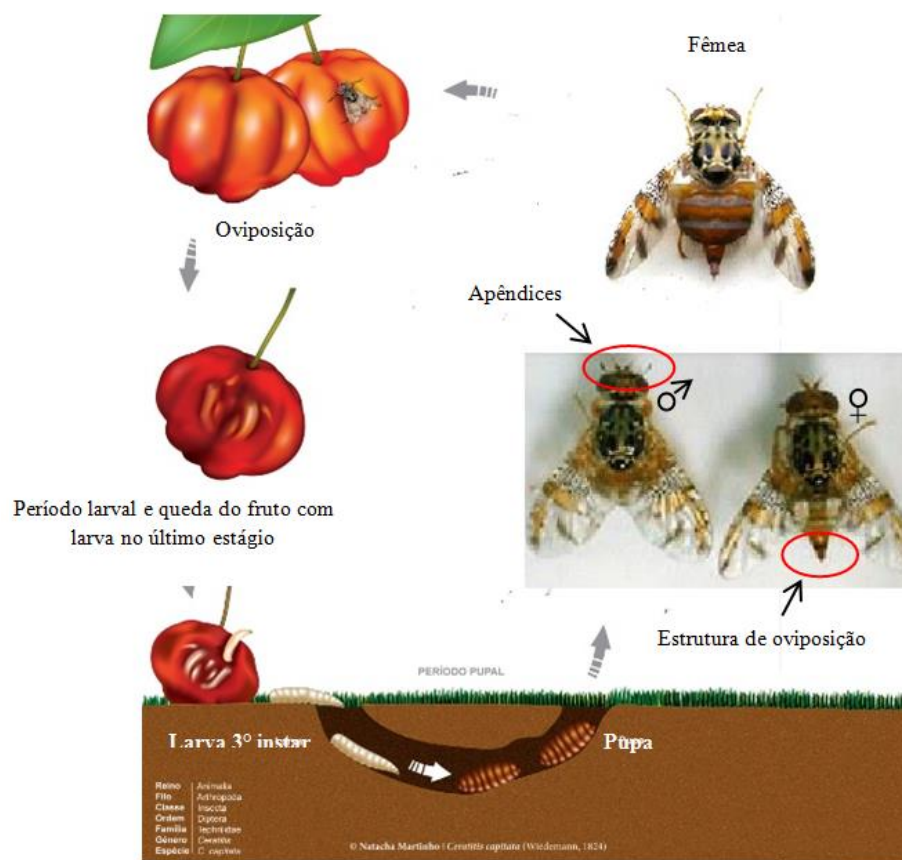
Os insetos fitófagos da família Tephritidae, ordem Dípterae, na fase larval se alimentam de frutos de diversas espécies, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ZUCCHI, 2000a; ZUCCHI, 2000b; GONÇALVES et al. 2006; GARCIA; NORRBOM 2011; RONCHI TELES et al. 2011), do qual pertence o gênero *Ceratitis*, uma das moscas de frutas responsável por grandes perdas econômicas.

No Brasil, o gênero *Ceratitis* é representado unicamente pela espécie *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), conhecida como mosca do mediterrâneo, apresenta grande facilidade adaptativa a climas temperados, ampla variedade de hospedeiros, alta capacidade reprodutiva, grande facilidade de dispersão, portanto, considerada a mais invasora de todos os trefitídeos podendo se desenvolver em mais de 400 espécies de plantas (COPELAND et al., 2002; CORSATO, 2004). É responsável por causar prejuízos aos fruticultores brasileiros devido a deposição de seus ovos pelas fêmeas dentro dos frutos inviabilizando a comercialização (ERENO, 2007), além de perdas causadas pelas exigências do período de quarentena impostas pelos países importadores devido ao risco de introdução de pragas e doenças provenientes das regiões produtoras (VIDAL; SILVA, 2005).

A *Ceratitis Capitata* tem seu ciclo iniciado quando as fêmeas, após o acasalamento, se alimentam de substâncias proteicas e carboidratos até alcançarem a maturidade dos ovos (11 dias), após este período ovipositam no fruto hospedeiro cerca de 300 a 800 ovos (THOMAS et al., 2001). Após o período de incubação (2-6 dias), as larvas eclodem e infiltram-se em direção ao centro do fruto (6-11 dias) e segue um desenvolvimento de larva 1º instar, 2º instar e 3º instar, causando os principais danos ao fruto. Em seu último estágio larval, saem da fruta e as pupas desenvolvem-se no solo (2 a 10 cm de profundidade), evitando possíveis inimigos e adversidades ambientais permanecendo de 9 a 11 dias, ou até 20 dias durante o período de inverno, para a emergência dos adultos. O inseto adulto inicia a procura de alimentos para atingir a maturidade sexual, acasalar-se e proceder à postura de ovos, dando início a um novo ciclo (PEREIRA, 2003). Os machos possuem dois apêndices filiformes em forma de espátula

na região frontal entre os olhos, enquanto as fêmeas apresentam uma estrutura de oviposição na porção inferior (GALLO et al., 2002) (Figura 1)

Figura 1. Ciclo de vida da mosca de fruta (*Ceratitis capitata*). Deposição de ovos no fruto pela fêmea após a maturação sexual e acasalamento; eclosão dos ovos; desenvolvimento larval no fruto; Larva 3º instar (último estágio) cai no solo junto com o fruto para formação da pupa (início da metamorfose); formação e eclosão do adulto



Fonte: Adaptada pelo autor

Durante seu desenvolvimento várias mudanças no padrão bioquímico em cada estágio ocorrem devido à processos metabólicos necessários para um controle energético. Em larvas 1º instar existe um acúmulo de lipídeo responsável por sua imobilização, degradado no decorrer da fase larval para gerar energia suficiente para seu desenvolvimento, chegando no na fase de 3º instar em níveis residuais. Essa degradação resulta num acúmulo de energia na

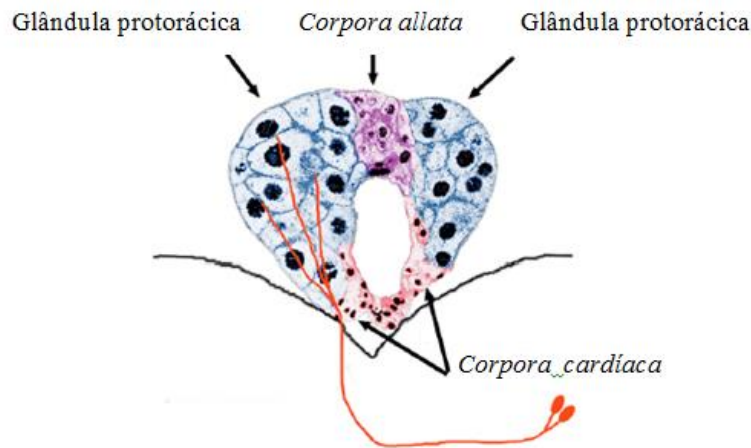
forma de glicogênio, que ainda na fase larval é rapidamente consumido juntamente com carboidratos presentes na hemolinfa (Trealose) (NESTEL et al., 2003).

Ao chegar a fase de pré-pupa, o baixo nível de nutrientes desencadeia a quebra de proteínas para utilização do glutamato como forma de energia em uma reação de oxidação realizada na mitocôndria pela enzima Glutamato Desidrogenase (GDH), a qual gera intermediários para o ciclo Krebs, e tem seus níveis aumentados nesta fase e na posterior para produzir ATP que será utilizado durante a metamorfose. Este balanço energético ocorre em sinergia com o controle hormonal necessário para realização do crescimento e metamorfose da *Ceratitis capitata* (NESTEL et al., 2003)

A regulação hormonal é controlada pelo hormônio juvenil (HJ) e pela ecdisona, que como em todos os insetos, são responsáveis por controlar o crescimento e metamorfose em sua ordem natural (RIDDIFORD; AJAMI, 1973; RIDDIFORD; CHERBAS; TRUMAN, 2001). A ecdisona é um hormônio esteroidal secretado pela glândula protorácica que ao entrar na hemolinfa é convertida em sua forma ativa, 20-hidroxiecdisona (20 E), pela monooxigenase citocromo P450 para ser expressa em outros tecidos (PETRYK et al., 2003). Ela é responsável por iniciar pequenas mudanças durante o período larval e também pela metamorfose, sendo regulada pelo HJ, um sesquiterpeno produzido pela *Corpora allata*, um pequeno agrupamento de células na porção anterior do cérebro (GOODMAN; CUSSON, 2012). O HJ concede a realização destas mudanças, mas previne seu efeito sobre alterações na expressão gênica responsável pela metamorfose durante o período larval garantindo uma proliferação isofórmica necessária para o crescimento (RIDDIFORD, 1994; HIRUMA; RIDDIFORD, 2010) (Figura 2)

No último estágio larval, as reservas energéticas estão escassas e os lipídios encontram-se em baixas concentrações, o que proporciona níveis imperceptíveis de ecdisona, uma vez que sintetizada a partir do colesterol (THUMMEL; CHORY, 2002; CHANUT-DELALANDE et al., 2014;)

Figura 2. Anatomia do sistema endócrino presente no cérebro da mosca de fruta responsável pelo controle hormonal

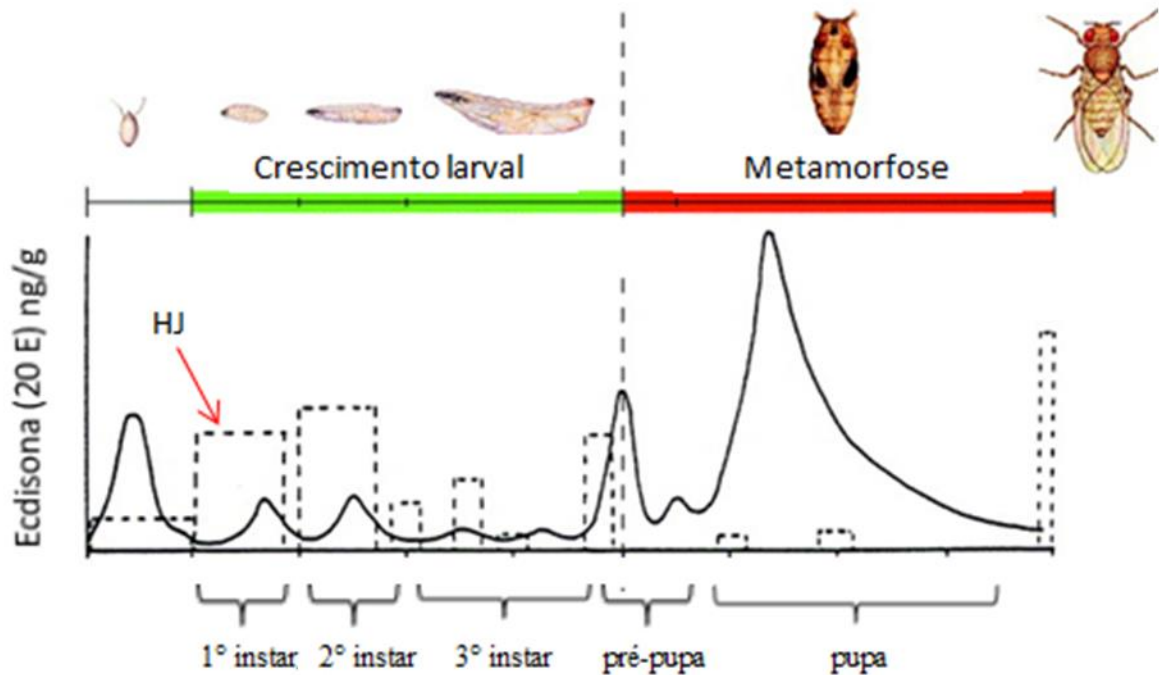


Fonte: TALAMILLO et al. Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. **Development**. 135(9) 1659-68, 2008. Adaptado pelo autor

Na transição entre larva 3º instar e pupa, o HJ diminui à níveis basais por não ser mais produzido e por ação de uma esterase específica liberada na hemolinfa e em tecidos para degradá-lo. Na sua ausência, o hormônio prototorácico (PPTH) é liberado por células neurotransmissoras da *Corpora cardíaca* para hemolinfa e estimula a glândula prototorácica, que sintetiza e libera níveis elevados de ecdisona impedindo a alimentação da larva e as modificações relacionadas ao crescimento (RIDDIFORD, 1978). Os níveis residuais do HJ também podem estar relacionados aos peptídeos ligante de insulina que é produzido nesta fase e é capaz de inibir o HJ para favorecer a formação da pupa (KOYAMA et al., 2008)

Como o HJ é responsável pelo controle da ecdisona, na fase de pré-pupa ela reaparece para prevenir uma metamorfose precoce em alguns tecidos como o olho, lóbulo óptico e diafragma ventral e volta a desaparecer na fase de pupa ocasionando um aumento subsequente da ecdisona (CHAMPLIN; TRUMAN, 1998a; CHAMPLIN; TRUMAN, 1998b; JONES et al., 2012). Este processo culminará na regulação de genes necessários para controlar a apoptose e diferenciação celular que são essenciais para a remoção das estruturas da larva que se tornaram inúteis, remodelação de tecidos e formação do adulto (MAMALI et al., 2007). (Figura 3)

Figura 3. Controle hormonal realizado pelo hormônio juvenil e ecdisona nas diferentes fases de desenvolvimento



Fonte: Adaptado pelo autor.

Atualmente, o controle dos tefritídeos é feito por meio da aplicação de iscas tóxicas a base de proteína hidrolisada associada a um inseticida. Embora o controle seja efetivo, essa tática ocasiona problemas de desequilíbrio ambiental, segurança alimentar (resíduos de agrotóxicos nos frutos) e de ordem fitossanitária (VIDAL; SILVA, 2005).

2.2 Nematóides de galha (*Meloidogyne spp.*)

O Filo Nematoda é um grupo numeroso e diversificado de metazoários, cujas espécies apresentam características morfológicas comuns, como o corpo alongado e cilíndrico, além da presença de um pseudoceloma (WOOD, 1988), e algumas espécies são de grande importância por serem parasitas de plantas (SCHOLL; BIRD, 2005). Estes nematóides são chamados de fitonematóides endoparasitas sedentários e podem pertencer aos gêneros *Heterodera spp.*, *Globodera spp.* (formadores de cisto) e *Meloidogyne spp.* (formadores de galha radiculares), sendo o último o mais prejudicial para a agricultura mundial por ter capacidade de parasitar

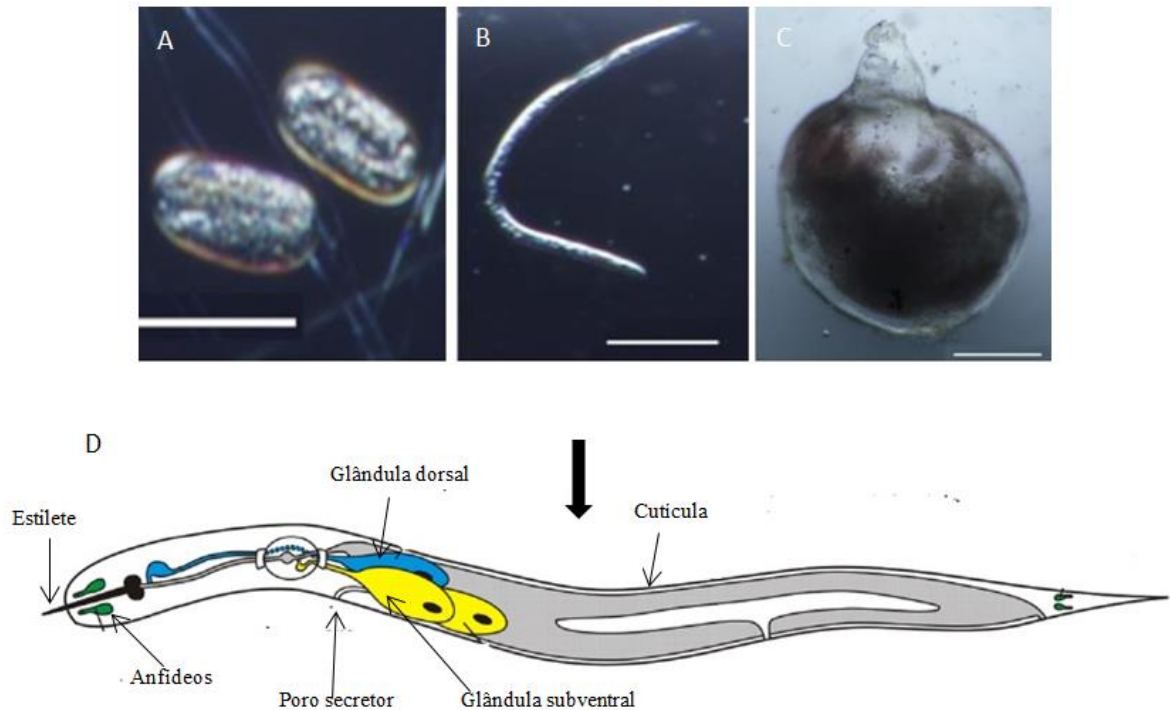
mais de 5500 espécies de plantas (BLOK et al., 2008; DJIAN-CAPORALINO et al., 2012), e causar cerca de 80% das perdas agrícolas (WILLIAMSON; KUMAR, 2006). No Brasil, já foram registradas aproximadamente 100 espécies de nematóides associados a 600 espécies de plantas (EMBRAPA, 2007)

O que torna o gênero *Meloidogyne spp* único é a sua capacidade de interferir no mecanismo intracelular da célula hospedeira, induzir a diferenciação de células da raiz em células gigantes especializadas em fornecer nutrientes para o parasitismo, sem causar a morte celular do hospedeiro, apresenta a capacidade de manter essa interação por 3-6 semanas as quais são necessárias para a conclusão do seu ciclo de vida (CAILLAUD et al., 2008a). A interação começa quando larvas juvenis de segundo estágio (J2s) penetram no ápice da raiz e migram entre as células até atingirem o cilindro vascular perfurando as paredes celulares das plantas com um estilete para facilitar a penetração e migração na raiz da planta, evitar ou neutralizar a resposta de defesa e iniciar ou manter o desenvolvimento de locais de alimentação através da manipulação do metabolismo de seu hospedeiro durante a infecção e dar origem a células gigantes que são diferentes dos outros tipos de células vegetais (DAVIS et al., 2008; GHEYSEN; MITCHUM, 2011; ROSSO et al., 2011). Essas células gigantes são multinucleadas, hipertrofiadas e metabolicamente hiperativas, o que resulta em uma divisão nuclear sem citocinese (CAILLAUD et al., 2008b).

As larvas juvenis não se alimentam até a formação destas células e usam lipídios como reserva energética, os quais são armazenados na porção posterior de seu corpo e são suficientes para sua manutenção (ABAD et al., 2003). Em seguida, os J2s iniciam a alimentação e se desenvolvem em juvenil J3 e J4. Quando as condições de parasitismo são desfavoráveis, o J4 se diferencia em macho adulto e abandona o hospedeiro, porém, quando a interação molecular com a planta é favorável, ocorre diferenciação do J4 em fêmea adulta para alimentar-se de cinco a sete células e completar seu ciclo de vida ao depositar em torno de 2.000 ovos na superfície da raiz. (WILLIAMSON; GLEASON, 2003) (Figura 4)

O parasitismo é desencadeado por proteínas chamadas de efetores que são produzidas por células das glândulas esofágicas (dorsal e subventrais) e são introduzidas no citoplasma da célula vegetal pelo estilete (DAVIS et al., 2008). Como a formação das células gigantes ocorrem em torno de suas cabeças (DAVIS et al., 2008; WILLIAMSON; KUMAR, 2006), sugere-se que as secreções primários para o parasitismo originam-se do poro da glândula subventral (DAVIS et al., 2008) e de seus anfídios (SEMBLAT et al., 2001).

Figura 4. Estágio de desenvolvimento do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* e anatomia do estágio infectante. (A) Ovos; (B) Larva juvenil de segundo estágio; (C) Fêmea adulta; (D) Estrutura anatômica do J2 responsáveis pela infecção e resistência contra imunidade da planta.

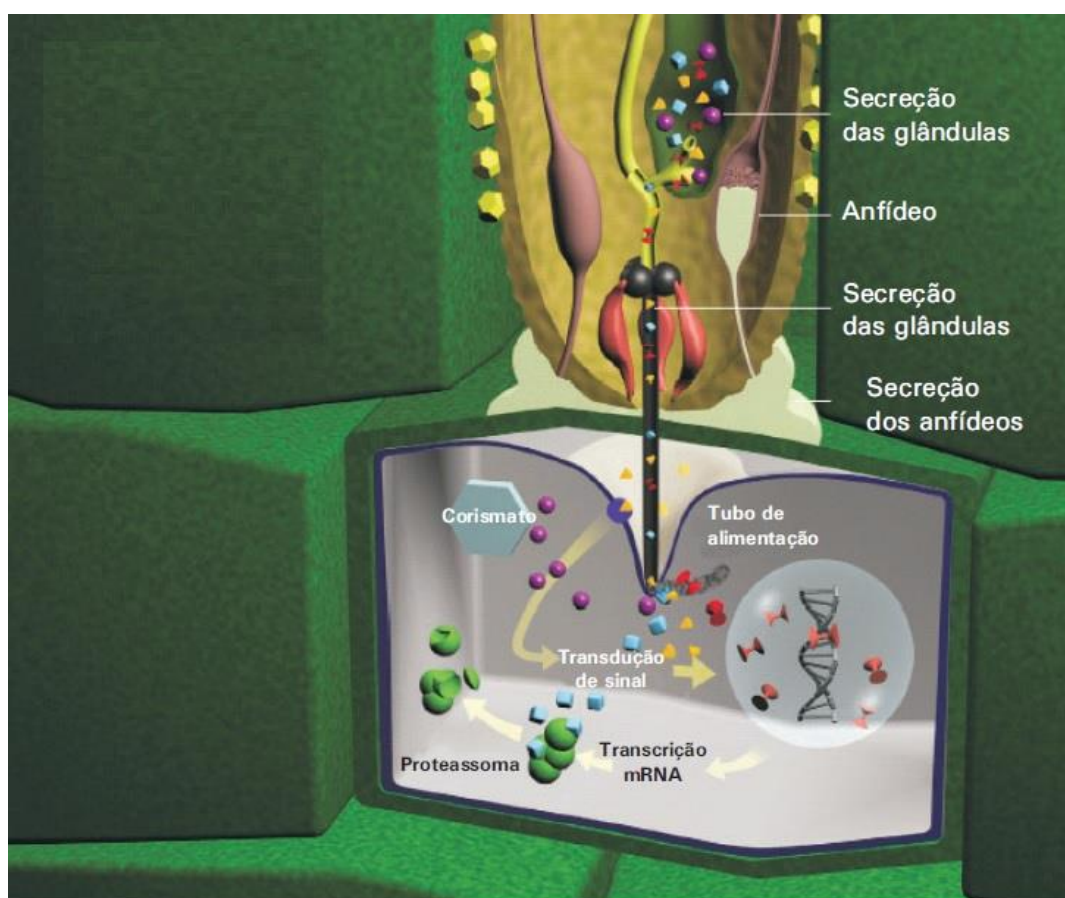


Fonte: (A), (B) e (C): LACERDA, J.T.J.G.; SANTI-GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.A. Lectins and Nematodes: An Alternative Control Strategy in Agriculture. In: **Nematodes comparative genomics, disease management and ecological importance**, editor Lee M. Davis, Nova Science Publishers, ISBN: 978-1-62948-765-6, 2014. (D): HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J.T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, 492(1): 19-31, 2012. Adaptado pelo autor

. As duas células glandulares subventrais são biologicamente ativas durante a fase de J2, enquanto que as da glândula dorsal são predominantemente ativas no segundo dia após a infecção até ao fim da vida do nematóide (BELLAFIORE et al., 2008). Dentre os efetores há uma variedade de enzimas que degradam a celulose e pectina, como a pectinase e proteínas que se ligam a componentes da parede celular, para permitir ou acelerar o processo de digestão como as proteínas de ligação de celulose e expansina que desencadeiam modificações nesta estrutura e sua degradação durante a invasão da raiz (POPEIJUS et al., 2000; QIN et al., 2004; ABAD et al., 2008; HEWEZI et al., 2008; VIEIRA et al., 2011), os que protegem do processo oxidativo realizado pela planta para impedir a infecção chamadas de proteínas de desintoxicação do estresse oxidativo (DOSSs) (MOLINARI; MIACOLA,

1997), além de catalases, tiorredoxinas e peroxidases glutatona (CAMPOS et al., 2005) (Figura 5)

Figura 5. Mecanismo de infecção desencadeada pelos nematóides *Meloidogyne spp* sobre células vegetais. Ação mecânica do estilete, que é utilizado para secreção de efetores em conjunto com os anfídeos e glândulas esofágicas.

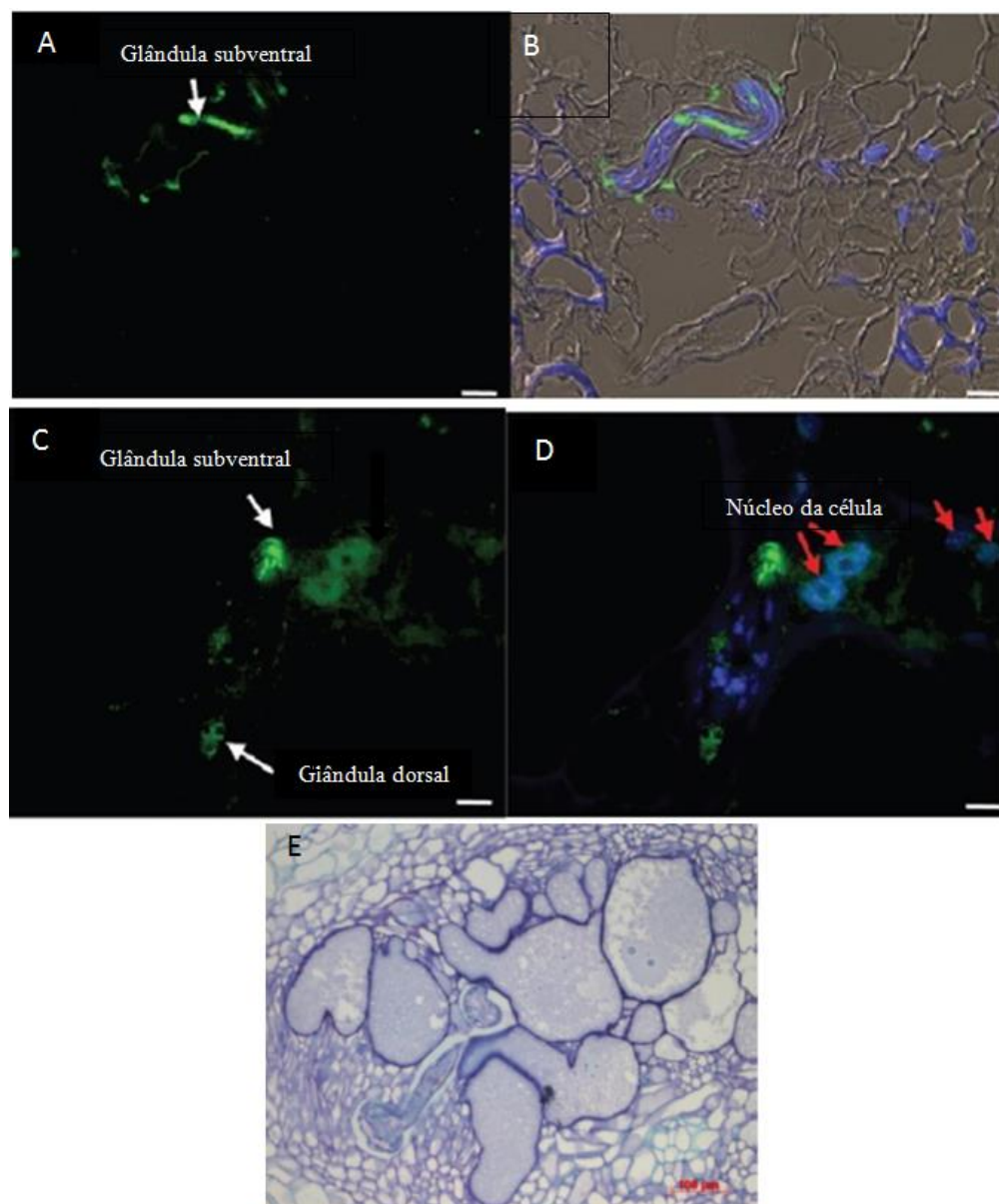


Fonte: ROCHA FRAGOSO, R et al. (2007) **Documentos 198 - Interação Molecular Planta-Nematóide, Planaltina**, DF : Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111. Adaptado pelo autor.

. Outros efetores podem ser direcionados para o núcleo da célula vegetal, onde eles podem regular a expressão de genes como helicases, histona e várias proteínas de ligação de RNA e DNA (BELLAFIORE et al., 2008), proteína quinase da fase S1 (SKP1), proteínas tumorais controladores de tradução (TCTP), proteína quinase dependente de ciclina (CDPK) e fatores de transcrição como o fator de alongação 1 α . (BELLAFIORE et al., 2008) que estão relacionados a proliferação celular responsáveis pela formação de células gigantes e resultar

em alterações morfológicas observadas. Essas proteínas são secretadas apenas após a manutenção da infecção. (Figura 6)

Figura 6. Produção do fator de alongação 1 α pelo nematóide *Meloidogune incognita* raiz de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e formação de células gigantes. (A-B) O efetor (marcado com fluoróforo) é produzido pela glândula subventral antes da infecção intracelular; (C) Após a entrada no espaço intracelular é produzido também pela glândula dorsal; (D) O efetor atinge o núcleo da célula posicionado acima da região labial do nematóide; (E) Formação de células gigantes



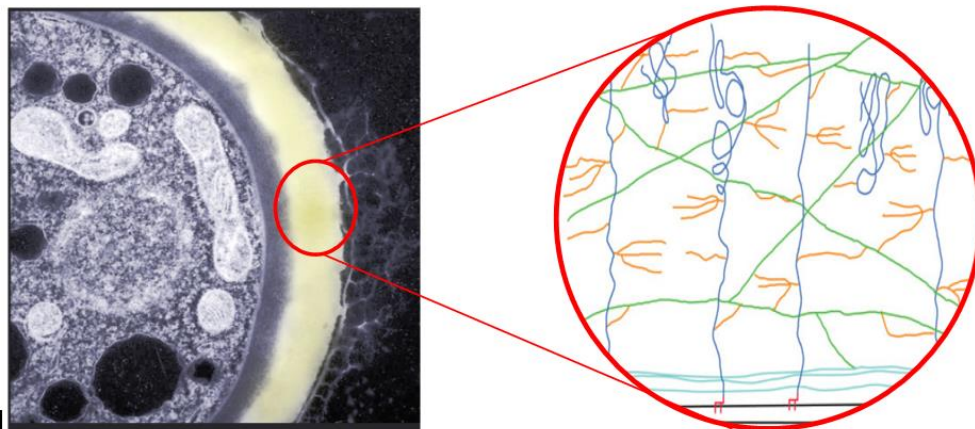
Fonte: JAOUANNET, M et al A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. **New Phytologist**, 194: 924–93, 2012m. Adaptado pelo autor.

A principal forma de controle contra os nematóides de galha é a utilização de nematicidas sintéticos (químicos) que são prejudiciais ao meio ambiente devido sua toxicidade e de baixa eficiência, uma vez que os fitonematóides parasitas apresentam caráter endógeno ficando protegido nas raízes de plantas durante a maior parte do seu ciclo de vida (TRUDGILL; BLOK, 2001).

2.3 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes e heterotróficos incluídos no Domínio Eukarya, no Reino Fungi (DEACON, 2006). Geralmente microscópicos e filamentosos, eles apresentam espessa parede celular constituída por glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente glicanos e quitina, além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol (BOWMAN; FREE, 2006). A composição da parede celular está sujeita a modificações e pode variar dentro de um único isolado de fungos, dependendo das condições e da fase de crescimento. Os componentes de glicoproteínas, glicanos e quitina são extensivamente agrupados para formar uma rede complexa, que constitui a base estrutural da parede celular (BOWMAN; FREE, 2006) (Figura 7)

Figura 7. Representação da parede celular de fungos filamentosos. Presença de proteínas (azul), oligossacarídeos (laranja), β -glicanos (verde escuro), quitina (verde claro)



Fonte: BOWMAN, S. M.; FREE, S. J.. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2006. Adaptado pelo autor.

Fungos fitopatogênicos são estritamente saprofíticos, em sua maioria, vivendo da decomposição de matéria orgânica e estima-se que cerca de cinquenta espécies podem causar doenças em humanos, e mais de dez mil espécies pode vários tipos de plantas (parasitas não obrigatórios) (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007). São capazes de infectar um tecido em qualquer fase de crescimento da planta e mostram ciclos de vida complexos, incluindo ambos os estágios de reprodução sexuada e assexuada, e pode desenvolver seu papel biológico em diferentes condições climáticas para atacar todos os tecidos da planta (AGRIOS, 2005). Por serem filamentosos, são microrganismos mais desenvolvidos e possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada e não septada (cenocítica) e a partir desta, formam-se esporos, para propagação das espécies.

Os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados são representados por *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; GAMS, 2007). Estes microrganismos que tem o solo como habitat natural, são responsáveis por atingem a maioria das culturas de importância econômica por promover danos a órgãos de reserva do vegetal, caule, raízes, sistema vascular, assim como o “tombamento” de plântulas ou podridão de colo, levando à sua morte e repercutindo em prejuízos financeiros para o produtor com reflexo nos preços finais dos produtos (BUENO; FISCHER, 2007).

Os fungos do gênero *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* os principais causadores de infecções adquiridas que ocorrem por fermentos após a colheita manifestando rapidamente sintomas de podridão (OLIVEIRA et al., 2006). Eles diminuem a qualidade dos produtos relacionados ao aspecto, valor nutricional e características organolépticas (AGRIOS, 2004), além de serem responsáveis por causar 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos (DANTAS et al., 2003).

Além disso, em alguns casos, os fungos fitopatogênicos produzem micotoxinas e alérgenos responsáveis por causar diversas patologias, ocorrendo como infecções nosocomiais em indivíduos com sistema imunológico comprometido ou contaminar alimentos (CASE; FUNKE; TORTORA et al., 2010). Estas espécies produtoras de toxinas ocorrem nos principais grupos taxonômicos de fungos e as mais estudadas são as dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Strachybotrys*, *Myrothecium*, *Phoma* e *Diplodia*. Várias estirpes de uma mesma espécie podem produzir diferentes toxinas, enquanto que uma toxina pode ser produzida por vários gêneros de fungos, como a citrinina isolada de

Aspergillus, *Penicillium* e *Pythium*. A ocratoxina produzida pelo gênero *Aspergillus* recebeu atenção devido aos seus efeitos tóxicos, por sua alta incidência em diversos produtos alimentícios e por ter apresentado efeitos nefrotóxicos, cancerígenos e imunotóxicos para todas as espécies de animais testadas (BAU et al., 2005), assim como aflatoxina que desencadeia efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos encontrados em produtos alimentícios economicamente importantes como café, milho, leite, soja têm sido realizados (KLICH, 2002; SOLIMAN et al., 2002). Este composto, juntamente com o tricotecenos, ocratoxinas, zearelona, fumonisinas são as micotoxinas de maior impacto agroeconômico (HUSSEIN; BRASEL, 2001; KUMAR et al., 2008; ZAIN, 2011).

Devido ao surgimento de novas estirpes de fungos fitopatógenos e consequente desenvolvimento de resistência por parte destes microrganismos, muitos fungicidas sintéticos amplamente empregados estão tornando-se gradualmente menos efetivos (PARANAGAMA et al., 2003).

2.4 Mecanismos de defesa das plantas

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um sofisticado e elaborado sistema de defesa diante do grande número de patógenos que as parasitam como fungos, bactérias, ácaros, nematóides, insetos e vírus, contra mamíferos herbívoros ou em resposta ao estresse abiótico. Esse mecanismo de defesa é mediado por reações complexas, e muitas dessas são ativadas em resposta a tais agressores (VERONESE et al., 2003; MONTESINOS, 2003; JONES; TAKEMOTO, 2004; FERREIRA et al., 2007; CHANG et al., 2008). A velocidade com que a planta reconhece a presença do agressor determina a rapidez de sua resposta à invasão. Se a resposta for mais rápida do que o processo de infecção/predação, a planta pode conter o agressor caracterizando uma resistência, entretanto, se a resposta for tardia, uma situação de suscetibilidade ao parasitismo predomina (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; DE WIT, 2007).

As principais estratégias relacionadas à defesa de plantas contra patógenos são as defesas pré-formadas ou constitutivas e as defesas pós-formadas ou induzidas (NÜRNBERGER et al., 2004; FERNANDES et al., 2006). As defesas constitutivas são compostas de estruturas físicas e químicas funcionam como barreiras para conter a invasão

dos parasitas. Estas defesas físicas são representadas por suas estruturas (pêlos, tricomas, espinhos, ceras, parede celular) e as químicas consistem de reações que ocorrem nas células e tecidos vegetais, produzindo substâncias com ação tóxica ao patógeno ou desenvolvem condições adversas ao parasitismo (BOWLES, 1990, OLIVEIRA, et al., 2004). Essas substâncias são representadas por metabólitos primários, como inibidores de protease, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs dos tipos 1 e 2), glico-hidrolases, inibidores de α -amilase, arcelinas, quitinases, canatoxina, ureases e proteínas de estocagem modificadas (MACEDO et al., 2003; FITHERS et al., 2004; FOLLMER, 2008), e por secundários, constituídos de moléculas de baixo peso molecular como, alcalóides, terpenóides, saponinas, iridóides, polifenóis e taninos..

Esses compostos podem apresentar apenas efeitos em um determinado grupo de parasitas, enquanto outros podem atuar contra a ação de mais de um tipo de agente agressor e agir de diferentes maneiras, apresentando efeitos repelentes alimentares ou de oviposição, inibidor de crescimento e tóxico. (LI; CLAEESON, 2003; LAM; NG, 2009).

Outra forma de defesa é caracterizada pelos mecanismos induzidos em resposta à mudança morfológica ou fisiológica resultante da ação de patógenos que desencadeia um mecanismo de defesa conhecido como Resposta Hipersensitiva (HR), que se caracteriza pela falência rápida do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção resultando em necrose e impossibilitando a propagação do patógeno para outros tecidos da planta, interrompendo a manifestação da doença (WANG et al., 1996; LAMB; DIXON, 1997).

Após a HR, a planta também pode desenvolver uma resposta conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), que se caracteriza pela ativação sistêmica de várias classes de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese e pelo desenvolvimento de uma resistência prolongada a infecções causadas por uma gama de patógenos, inclusive por aqueles diferentes do que iniciou o ataque (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; GHOSH, 2009).

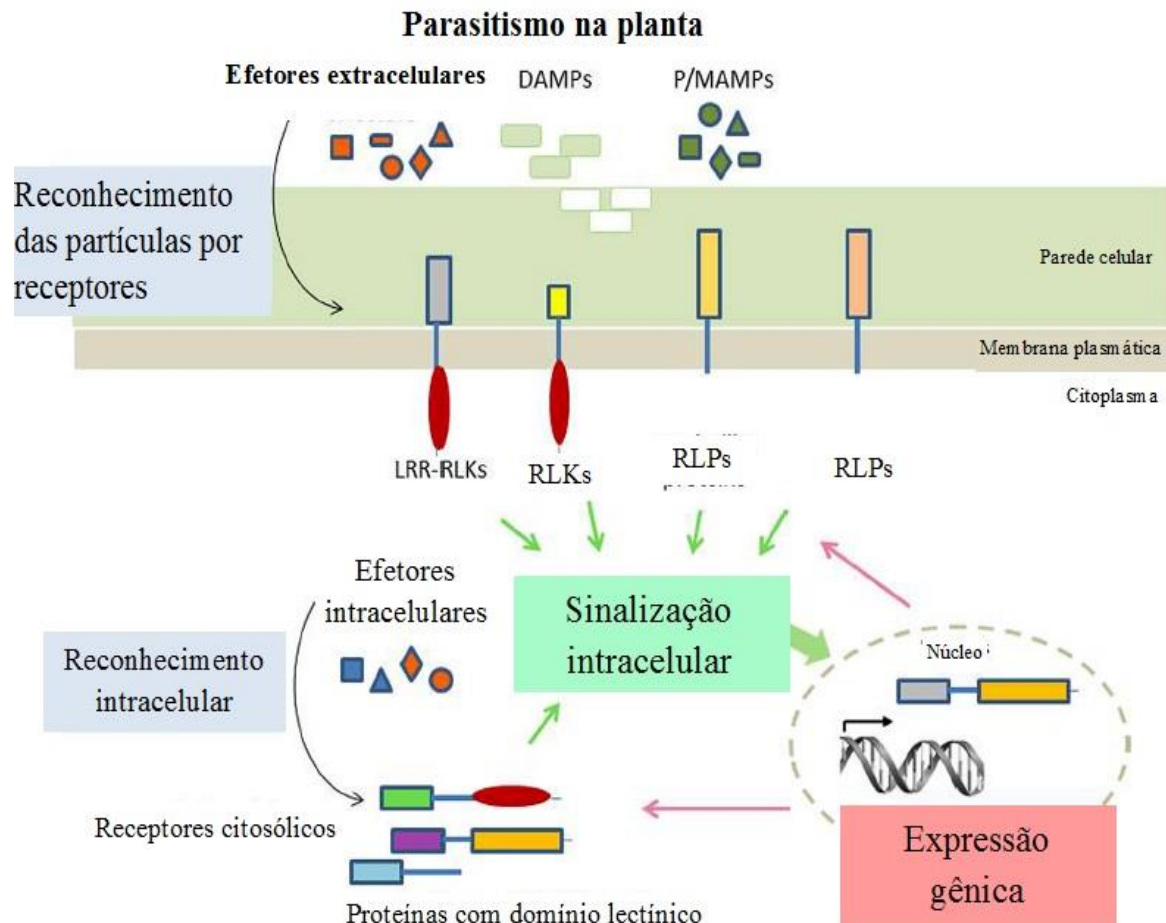
2.4.1 Imunidade inata da planta e produção de lectinas

O primeiro passo na resposta da planta é a percepção do agente patogênico invasor, que ocorre através do reconhecimento de moléculas derivadas do dano celular causada pelo parasita, como oligogalacturonídeos, fragmentos de celulose, monômero de quitina e peptídeos (RYAN, 2000; NÜHSE, 2012; ALBERT, 2013), e também de estruturas patogênicas ou microbianas conservadas, conhecidas como padrões moleculares associados a microrganismos ou patógenos (PAMPs/MAMPs), que são essenciais para sua fisiologia e invasão, como os lipopolissacáridos e peptidoglicanos de bactérias, fatores de alongação bacterianos (EF-Tu), quitinas derivadas de fungos e flagelina de nematóides (LANNO; VAN DAMME, 2014).

O reconhecimento destas moléculas ocorre através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que quando acionados transmitem a informação através de uma cascata de sinalização intracelular para ativação de proteínas quinases, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma reprogramação transcricional da célula vegetal para limitar o crescimento microbiano em um processo conhecido como imunidade desencadeada por PAMP/MAMP (PTI/MTI) (WIRTHMUELLER et al, 2013). Estes receptores podem ser do tipo quinase e apresentar um domínio serina/treonina intracelular (RLK) para iniciar diretamente uma cascata de sinalização ou podem estar presentes apenas com um domínio de reconhecimento extracelular (RLP) e necessitar de uma quinase para transdução de sinal, ocorrendo através de uma formação de heterodímero com um RLK. (BÖHM et al., 2014; HAN et al, 2014; MACHO; ZIPFEL, 2014). (Figura 8)

Esta cascata de sinalização se estende ao núcleo da célula vegetal e leva à expressão de genes específicos de resistência que resultará na produção de proteínas de defesa para reconhecimento (receptores) e bloqueio de partículas infecciosas que conseguiram penetrar no espaço intracelular, resultando em um processo chamado imunidade desencadeada por efetores (ETI) (LANNO; VAN DAMME, 2014).

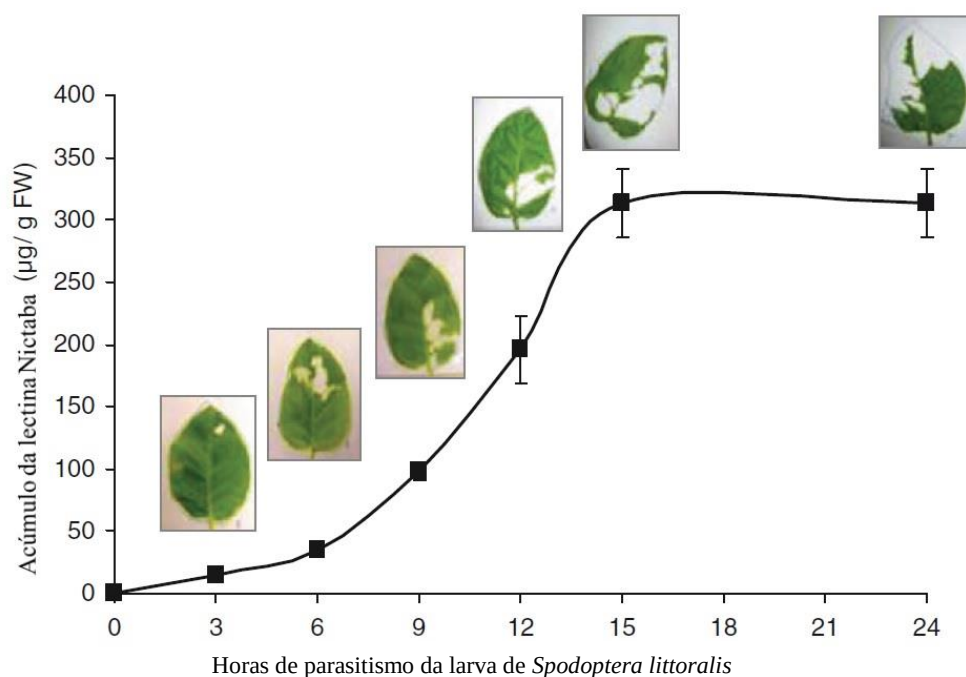
Figura 8 Imunidade inata da planta mediante parasitismo. Reconhecimento de DAMPs e PAMPs/MAMPs por proteínas transmembranares e de partículas infectantes que conseguiram internalizar na célula vegetal por receptores intracelulares, para transdução de sinal e consequente produção de proteínas de defesa



Fonte: LANNOO, N; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in plant science*, v. 5, n. 397, p. 1-16, 2014. Adaptado pelo autor.

Dentre estas proteínas, as lectinas são sintetizadas em quantidades substanciais principalmente em sementes e tecidos vegetais de armazenamento que são susceptíveis à infecção e estão presentes no núcleo e citoplasma da célula. Na ausência destes estímulos, elas são sintetizadas em níveis basais com um peptídeo sinal que é utilizado no seu endereçamento e são secretadas para o espaço extracelular ou estão presentes no vacúolo (LANNOO; VANDAMME, 2010). Estas moléculas apresentam um aumento progressivo de sua concentração à medida que ocorre o parasitismo na tentativa conter a infecção. (VANDENBORRE; VAN DAMME; SMAGGHE, 2009). (Figura 9)

Figura 9. Aumento de produção de lectina em *Nicotiana tabacum* mediante indução de parasitismo pela larva *Spodoptera littoralis*.



Fonte: VANDENBORRE, G; VAN DAMME, E.J.M; SMAGGHE, G. Natural products: plant lectins as important tools in controlling pest insects. In: Ishaaya, I., Horowitz, A.R. (Eds.), **Biorational Control of Arthropod Pests: Application and resistance Management**. Springer Science, pp. 163–187. 2009. Adaptado pelo autor.

Sua funcionalidade está relacionada a sua estrutura molecular que possui um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos e domínios independentes, como quitinase, aerolisina, quinase e Kelch (Van Damme et al., 2008). Este dinamismo contribuiu para que estas moléculas sejam usadas em estudos contra fitopatógenos para viabilizar sua utilização como ferramenta biotecnológica na transgenia vegetal.

2.5 Usos experimentais de lectinas vegetais contra insetos, nematóides e fungos.

Estas proteínas ou glicoproteínas têm sido detectadas, purificadas e isoladas principalmente de semente, como únicas ou múltiplas formas moleculares (SHARON; LIS, 1990; PAIVA; COELHO, 1992; KONOZY et al., 2003). Por apresentarem especificidade também pelos glicoconjugados galactose e ácido siálico, que estão presentes em vírus,

bactérias, fungos, nematóides e insetos fitófagos e que são residualmente produzidos no reino vegetal, possibilitou o seu uso como ferramentas em estudos de processos fisiológicos e patológicos no parasitismo vegetal através da interação com estas diferentes estruturas de carboidratos (RIPOLL et al., 2003; WONG et al., 2010) tornando-as foco de grande interesse para aplicações na agricultura (MOVAFAGH et al., 2013)

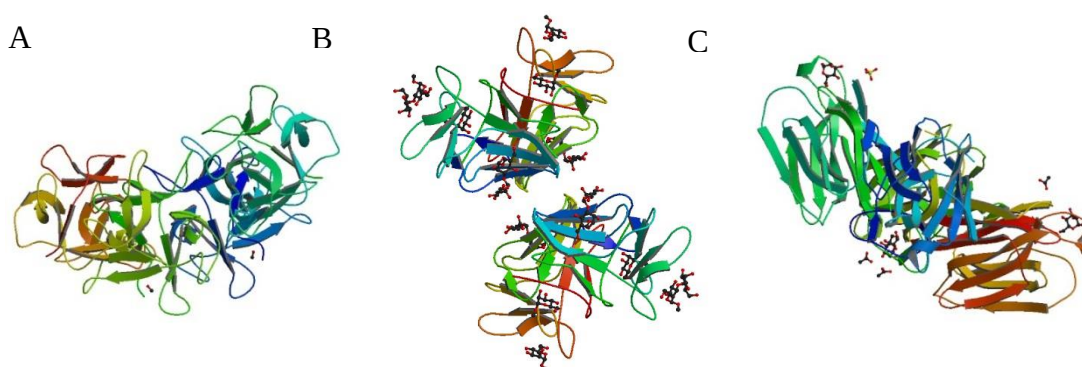
Além de atuarem como reguladores de resistência no interior da célula vegetal, também podem agir através da redução do valor nutricional da planta ou desencadear uma alteração no metabolismo normal de insetos herbívoros (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera) variando desde um atraso no desenvolvimento a altas taxas de mortalidade (CHEN, 2008; VANDENBORRE et al., 2011). As lectinas podem interferir nas funções de enzimas proteolíticas e inibir a digestão e absorção de nutrientes (LEITE et al., 2005; MACEDO et al., 2007), internalizar no epitélio do intestino médio e invadir a hemolinfa atuando sobre proteínas endógenas envolvidas na autodefesa (FITCHES et al., 2001) ou internalizar mediante vesículas endocíticas de células epiteliais e bloquear proteínas relacionadas à proliferação celular (YU et al., 1999).

As atividades inseticidas apresentadas por estas moléculas podem estar relacionadas a seu ligante específico e, portanto, sua toxicidade depende dos perfis de glicosilação dos tecidos dos insetos que variam de acordo com seu estágio de desenvolvimento (AOKI et al., 2007). Assim, diferentes lectinas irão interagir em diferentes estruturas alvos no corpo dos insetos e, portanto, podem ser tóxicas para o estágio de larva, enquanto que tem um efeito menos evidente sobre o inseto adulto (MELANDER et al., 2003; LEHRMAN et al., 2007). As lectinas N-acetil-D-glicosamina específicas ou quitina-ligantes, como a lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva* teve efeito sobre insetos adultos de *Nasutitermes corniger* (SÁ et al., 2008a). A lectina extraída de *Talisia esculenta* (TEL) ligante à quitina, e a manose e glicose, promoveu cerca de 90 % de mortalidade de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (MACEDO et al., 2002). A lectina do cogumelo *Xerocomus chrysenteron* apresenta afinidade para galactose e lactose teve efeito sobre *Drosophila melanogaster* (TRIGUEIROS et al., 2003)..

Os efeitos biológicos sobre os parasitas, interpretados por suas sequências e estruturas terciárias, também proporcionam um maior conhecimento sobre a sua função e o seu papel contra os fitopatógenos (SHARMA; SUROLIA, 1997; CHANDRA et al., 2001; RAVAL et al., 2004). A partir da semelhança de suas sequências, elas podem ser divididas em diferentes

subgrupos de proteínas estruturalmente relacionadas: lectinas relacionadas à família Amarantáceas; lectinas com um domínio Nictaba (*Nicotiana tabacum*); relacionadas à lectina *Aniara Galanthus nivalis* (GNA); lectinas quitina-ligantes contendo domínio heveínico; relacionadas à jacalina; lectinas de leguminosas; e lectinas inativadoras de ribossomo tipo 2 com domínios ricina-B (VAN DAMME et al., 2008). (Figura 10)

Figura 10. (A) Lectina extraída de *Amaranthus caudatus* (Amarantáceas); (B) Lectina extraída de *Galanthus nivalis* (GNA); (C) Lectina extraída de *Morus nigra* (Jacalina)



Fonte: pdb.org. (A) 1JLY; (B) 1NIV; (C) 1XXQ

Essas proteínas estão sendo utilizadas em plantas modificadas geneticamente para reduzir o desempenho do parasitismo pelos insetos através da indução de resistência. A lectina SNA-I (domínio ricina-B), extraída de *Sambucus nigra*, causou redução no parasitismo da larva *Salix exíqua* após ser introduzida em tomateiro (SHAHIDI-NOGHABI et al., 2009). Em efeito semelhante, a lectina ASAL (domínio GNA), extraída de *Allium sativum* L, expressa de forma heteróloga em tomateiro retardou o desenvolvimento da larva de *Spodoptera littoralis* através do comprometimento de sua metamorfose, o que ocasionou letalidade (SADEGHI et al. 2008a).

A utilização de lectinas vegetais em plantas transgênicas também possibilita uma proteção contra nematóides. A lectina extraída de *Galanthus nivalis* (GNA), manose específica, utilizada na produção de espécimes de *Solanum tuberosum* L. apresentou efeito protetor sobre nematóide de cisto *Globodera pallida* (BURROWS et al., 1998) e em *Arabidopsis thaliana* sobre *Meloidogyne incognita* (RIPOLL et al., 2003). Desta forma, as

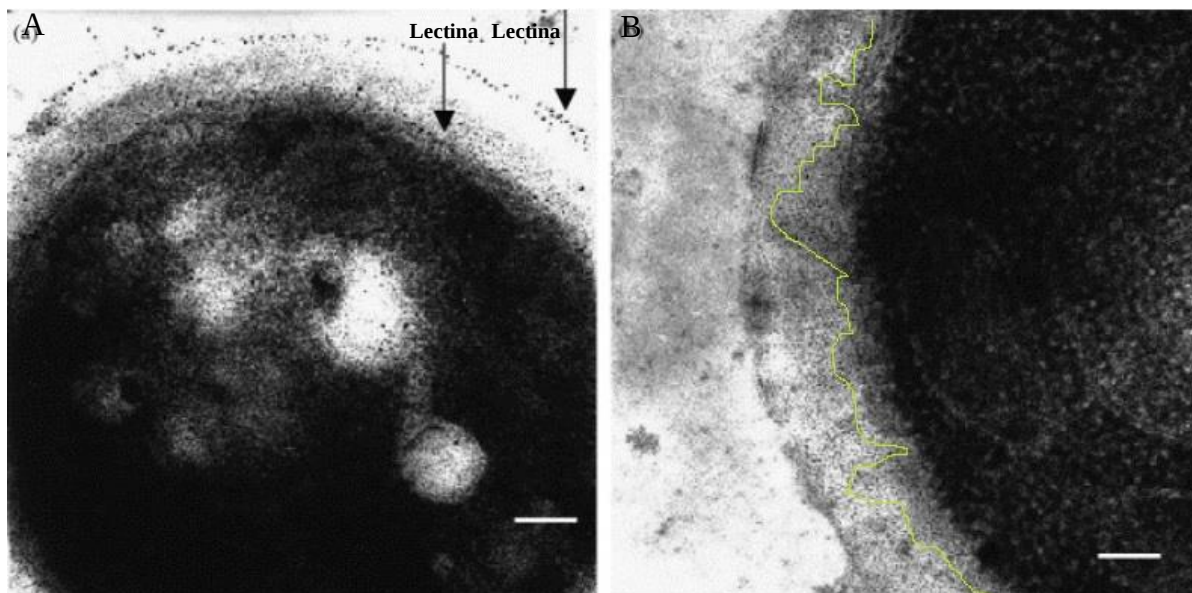
lectinas com especificidade por manose estão sendo exploradas amplamente para a proteção de culturais vegetais por apresentar efeitos sobre estes parasitas. Entretanto, proteínas de ligação à quitina também são descritas como nematicidas, como a lectina da *Acacia farnesiana* (AFAL) que demonstrou atividade sobre *M. incógnita* (SANTI-GADELHA et al., 2011) semelhante à lectina de *Remusatia vivípara* (RVL) manose-específica (BHAT et al., 2010).

A atuação destas proteínas está associada aos bloqueios de quimiorreceptores dos nematóides o que dificulta sua motilidade e diminui sua percepção sobre a localização da planta (MARBAN-MENDONZA et al., 1987). Esses bloqueios estão relacionados à interação de carboidratos de superfícies presentes em órgãos sensoriais e na cutícula, que são essenciais na interação específica entre o nematóide e seu hospedeiro (ZUCKERMANN; JANSSEN, 1984). Uma maior concentração de carboidratos na superfície da cutícula sugere que esta estrutura é responsável por um aumento na percepção de sinais moleculares oriundos da planta (ZUCKERMAN, 1983). Através da dinâmica de glicosilação destes parasitas, as lectinas vegetais podem ser usadas como um controle alternativo para evitar perdas de 125 bilhões de dólares por ano devido esta praga (CHITWOOD, 2003).

Em fungos, a maioria destas moléculas não se mostraram capazes de ligar-se à glicoconjugados presentes na membrana do patógeno ou de penetrar em seu citoplasma devido à parede celular, tendo seu efeito associado à ligação de quitina nesta barreira. Esse mecanismo é desenvolvido pela lectina de *Urtica dioica* (UDA), que foi capaz de inibir o crescimento de diversos fungos por atuar impedindo a síntese e/ou deposição de quitina na parede celular (VAN PARIJS et al., 1992). A ação antifúngica também foi verificada em lectinas do tipo heveínico que mostraram atividade inibitória sobre a germinação de esporos e crescimento de hifas de *Pyrenophore tritici-repentis* (VAN PARIJS et al., 1991).

Entretanto, a lectina extraída de *Lutzelburgia auriculata* (LAA), específica para D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, mostrou-se capaz de ultrapassar a parede celular e promoveu uma ação inibitória sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* e *Sacharomyces cerevisiae* através de sua interação com bombas H⁺ATPases presentes em suas membranas celulares (MELO et al., 2005). (Figura 11)

Figura 11. Interação da lectina de *Lutzelburgia auriculata* com a membrana plasmática do fungo *Sacharomyces cerevisiae*. Visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (A) Presença da lectina e (B) ausência



Fonte: MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; DA CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A Cotyledonary agglutinin from *Lutzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-39, 2005. Adaptado pelo autor.

Apesar de algumas lectinas apresentarem atividade antifúngica, seus efeitos são relativamente baixos quando comparadas a outras proteínas vegetais, como inibidores de proteases (SELITRENNIKOFF, 2001; WONG et al., 2010).

Estudos recentes revelaram que algumas proteínas de sementes apresentam estas duas propriedades biológicas sendo responsáveis por ampliar as formas de interações destas moléculas com diferentes tipos celulares. A lectina extraída de sementes de *Talisia esculenta* que também apresenta a função de inibidor de endopeptidases (FREIRE et al., 2009) foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através de sua função lectínica (FREIRE et al., 2002) e apresentou efeito inseticida sobre *Diatraea saccharalis* através da inibição enzimática (FREIRE et al., 2012). Esta propriedade, inerente a sua estrutura molecular e pouco descrita na literatura, demonstra a necessidade de aprofundar estudos sobre os sítios catalíticos destas proteínas para compreender suas atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade catalítica da lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus* (AEL) e avaliar seus efeitos sobre fitofagos e fitoparasitas como um possível defensivo agrícola.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito inseticida em mosca de fruta (*Ceratitis capitata*)
- Determinar a atividade nematocida em *Meloidogyne incógnita* e *Meloidogyne javanica*
- Avaliar seu efeito fungistático sobre fungos fitopatogênicos
- Identificar e analisar peptídeos pertencentes a AEL para detecção de domínios conservados inerentes a sua propriedade molecular e realização desta atividade para comprovação de sua funcionalidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

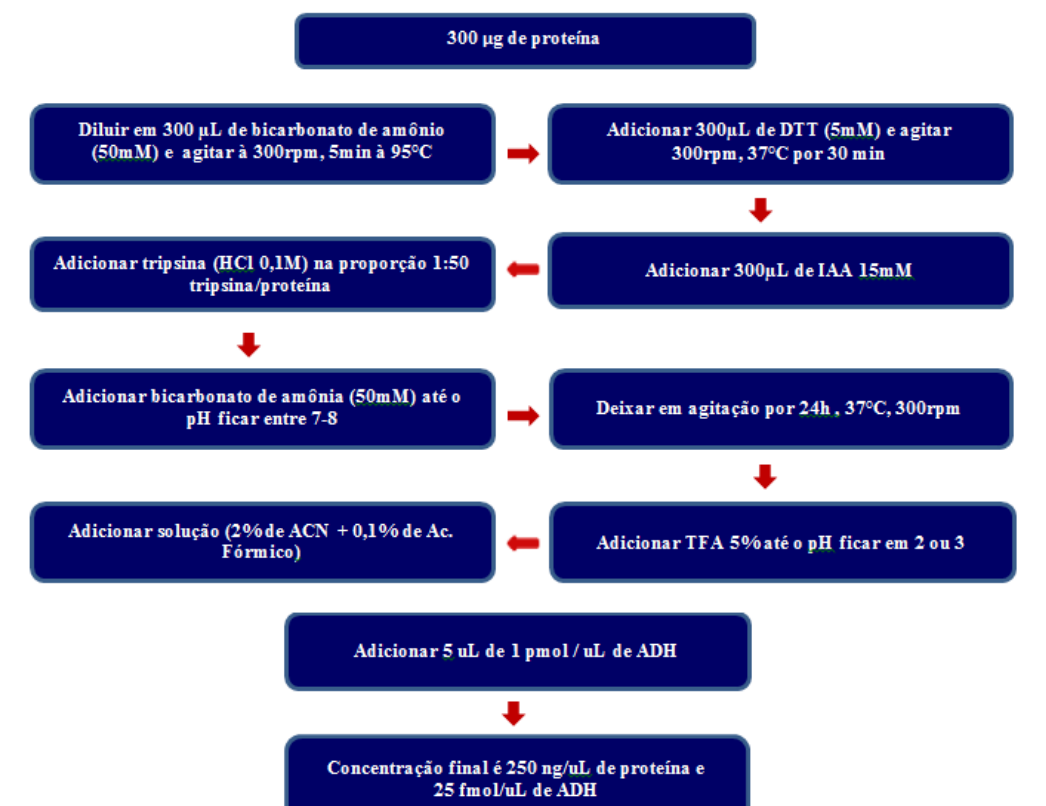
4.1.1 Purificação e isolamento da AEL

Sementes maduras de *A. esculentus*, coletadas no estado da Paraíba – Brasil, foram trituradas até obtenção de uma farinha fina. Esta foi delipidada em n-hexano e utilizada para extração de proteínas através de diluição com tampão TRIS-HCl pH 7,4; 0,1 M contendo NaCl 0,15 M na proporção de extração de 1:10 (w/v). Após 3 horas em contato, o extrato foi centrifugado à 5000 rpm durante 20 minutos à 4°C, o sobrenadante obtido foi precipitado com sulfato de amônio. A lectina foi obtida a partir da fração 30-60%, por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), seu grau de pureza foi analisada e confirmada por eletroforese (PAGE-SDS) e espectrometria de massa (LC/MS), segundo Soares et al (2012).

4.1.2 Redução, alquilação e digestão da AEL

A amostra foi reduzida, alquilada e posteriormente clivada, segundo Chakraborty et al (2009). Detalhadamente: 300µg de proteína foi adicionada a bicarbonato de amônio (50 mM) por 5min à 95° C para desnaturação térmica. Em seguida, foi adicionado o agente redutor Ditioneíto (DTT) 5 mM por 30min à 37° C para quebra das pontes dissulfeto e em seguida adicionado Iodoacetamida (IAA) 15 mM por 90 min à 37°C para alquilação. Após a proteína perder seu enovelamento e consequentemente sua função biológica, foi submetida a digestão enzimática em *overnight* à 37° C com tripsina 1:50 (w/w) (sequencing-grade modified trypsin - Promega, Madison, WI). (Figura 12)

Figura 12, Organograma do processo de digestão enzimática da lectina para avaliação analítica de seus peptídeos



4.1.3 Coleção de larvas e pupas da mosca de fruta (*Ceratitis capitata*)

As larvas e pupas utilizadas neste estudo foram oriundas de criação estoque do laboratório de entomologia da Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Agrárias, mantidas conforme Brito (2007). A criação de *C. capitata* é mantida a temperatura média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Larvas foram mantidas em bandejas plásticas e alimentadas com dieta artificial a base de cenoura, levedo de cerveja e nipagin, na proporção de 120: 600: 5 (g/g). Os adultos foram mantidos em gaiolas teladas 60 x 60 x 50cm e alimentados diariamente com uma solução de mel à 25%. Durante o período de oviposição, foram colocadas bandejas plásticas com água ao lado das gaiolas para a coleta diária dos ovos. Após 24 a 48 horas da coleta, os ovos foram inoculados na dieta para eclosão e desenvolvimento larval. Decorridos 10 a 15 dias da infestação, as larvas foram transferidas para placas de petri (9 cm) contendo areia esterilizada para obtenção de pupas.

4.1.4 Coleção de ovos e larvas juvenis de segundo estágio (J2) dos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*

Os ovos foram extraídos de raízes de berinjeiras (*Solanum melongela*) cv. Embu, em casa de vegetação do Instituto Agronômico de Campinas (IAC/SP), as quais continham populações puras dos nematóides *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, pelo método de Boneti e Ferraz (1981). Os J2 foram obtidos a partir de ovos em câmara de eclosão (SOUTHEY, 1970). O número de ovos e J2 foram ajustados para 1000 unidades/mL, em microscópio óptico (40x).

4.1.5 Coleção de fungos

As cepas de fungos foram oriundas do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, ATCC - American Type Culture Collection e URM – Micoteca, disponibilizadas por esta instituição. As mesmas foram mantidas em meio de cultura apropriado, Agar Sabouraud Dextrose- ASD e conservadas a 4 °C e a temperatura ambiente (28-30° C). Os meios foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

4.2 Metodologias

4.2.1 Análises por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada espectrometria de massas (LC/MS/MS)

A amostra foi concentrada em *speedvacc* a 20° C e ressuspensas em 2% de acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico, resultando numa concentração 250ng/μl para utilização em ESI-

LC/MS/MS. Para as análises em modo “data independent”, as amostras de peptídeos foram injetadas pelo sistema de cromatografia nanoAcquity em uma coluna trap Symmetry C18 de 180 mm x 20 mm a um fluxo de 5 mL/min por 5 min e posteriormente eluídas em uma coluna BEH130 C18 de 75mm x 150 mm em gradientes de ácido fórmico 0.1% em água (solvente A) e ácido fórmico 0.1% em acetonitrila (solvente B), inicialmente com gradiente de 93-7% de solvente B de 0-12 min; 65-35% de B de 12-16 min; 1-99% de B de 16-22 min e 93-7% de B de 22-30 min, em fluxos de 275 nL/min. A ionização foi feita por electrospray a 2,75 kV e os espectros foram adquiridos no espectrômetro de massas Synapt G2 (Waters) com separação por mobilidade iônica no modo HDMS^E. As aquisições foram realizadas na faixa de m/z de 50-2000 e as energias de colisão foram alternadas em modos de 4 eV para os íons precursores e uma rampa de 19-45 eV para os íons dos fragmentos. Os tempos de escaneamento foram de 1,25 s em cada modo. A correção de massa foi feita pela aquisição do lock mass de glu-fibrinopeptídeo-b (m/z 785,8426⁺²) a 500 nL/min por 1 s a cada 30 s. As análises foram feitas em triplicatas. Os espectros MS/MS foram obtidos por *Collision induce dissociation* (CID) e posteriormente analisados utilizando o programa Peaks Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canadá) para comparação em banco de dados com a família Malvaceae pelo uso da ferramenta Spider (<http://www.uniprot.org/>). Os peptídeos identificados tiveram seus MS/MS submetidos ao sequenciamento *denovo* para avaliar a confiabilidade da sequência peptídica e somente aqueles com ALC (porcentagem prevista de aminoácidos corretos na sequência) acima de 60% e um bom padrão do ion precursor foram considerados. Usou-se como parâmetros, erro de tolerância 10 ppm e 0.5 kDa para ion precursor e ions de fragmentação, respectivamente, tripsina como enzima, carboximetilação em cisteína (+58,01 Da) como modificação fixa, oxidação em metionina (+15,08 Da) como modificação variável e um fator de erro (FDR) <1 para garantir a confiabilidade da análise pela exclusão de falsos positivos.

4.2.2 Ensaio enzimático para determinar a atividade de inibição trípica

A atividade anti-trípica da lectina foi realizada usando tripsina do pâncreas bovino (23.3kDa – Sigma aldrich). Pra verificar a ação de inibição foi utilizado o N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA 1,25 mM) como substrato, conforme (ERLANGER;

KOLOWSKY; COHEN, 1961). O substrato foi dissolvido em DMSO 1% (v/v) e o volume completado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

Detalhadamente: uma alíquota de 20 μ L da solução de tripsina bovina (0,3 mg/ mL tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) foi pré-incubada com 360 μ L de tampão Tris-HCl pH 7,5; 50 mM e 100 μ L da lectina por 10 minutos a 37 °C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 μ L de solução do substrato. A reação processou-se por mais 15 minutos nas mesmas condições de incubação, e em seguida foi paralisada adicionando-se 120 μ L de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e realizados controles positivo com inibidor de tripsina de soja *Glycine max* (21kDa –Sigma aldrich) e negativo apenas com enzima-substrato. O p-nitroanilida hidrolisado foi monitorado em espectrofotômetro a 410 nm. O cálculo da atividade foi descrito em porcentagem de inibição baseado na ação da tripsina (controle negativo)

4.2.3 Efeito inseticida de AEL em larvas e pupas da mosca de fruta (*Ceratitis capitata*)

A avaliação do potencial inseticida da lectina foi realizada em larvas de 1°, 2° e 3° instar e pupas, por método de imersão, que proporciona o contato direto e homogêneo do bioinseticida em toda superfície do fitopatógeno. Os insetos nas diferentes fases de desenvolvimento foram acondicionados em placas de Petri, separadamente, e submetidos a condições de temperatura de 25 °C $\pm$ 2, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $\pm$ 80%, forneceu-se diariamente umidade conforme método utilizado por Oliveira et al (2010). Larvas e pupas, com menos de 24h, foram confinados em grupos de 20 unidades por placa. Em seguida foram tratados com AEL nas concentrações 2mg/mL, 1mg/mL e 0.5mg/mL, mantidos em contato por 10s, retirados e postos em placas de petri (9cm) em sua dieta para continuidade do ciclo. Para mensurar o efeito da AEL foram utilizados como controle positivos os quimioinseticidas organofosforados Agrotoato (dimetoato 40% m/v) e Malathion (50% m/v) nas concentrações de 0,6 mg/mL e 0,175mg/mL, respectivamente, segundo recomendações dos fabricantes, e como controle negativo ddH₂O.

A mortalidade das larvas e pupas foi observada pelo não desenvolvimento para o estágio sucessivo e avaliação por microscopia óptica (20x) para diferir o efeito nocivo dos produtos. Cada ensaio foi realizado em 10 repetições.

4.2.4 Efeito nematicida da AEL - Inibição da eclosão de larvas e mortalidade de juvenis (J2)

O bioensio foi realizado por delineamento experimental inteiramente casualizado utilizando lectina AEL (0,5mg/mL) e como controle água destilada, em 10 repetições. O experimento foi executado com um conjunto de placa de Petri plástica com 5,5 cm de diâmetro e uma peneira sobposta coberta por 2 folhas de lenço de papel adicionado 1.000 ovos/mL ou 1.000 J2/mL, segundo método de Baermann modificado para recipiente raso (SOUTHEY, 1970). Os bioensaios foram mantidos em câmara B.O.D. a 29 °C (+- 2 °C) no escuro. As estimativas de ovos eclodidos e mortalidade de J2 foram obtidas a partir de contagens em lâmina de Peters em microscópio biológico.

A avaliação de ovos eclodidos foi realizada num período de 10 dias com um n = 5, a partir do numero de J2 presentes. A ação nematicida em J2 foi observada por um período de 24, 48 e 72hs, após os tratamentos, caracterizando os vivos como espécimes se movimentando e os mortos, sem movimentação por um período de 10 segundos. A análise estatística foi realizada pelo teste *T student*, avaliando os 02 tratamentos e realizado a curva de inibição/resposta.

Para observar o comportamento diferencial da AEL sobre a eclosão dos ovos em *M. Javanica* e *M. incognita* foi utilizado à fórmula, segundo Nguyen et al (2013):

$$HI (\%) = [(C - T) / C] \times 100$$

Onde C e T são os numeros de eclosões do controle e o tratamento, respectivamente. Para mortalidade de J2 foi utiizado a fórmula, segunto Abbot (1925):

$$\text{Mortalidade J2 (\%)} = (\% \text{ mortalidade Tratado} - \% \text{ mortalidade Controle}) / 100 - \% \text{ mortalidade Controle.}$$

4.2.5 Atividade fungistática

A avaliação do efeito antifúngico da lectina foi realizada em fungos filamentosos fitopatogênicos: *Cladosporium carrionii* URM-5109, LM-01 e LM-03; *Fusarium oxysporium*: URM-5893; *Fusarium solani* URM-5796; *Rhizopus oryzae* URM-4557; *Aspergillus flavus* LM- 26, *A. fumigatus* ATCC- 16913; *A. níger* LM- 108; *Penicillium* LM-6, LM-9 e LM-11. Foi usada a técnica de microdiluição, em triplicata, utilizando placas de 96 poços, para determinar concentração inibitória mínima (CIM) da lectina, realizada em diluições seriadas (1024µg/mL - 32µg/mL), segundo a Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

A solução com lectina foi homogeneizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida, adicionado ao caldo nutritivo Sabouraud Dextrose – CSD, contendo o patógeno (10^6 UFC/mL), padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, com posterior incubação a temperatura ambiente (28-30 °C) durante sete dias. O controle positivo foi realizado com fluconazol (100 µg/mL).

REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p. 217-224, 2003.
- ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 909–915, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- AGRIOS, G.N. Losses caused by plant diseases. **Plant Pathology**. Oxford: Elsevier, 2004. p. 29-45.
- ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defence. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 5269–5279, 2013.
- AOKI, K.; PERLMAN, M.; LIM, J. M.; CANTU, R.; WELLS, L.; TIEMEYER, M. Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. **Journal Biology Chemistry**, v. 282, p. 9127–9142, 2007.
- ASE, C. L.; FUNKE, B. R.; TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.
- BAU, M. et al. *Ochratoxigenic* species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 125-130, 2005.
- BELLAFIORE, S.; SHEN, Z. X.; ROSSO, M. N.; ABAD, P.; SHIH, P.; BRIGGS, S. P. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLOS Pathogen**, v. 4(10), 2008.
- BHAT, G. G.; SHETTY, K. N.; NAGRE, N. N.; NEEKHRA, V. V.; LINGARAJU, S.; BHAT, R. S.; INAMDAR, S. R.; SUGUNA, K.; SWAMY, B.M. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematocidal activity. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 309-320, 2010.
- BLOK, V.; JONES, J.; PHILLIPS, M.; TRUDGILL, D. Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation. **BioEssays**, v. 30, p. 249–259, 2008.

BÖHM, H.; ALBERT, I.; FAN, L.; REINHARD, A.; NÜRNBERGER, T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 47–54, 2014.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2006.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837-907, 1990.

BUENO, C.J.; FISCHER, I.H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=459>. Acesso em: 9 mar. 2015.

BURROWS, P.R.; BARKER, A.D.; NEWELL, C. A.; HAMILTON, W. D. O. Plant-derived enzyme inhibitors and lectins for resistance against plant-parasitic nematodes in transgenic crops. **Pesticide Science**, v. 52, p. 176–183, 1998.

CAILLAUD, M-C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M-N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 104–113, 2008a.

CAILLAUD, M-C.; LECOMTE, P.; JAMMES, F.; QUENTIN, M.; PAGNOTTA, S. MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, p. 423–437, 2008b.

CAMPOS, E. G.; JESUINO, R. S.; DANTAS, A. S.; BRIGIDO, M. M.; FELIPE, M. S. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetic Molecular Research**, v. 4(2), p. 409-429, 2005.

CHAMPLIN, D. T.; TRUMAN, J. W. Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth, *Manduca sexta*. **Development**, v. 125, p. 269–277, 1998a.

CHAMPLIN, D. T.; TRUMAN, J. W.; Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*, **Development**, v. 125, p. 2009–2018, 1998b.

CHANDRA, N. R.; PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 14, p. 857–866, 2001.

CHANG, H. T.; CHENG, Y. H.; WU, C. L.; CHANG, S. T.; CHANG, T. C.; SU, Y. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266–6270, 2008.

CHANUT-DELALANDE, H. et al. Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. **Nature cell biology**, v. 16(11), p. 1035-44, 2014.

CHEN, M.S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, v. 15, p. 101–114, 2008.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, v. 59, p. 748-753, 2003.

COPELAND, R.; WHARTON, R.; LUKE, Q.; DE MEYER, M. Indigenous hosts of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Kenya; **Annals of Entomological Society America**, v. 95, p. 672-694, 2002.

CORSATO, C. **Moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) em pomares de goiaba no norte de Minas Gerais: biodiversidade, parasitóides e controle biológico**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; NASCIMENTO, L.C.; GURGEL, L.M.S.; PESSOA, W.R.L.S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 528 – 533, 2003.

DAVIS, E.; HUSSEY, R.; MITCHUM, M.; BAUM, T. Parasitism proteins in nematode–plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 360–366, 2008.

DE WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64 p. 2726–2732, 2007.

DEACON, J. **Fungal Biology**. 4th ed. London: **Blackwell Publishing**, 2006.

DJIAN-CAPORALINO, C. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), a growing problem in French vegetable crops. **EPPO Bulletin**, 2012.

ERENO, D. **Biofábrica no sertão**. Revista FAPESP, São Paulo, ed 133, mar. 2007. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2007/03/01/biofabrica-no-sertao/>>. Acesso em: 7 mar. 2015.

FERNANDES, C. F.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; MORAES, V. C.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p. 1040-1048, 2006.

FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; CARBÚ, M.; GARRIDO, C.; VALLEJO, I.; CANTORAL, J.M. Proteomic Advances in *Phytopathogenic fungi*. **Current Proteomics**, v. 4, p. 79-88, 2007.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FITCHES, E.; EDWARDS, M. G.; MEE, C.; GRISHIN, E.; GATEHOUSE, A. M. R.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v.50, p. 61-70, 2004.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S. D.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p.777–787, 2001.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of ureases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 18-28, 2008.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; SIMONED, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONIA, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physical Biochemistry**, v.40, p.61–68, 2002

FREIRE M.D.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, M.V.; FILHO, G.A.; MACEDO, M.L. Characterization of a saccharide-binding protein from *Talisia esculenta* seeds with trypsin inhibitory activity, **Protein Peptide Letter**; v.16, n.12, p.1557-64. 2009

FREIRE, M.D.; FRANCO, O.L.; C.E. MIGLIOLO, KUBO, L.; VARGAS, R.H.; OLIVEIRA, C.F.; PARRA, J.R.; MACEDO, M.L. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control, **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 161, n.1, p.86-92, 2012

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. D.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. G.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. 10. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 69-72, 2007.

GARCIA, F. R. M.; NORRBOM, A. L. Tephritoid flies (Diptera, Tephritoidea) and their plant hosts from the state of Santa Catarina in Southern Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94(2), p. 151-157, 2011.

GHEYSEN, G.; MITCHUM, M.G. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 415–421, 2011.

GHOSH, M. Purification of a lectin-like antifungal protein from the medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 91–95, 2009.

GOODMAN, W.; CUSSON, M. The juvenile hormones. In: LAWRENCE, I. G. **Insect Endocrinology**. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 310-365.

GONÇALVES, G. B.; SANTOS, J. C. G.; SILVA, C. E.; SANTOS, E. S. S.; NASCIMENTO, R. R.; SANTANA, A. E. G.; ZUCCHI, R. A. Occurrence of fruit flies (Diptera: *Tephritidae*) in the state of Alagoas, Brazil. **Florida Entomologist**, v.89(1), p. 93-94, 2006.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to Plant Pathogenes. In: BUCHANAN, B. B.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: IK, 2000. p. 1102-1156.

HEWEZI, T. et al. Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with Arabidopsis pectin methylesterase: Cooperative cellwall modification during parasitism. **Plant Cell**, v. 20, p. 3080–3093, 2008.

HAN, Z.; SUN, Y.; CHAI, J. Structural insight in to the activation of plant receptor kinases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 55–63, 2014.

HIRUMA, K.; RIDDIFORD, L.M. Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal Insect Physiology**, v. 56, p. 1390-1395, 2010.

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

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

JAOUANNET, M., PERFUS-BARBEOCH, L., DELEURY, E., MAGLIANO, M., ENGLER, G., VIEIRA, P., DANCHIN, E. G. J., ROCHA, M. D., COQUILLARD, P., ABAD, P. AND ROSSO, M.-N. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. **New Phytologist**, v. 194, p. 924-931, 2012.

JONES D. A.; TAKEMOTO D. Plant Innate Immunity – Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 48-62, 2004.

JONES, G.; JONES, D.; FANG, F.; XU, Y.; NEW, D.; WU, W-H. Juvenile hormone action through a defined enhancer motif to modulate ecdysteroid-activation of natural core promoters, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 161, p. 219-225, 2012.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94(1), p. 21-27, 2002.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

KOYAMA, T.; SYROPYATOVA, M. O.; RIDDIFORD, L. M.. Insulin/IGF signaling regulates the change in commitment in imaginal discs and primordia by overriding the effect of juvenile hormone. **Development Biology**, 324: 258-265, 2008.

KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891-905, 2008.

LAM, S. K.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v. 16, p. 172-180, 2009.

LANNOO, N.; Van Damme, E.J. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochemistry, Biophysical Acta**, v. 1800, p. 190-201, 2010.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 397, 2014.

LAMB, C., DIXON R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p. 251-275, 1997.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and effect on the development of the cowpeaweevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LEHRMAN, A.; AHMAN, I.; EKBOM, B. Influence of pea lectin expressed transgenically in oilseed rape (*Brassica napus*) on adult pollen beetle (*Meligethes aeneus*). **Journal Applied Entomology**, v. 131, p. 319 - 325, 2007.

LI, S.; CLAESON, P. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, v. 63, p. 249-255, 2003.

MACEDO, M. L.; Freire, M. G. M.; Novello, J. C.; Maragoni, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochemical et Biophysycal Acta**, v. 1571(2), p. 83 – 88, 2002.

MACEDO, M. L. R. et al. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51(10), p. 2980-2986, 2003.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; 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**, v.146, p. 486-498, 2007.

MACHO, A. P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular Cell**, v. 54, p. 263–272, 2014.

MAMALI, I.; TATARI, M.N.; MICHEVA, I.; LAMPROPOULOU, M.; MARMARAS, V. J. Apoptosis in medfly hemocytes is regulated during pupariation through FAK, Src, ERK, PI-3K p85a, and Akt survival signaling. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101(2), p. 331-47, 2007.

MARBAN-MENDONZA, N.; JEYAPRAKASH, A.; JANSON, H. B.; DAMON, J. R. A.; ZUCKERMAN, B. M. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. **Journal Nematology**, v. 19, p. 331-335, 1987.

MELANDER, M.; AHMAN, I.; KAMNERT, I.; STRÖMDAHL, A.C. Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. **Transgenic Research**, v. 12, p. 555–567, 2003.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; DA CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A Cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-39, 2005.

MOLINARI, S.; MIACOLA, C. Antioxidant enzymes in phytoparasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 29(2), p. 153–159, 1997.

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**, v. 6, p. 245-252, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. p. 625.

MOVAFAGH, A.; GHANATI, K.; AMANI, D.; MAHDAVI, S.M.; HASHEMI, M.; ABDOLAH, Z. D.Z.; DARVISH, H.; GHOLAMI, M.; HAGHNEJAD, L.; MOSAMMAMI, S.; SAFARI, S.; DAREHGAZANI, R.; RAHIMI, M.; NAINI, N.S.; MOTLAGH, M.G.; ZAMANI, M. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. **Journal of Paramedical Science**, v. 4, p. 126-141, 2013.

NESTEL, D.; TOLMASKY, D.S.; NEMNY-LAVY, E. Lipid, carbohydrates and protein patterns during metamorphosis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 96, p. 237–244, 2003.

NÜHSE, T.S. Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 280, 2012.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, 2004.

OLIVEIRA, J. T. A.; RIOS, F. J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; NOJOSA, G. B. A.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and guthistology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1737-1747, 2004.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113, 1992.

PARANAGAMA, P. A.; ABEYSEKERA, K. H. T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADD, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 86-90, 2003.

PARIJS, J. V.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: An anti-fungal protein from rubber-tree (*Havea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-262, 1991.

PARIJS, J. V.; BROEKAERT, W. F.; PEUMANS, W. J.; GEUNS, J. M.; LAERE A. J. V. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. **Archives of Microbiology**, v. 158, p. 19-25, 1992.

PEREIRA, J. O comportamento da Mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Díptera: Tephritidae) em Pegões. 2003. 138 f. Dissertação (**Mestrado em Agricultura e Horticultura sustentáveis**) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa.

PETRYK, A.; WARREN, J.T.; MARQUES, G.; JARCHO, M.P.; GILBERT, L.I.; KAHLER, J.; PARVY, J.P.; LI, Y.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; O'CONNOR, M.B. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 13773-13778, 2003.

POPEIJUS, M. et al. Analysis of genes expressed in second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* using the expressed sequence tag approach. **Nematology**, v. 2, p. 567-574, 2000.

QIN, L. et al. Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. **Nature**, v. 427, p. 30, 2004.

RAVAL, S.; GOWDA, S.B.; SINGH, D. D.; CHANDRA, N. R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. **Glycobiology**, v. 14, p. 1247-1263, 2004.

RIDDIFORD, L.M. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco horn worm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 34, p. 438-446, 1978.

RIDDIFORD, L.M. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. General considerations and premetamorphic actions. **Advanced Insect Physiology**, v. 24, p. 213-274, 1994.

RIDDIFORD L.M.; AJAMI, A.M. Juvenile hormone: its assay and effects on pupae of *Manduca sexta*. **Journal Insect Physiology**, v. 19, p. 749-762, 1973.

RIDDIFORD, L. M.; CHERBAS, P. T.; TRUMAN J. W. Ecdysone receptors and their biological actions. **Vitamin and Hormones**, v. 60, p. 1-73, 2001.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMPTE, P.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517-523, 2003.

FRAGOSO, R. R. et al. **Interação Molecular Planta-Nematóide**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

RONCHI-TELES, B.; DUTRA, V. S.; COSTA, A. P. T.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; MESQUITA, A. C. A.; SILVA, J. G. Natural host plants and native parasitoids associated with *Anastrepha pulchra* and other *Anastrepha species* (Diptera: Tephritidae) in Central Amazon, Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94(2), p. 347-349, 2011.

ROSSO, M.; HUSSEY, R.; DAVIS, E.; SMANT, G.; BAUM, T.; ABAD, P.; MITCHUM, M.G. Nematode effector proteins: targets and functions in plant parasitism. In: MARTIN, F.; KAMOUN, S. **Effectors in plant microbe interactions**. Oxford, Inglaterra: Wiley-Blackwell, 2011. p. 327-354.

RYAN, C.A. The system in signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 112-121, 2000.

SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L.C.B.B.; BIBIER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460-4, 2008.

SADEGHI, A.; SMAGGHE, G.; BROEDERS, S.; HERNALSTEENS, J.P.; DE GREVE, H.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Ectopically expressed leaf and bulb lectin from garlic(*Allium sativum* L.) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm(*Spodoptera littoralis*). **Transgenic Research**, v. 17, p. 9-18, 2008.

SANTI-GADELHA, T., ROCHA, B.A.M., GADELHA, C.A.A., SILVA, H.C., CASTELLON, R.E.R., GONÇALVES, F.J.T., TOYAMA, D.O., TOYAMA, M.H., DE SOUZA, A.J.F., BERIAM, L.O.S., MARTINS, J.L., JOAZEIRO, P.P., CAVADA, B.S. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 15-22, 2012.

SCHOLL, E. H.; BIRD, D. M. Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36(3), p. 536-545, 2005.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SEMBLAT, J. P.; ROSSO, M. N.; HUSSEY, R. S.; ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 14, p. 72-79, 2001.

SHAHIDI-NOGHABI, S.; VAN DAMME, E.J. M.; SMAGGHE, G. Expression of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I') from elderberry bark in transgenic tobacco plants results in enhanced resistance to different insect species. **Transgenic Research**, v. 18, p. 249-259, 2009.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal Molecular Biology**, v. 267, p. 433-445, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198 - 3208, 1990.

SOLIMAN, K. M. et al. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40(1), p. 1669-1675, 2002.

THOMAS, M.; HEPPNER, J.; WOODRUFF, R.; WEEMS, H.; STECK, G.; FASULO, T. Mediterranean Fruit Fly. **Florida Department of Agriculture and Consumer Services and University of Florida. 2001.**

THUMMEL, C. S.; CHORY, J. Steroid signaling in plants and insects--common themes, different pathways. **Genes and Development**, v. 16(24), p. 3113-3129, 2002.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic polyphagous root-knot nematodes:exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 53-57, 2001.

TRIGUEIROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ,Y.; GUILLOT, J.; CHAVANT, L.;FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chysenteron lectin*: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298, 2003.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**. Chichester:John Willey & Sons, 1998. p.452.

VAN DAMME, E.J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, p. 107–209, 2008.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**,v. 55, p. 85-97, 1999.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.**Phytochemistry**,v. 72, p. 1538–1550, 2011.

VERONESE, P.; RUIZ, M. T.; COCA, M. A.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBE, J. I.; DAMSZ, B.; PARDO, J. M.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, M.; NARASIMHAN, M. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1580-1590, 2003.

VIDAL, D.; SILVA, J. Ocorrência de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Sul da Bahia. In: **Reunião Anual da SBPC**, 57., 2005, Fortaleza.

VIEIRA, P. et al. The plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1241-1253, 2011.

WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R. M.; GILCHRIST, D. G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. **The Plant Cell**, v. 8(3), p. 375-391, 1996.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 327-333, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends Genetics**, v. 22, p. 396-403, 2006.

WIRTHMUELLER, L.; MAQBOOL, A.; BANFIELD, M. J. On the frontline: structural insights in to plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 761-776, 2013.

WONG, J. H.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C.; YE, X. J.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1221-1235, 2010.

WOOD, W. B. **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. Boulder: ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1988.

YU, L. G.; FERNIG, D. G.; WHITE, M. R. H.; SPILLER, D. G.; APPLETON, P.; EVANS, R. C.; GRIERSON, I.; SMITH, J. A.; DAVIES, H.; GERASIMENKO, O. V.; PETERSEN, O. H.; MILTON, J. D.; RHODES, J. M. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence--dependent nuclear protein import. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 48904-48909, 1999.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZUCCHI, R. A. Espécies de *Anastrepha*, sinónimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. P. 041-048.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 013-024.

ZUCKERMAN, B. M.; JANSSEN, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 95-113, 1984.

ZUCKERMAN, B. M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses.
Journal Nematology, v. 15, p. 173-182, 1983.

5. RESULTADOS

Os resultados estão dispostos, conforme recomendação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM/DBM/UFPB), sob a forma de artigo científico. Desta forma, o item 5 refere-se aos dados coletados e discutidos no decorrer da pesquisa e estão formatados de acordo com as normas de publicação do respectivo periódico científico selecionado para submissão.

ARTIGO

Atividade de inibição de protease da lectina de sementes de *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) e seus efeitos sobre *Ceratitis capitata*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*.

José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda^a; Carlos Alberto de Almeida Gadelha^a; Nilson Antônio Assunção^b; Savio Torres de Farias^a; Mileny dos Santos de Souza^c; Jacinto de Luna Batista^c; Carlos Eduardo Rossi^d; Edeltrudes de Oliveira Lima^e; Edilza Silva do Nascimento^f; Rodrigo Rodrigues e Lacerda^a; Sandro Mascena Filho^a; Tatiane Santi Gadelha^a.

^aDepartamento de Biologia celular e molecular, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil.

^bInstituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brasil.

^cDepartamento de Entomologia, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil.

^dLaboratório de Fitossanidade, Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, Brasil.

^eLaboratório de Micologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil.

^f Centro de tecnologia de alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

RESUMO

Lectina é um grupo de proteínas capaz de reconhecer e se ligar a carboidratos de forma reversível sem modifica-los por domínio não catalítico. Em vegetais, são sintetizadas como fator de resistência contra fitopatógenos por reconhecer estruturas presentes nestes parasitas e e suas características estruturais, catalíticas e carboidrato-específicos fornecem informações sobre seus mecanismos de ações em diferentes espécies de parasitas. O objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade catalítica da lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus* (AEL) e avaliar seus efeitos sobre organismos fitófagos e fitopatógenos para sua utilização como um possível defensivo agrícola. Foram realizadas análises dos peptídeos da AEL por espectrometria de massas para detecção de domínios conservados inerentes a sua propriedade molecular e realização de atividade de inibição de proteases e ensaios de toxicidade em mosca de fruta *Ceratitis capitata* e nematoides de galha *Meloydogine javanica* e *Meloydogine incógnita*, nos seus diferentes estágios de desenvolvimento através de aplicação tópica e avaliação de sua atividade fungistática sobre fungos fitopatogênicos, AEL apresentou em sua composição regiões homólogas à inibidores de protease do tipo *kunitz*, com identificação de 03 peptídeos conservados nesta classe de proteínas e atividade de inibição de protease (92%), os quais revelam sua função catalítica e direcionam seus mecanismos de ações nos diferentes parasitas. Apresentou efeito inseticida sobre larvas 3º instar e pupa, apresentou efeito nematicida sobre os nematoides de galhas, atuando principalmente sobre a eclosão de larvas, mas não apresentou atividade fungistática..

Palavras-chave: AEL, atividade catalítica, *Ceratitis capitata*, nematóide de galha, fungos,

ABSTRACT

The lectins are proteins capable of recognize and bond reversibly to carbohydrates without modifying them by a non-catalytic domain. In vegetables, they are synthetized as resistance factors against phytopathogens, and since they recognize structures present in the parasites, for their structural, catalytic and carbohydrate-specific characteristics give information on the action mechanisms against different parasitic species. Our study feature its catalytic activity of the lectin extracted from *Abelmoschus esculentus* (AEL) and evaluated their effects on phytophagous and phytopathogens for its application as a potential as crop protection and. We performed peptide analysis from AEL using mass spectrometry to determine conservative domains inherent to its molecular properties and protease activity inhibition toxicity, essays toxicity on the fruit fly *Ceratitis capitata* and root knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on their different development stages through topical application, fungistatic activity on phytopathogenic fungi. AEL presents in its composition regions that are homologous to kunitz-type protease inhibitors, with the identification of conserved peptides for this class of proteins and protease inhibition activity (92%), which reveal its catalytic function and direct their action mechanisms on the different phytopathogens. It's displayed insecticide effect on 3rd instar larvae and pupae, nematocide effect for the root knot nematodes acting mainly in larve hatched but did not presented fungistatic activity.

Keywords: AEL, catalytic activity, *Ceratitis capitata*, root knot nematodes, fungi

Introdução

Lectina vegetal é um grupo heterogêneo de proteínas com propriedades biológicas relacionadas a capacidade de reconhecer e ligar-se reversivelmente a carboidratos específicos através de um domínio não catalítico [1]. São caracterizadas por interagir com monossacarídeos, contudo, sua afinidade com carboidratos simples é geralmente inferior quando comparado às estruturas mais complexas, tais como N-glicanos [2-3]. Elas também podem apresentar especificidade por glicoconjugados (galactose e ácido siálico) presentes em organismos fora do reino vegetal, que são menos abundantes ou ausentes em plantas. Estes carboidratos presentes em organismos, como vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos fitófagos, possibilitam o seu reconhecimento e interação por esta classe de proteínas [4-6], que as tornam ferramentas importantes em estudos sobre processos fisiológicos e fitopatológicos em plantas e seu uso no controle de pragas.

Devido às variações na eficiência de controle de parasitismo pelas diferenças na concentração do composto entre plantas e, principalmente, os efeitos residuais que apontam à necessidade de várias aplicações em períodos curtos [7], a utilização destas moléculas tornam-se mais promissoras quando usadas para indução de resistência em plantas geneticamente modificadas [8]. A lectina de *Oryza sativa* quando expressa de forma heteróloga em *Nicotiana tabacum* foi responsável por causar altos índices de mortalidade em larvas de *Spodoptera exigua* quando as folhas deste vegetal foram introduzidas em sua dieta [9]. Apesar da importância do ligante específico e da sua estrutura molecular para compreender suas atividades [10], evidências demonstram que o tamanho da molécula pode ser um fator determinante para descrever seu mecanismo de ação e melhor aplicabilidade [11]. O uso destas proteínas pela biotecnologia pode revelar um promissor controle alternativo à fitoparasitas para reduzir os custos da produção agrícola [12].

De acordo com as características relacionadas à estas propriedades, a lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus*, um vegetal popularmente conhecido como quiabeiro, pertencente à família Malvaceae e amplamente cultivado na América, Ásia e sul da Europa, torna-se um instrumento de interesse para este fim. A lectina extraída de *Abelmoschus esculentus* (AEL) apresenta-se como uma proteína monomérica de 10,29 kDa ou como um dímero de 20,58 kDa e tem especificidade por manose, galactose e frutose, descrita apenas com propriedades farmacológicas [13-14].

O objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade catalítica da lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus* (AEL) e avaliar seus efeitos sobre organismos fitófagos e fitoparasitas para sua utilização como um possível defensivo agrícola. Para avaliar sua função catalítica foi realizada análise de seus peptídeos para detecção de domínios conservados inerentes a sua propriedade molecular e atividade de inibição de protease (Tripsina). Foram desenvolvidos ensaios de toxicidade contra mosca de fruta (*Ceratitis capitata*) e nematóides de galha (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*) e avaliação de seu efeito sobre crescimento de fungos fitopatogênicos.

Material e métodos

Purificação e isolamento da AEL

Sementes maduras de *A. esculentus*, coletadas no estado da Paraíba – Brasil, foram trituradas até obtenção de uma farinha fina. Esta foi delipídada em n-hexano a temperatura ambiente, e utilizada para extração de proteínas através de diluição com tampão TRIS-HCl pH 7,4; 0,1 M contendo NaCl 0,15 M na proporção de extração de 1:10 (w/v). Após 3 horas em contato, o extrato foi centrifugado à 5000rpm durante 20 minutos à 4°C, o sobrenadante obtido foi precipitado com sulfato de amônio. A partir da fração 30-60%, a lectina foi obtida por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), e confirmada por eletroforese (PAGE-SDS) e espectrometria de massa (LC/MS), segundo Soares et al [13]

Redução, alquilação e digestão da AEL

A amostra foi reduzida, alquilada e posteriormente clivada, segundo Chakraborty et al [15]. Detalhadamente: 300µg de proteína foi adicionada a bicarbonato de amônio (50mM) por 5min à 95° C para desnaturação térmica. Em seguida, foi adicionado o agente redutor Ditioneíto (DTT) 5mM por 30min à 37° C para quebra das pontes dissulfeto e em seguida adicionado Iodoacetamida (IAA) 15mM por 90 min à 37°C para alquilação. Após a proteína perder seu enovelamento e consequentemente sua função biológica, foi submetida a digestão enzimática em *overnight* à 37° C com tripsina 1:50 (w/w) (sequencing-grade modified trypsin - Promega, Madison, WI).

Coleção de larvas e pupas da mosca de fruta (*Ceratitis capitata*)

As larvas e pupas utilizadas neste estudo foram oriundas de criação estoque do laboratório de entomologia da Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Agrárias, mantidas conforme adaptação de Siskos et al [16] e Xing et al [17]. A criação de *C. capitata* é mantida a temperatura média de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Larvas foram mantidas em bandejas plásticas e alimentadas com dieta artificial a base de cenoura, levedo de cerveja e nipagin, na proporção de 120: 600: 25 (g/g). Os adultos foram mantidos em gaiolas teladas 60 x 60 x 50cm e alimentados diariamente com uma solução de mel a 25%. Durante o período de oviposição, foram colocadas bandejas plásticas com água ao lado das gaiolas para coleta diária dos ovos. Após 24 a 48 horas da coleta, os ovos foram inoculados na dieta para eclosão e desenvolvimento larval. Decorridos 10 a 15 dias da infestação, as larvas foram transferidas para placas de petri (9 cm) contendo areia esterilizada para obtenção de pupas.

Coleção de ovos e larvas juvenis de segundo estágio (J2) dos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*

Os ovos foram extraídos de raízes de berinjelas (*Solanum melongela*) cv. Embu, em casa de vegetação do Instituto Agronômico de Campinas (IAC/SP), as quais continham populações puras dos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* pelo método de Boneti & Ferraz [18]. Os J2 foram obtidos a partir de ovos em câmara de eclosão [19]. O número de ovos e J2 foram ajustados para 1000 unidades/mL, em microscópio óptico (40X).

Coleção de fungos

As cepas de fungos foram oriundas do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, ATCC - American Type Culture Collection e URM – Micoteca, disponibilizadas por esta instituição. As mesmas foram mantidas em meio de cultura apropriado, Agar Sabouraud Dextrose- ASD e conservadas a 4°C e a temperatura ambiente ($28-30^{\circ}\text{C}$). Os meios foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

Análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada espectrometria de massas (LC/MS/MS)

A amostra foi concentrada em *speedvacc* a 20° C e ressuspensas em 2% de acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico, resultando numa concentração 250ng/μl para utilização em ESI-LCMS/MS. Para as análises em modo “data independent”, as amostras de peptídeos foram injetadas pelo sistema de cromatografia nanoAcquity em uma coluna trap Symmetry C18 de 180 mm x 20 mm a um fluxo de 5 mL/min por 5 min e posteriormente eluídas em uma coluna BEH130 C18 de 75mm x 150 mm em gradientes de ácido fórmico 0.1% em água (solvente A) e ácido fórmico 0.1% em acetonitrila (solvente B), inicialmente com gradiente de 93-7% de solvente B de 0-12 min; 65-35% de B de 12-16 min; 1-99% de B de 16-22 min e 93-7% de B de 22-30 min, em fluxos de 275 nL/min. A ionização foi feita por electrospray a 2,75 kV e os espectros foram adquiridos no espectrômetro de massas Synapt G2 (Waters) com separação por mobilidade iônica no modo HDMS^E. As aquisições foram realizadas na faixa de m/z de 50-2000 e as energias de colisão foram alternadas em modos de 4 eV para os íons precursores e uma rampa de 19-45 eV para os íons dos fragmentos. Os tempos de escaneamento foram de 1,25 s em cada modo. A correção de massa foi feita pela aquisição do lock mass de glu-fibrinopeptídeo-b (m/z 785,8426⁺²) a 500 nL/min por 1 s a cada 30 s. As análises foram feitas em triplicatas. Os espectros MS/MS foram obtidos por *Collision induce dissociation* (CID) e posteriormente analisados utilizando o programa Peaks Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canadá) para comparação em banco de dados com a família Malvaceae pelo uso da ferramenta *Spider* para identificar possíveis mutações (<http://www.uniprot.org/>). Os peptídeos identificados tiveram seus MS/MS submetidos ao sequenciamento *denovo* para avaliar a confiabilidade da sequência peptídica e somente aqueles com ALC (porcentagem prevista de aminoácidos corretos na sequência) acima de 60% e um bom padrão do ion precursor foram considerados. Usou-se como parâmetros, erro de tolerância 10 ppm e 0.5 kDa para ion precursor e ions de fragmentação, respectivamente, tripsina como enzima, carboximetilação em cisteína (+58,01 Da) como modificação fixa, oxidação em metionina (+15,08 Da) como modificação variável e um fator de erro (FDR) <1 para garantir a confiabilidade da análise pela exclusão de falsos positivos.

Ensaio enzimático para determinar a atividade de inibição triptica

A atividade anti-tríptica da lectina foi realizada usando tripsina do pâncreas bovino (23.3kDa – Sigma aldrich). Para verificar a ação de inibição foi utilizado o N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA 1,25 mM) como substrato, conforme [20]. O substrato foi dissolvido em DMSO 1% (v/v) e o volume completado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Detalhadamente: uma alíquota de 20 µL da solução de tripsina bovina (0,3 mg/ mL tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) foi pré incubada com 360 µL de tampão Tris-HCl pH 7,5; 50 mM e 100 µL da lectina por 10 minutos a 37 °C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 µL de solução do substrato. A reação processou-se por mais 15 minutos nas mesmas condições de incubação, e em seguida foi paralisada adicionando-se 120 µL de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e e realizados controles positivo com inibidor de tripsina de soja *Glycine max* (21kDa –Sigma aldrich) e o negativo apenas com enzima-substrato. O p-nitroanilida hidrolisado foi monitorado em espectrofotômetro a 410 nm. O cálculo da atividade descrito em porcentagem de inibição realizado com base na ação da tripsina (controle negativo).

Efeito inseticida de AEL em larvas e pupas da mosca de fruta (*Ceratitis capitata*)

A avaliação do potencial inseticida da lectina foi realizada em larvas de 1º, 2º e 3º instar e pupas, por método de imersão, que proporciona o contato direto e homogêneo do bioinseticida em toda superfície do fitopatógeno. Os insetos nas diferentes fases de desenvolvimento foram acondicionados em placas de Petri, separadamente, e submetidos a condições de temperatura de 25 ° C $\pm$ 2, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de $\pm$ 80%, forneceu-se diariamente umidade conforme método utilizado por Oliveira et al. [21]. Larvas e pupas, com menos de 24h, foram confinados em grupos de 20 unidades por placa. Em seguida foram tratados com AEL nas concentrações 2mg/mL, 1mg/mL e 0,5mg/mL, mantidos em contato por 10s, retirados e postos em placas de petri (9cm) em sua dieta para continuidade do ciclo. Para mensurar o efeito da AEL foram utilizados como controle positivos os quimioinseticidas organofosforados Agrotoato (dimetoato 40% m/v) e Malathion (50% m/v) nas concentrações de 0,6 mg/mL e 0,175mg/mL, respectivamente, segundo recomendações dos fabricantes, e como controle negativo ddH₂O. A mortalidade das larvas e pupas foi observada pelo não desenvolvimento para o estagio sucessivo e avaliação por microscopia óptica (20x) para diferir o efeito nocivo dos produtos. Cada ensaio foi realizado em 10 repetições.

Efeito nematocida da AEL - Inibição da eclosão de larvas e mortalidade de juvenis (J2)

O bioensio foi realizado por delineamento experimental inteiramente casualizado utilizando lectina AEL (0,5 mg/mL) e como controle água destilada em 10 repetições. O experimento foi executado com um conjunto de placa de Petri plástica com 5,5 cm de diâmetro e uma peneira sobposta coberta por 2 folhas de lenço de papel adicionado 1.000 ovos ou 1.000 juvenis de segundo estágio (J2), segundo método de Baermann modificado para recipiente raso [19]. Os bioensaios foram mantidos em câmara B.O.D. a 29 °C (+/- 2 °C) no escuro. As estimativas de ovos eclodidos e mortalidade de J2 foram obtidas a partir de contagens em lâmina de Peters em microscópio biológico. A avaliação de ovos eclodidos foi realizada num período de 10 dias com um n = 5, a partir do número de J2 presentes. A ação nematocida em J2 foi observada por um período de 24, 48 e 72hs, após os tratamentos, caracterizando os vivos como espécimes se movimentando e os mortos, sem movimentação por um período de 10 segundos. A análise estatística foi realizada pelo teste *T student*, avaliando os 02 tratamentos e realizado a curva de inibição/resposta..

Para observar o comportamento diferencial da AEL sobre a eclosão dos ovos em *M. Javanica* e *M. incognita* foi utilizado a fórmula, segundo Nguyen et al [22]:

$$HI (\%) = [(C - T) / C] \times 100;$$

Onde C e T são os numeros de eclosões do controle e do tratamento, respectivamente.

Para mortalidade de J2 foi utilizado a fórmula, segundo Abbot [23]:

$$\text{Mortalidade J2 (\%)} = (\% \text{ mortalidade Tratado} - \% \text{ mortalidade Controle}) / 100 - \% \text{ mortalidade Controle.}$$

Atividade fungistática

A avaliação do efeito antifúngico da lectina foi realizada em fungos filamentosos fitopatogênicos: *Cladosporium carrionii* URM-5109, LM-01 e LM-03; *Fusarium oxysporium*: URM-5893; *Fusarium solani* URM-5796; *Rhizopus oryzae* URM-4557; *Aspergillus flavus* LM- 26, *A. fumigatus* ATCC- 16913; *A. níger* LM- 108; *Penicillium* LM-6, LM-9 e LM-11. Foi usada a técnica de microdiluição, em triplicata, utilizando placas de 96 poços, para determinar concentração inibitória mínima (CIM) da lectina, realizada em

diluições seriadas (1024µg/mL - 32µg/mL), segundo a Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute [24]. A solução com lectina foi homogeneizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida, adicionado ao caldo nutritivo Sabouraud Dextrose – CSD, contendo o patógeno (10^6 UFC/mL), padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, com posterior incubação a temperatura ambiente (28-30 °C) durante sete dias. O controle positivo foi realizado com fluconazol (100 µg/mL).

Resultados e discussão

Identificação de peptídeos presentes em AEL e caracterização de seu domínio catalítico

A partir da digestão enzimática realizada e posterior análise por espectrometria de massas, foram gerados 2835 MS/MS para identificação de peptídeos como parte da estrutura primária da AEL. Os MS/MS foram comparados em banco de dados e apresentou maior homologia (22%) com o inibidor de tripsina de semente de *Theobroma cacao* (21kDa) pelos peptídeos AIWGAGGGGLALGR, CPEIVVQR, N(sub D)RLCLTSTVWK, SWFKIENAW(sub G)ALGYK. (Figura 1).

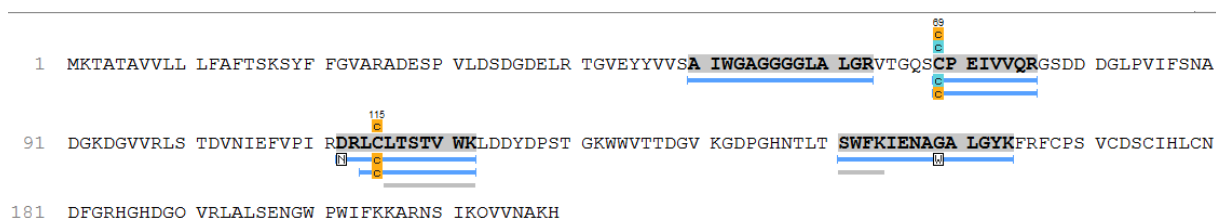


Figura 1. Peptídeos da AEL encontrados como homólogos do inibidor de tripsina da semente de *Theobroma cacao*.

Theobroma cacao, pertencente à subfamília Sterculioideae (Malvaceae), apresenta em suas sementes um proteína de armazenamento de 221 aminoácidos com propriedade molecular de inibidor de endopeptidases, dos quais da posição 1-26 é um peptídeo sinal responsável pelo seu endereçamento e a outra porção pela atividade de inibição enzimática com homologia para inibidor de tripsina de soja (*Glicina max*) [25], presentes no domínio Kunitz (STI) desta proteína, responsável pela sua atividade de inibição enzimática e ligações de ponte dissulfeto entre resíduos 69-115, característicos deste tipo de inibidor [25]. Inibidores tipo Kunitz são

caracterizados por massas moleculares em torno de 20 kDa, um baixo teor de cisteína para formar duas pontes de dissulfeto e com longa interconexão entre os loops, apresentam um ou dois sítios reativos para serinoproteinases, como a tripsina [26-28]

A consulta de banco de dados é usada para encontrar um peptídeo para o qual um espectro melhor coincide com dados experimentais. [29] O *sequenciamento de novo* é utilizado para identificar peptídeos desconhecidos e permite avalia-los separadamente em cada espectro MS/MS para escolher o mais fidedigno, caso haja mais de um, e determinar a posição de cada aminoácido na sequência peptídica [30]. Análises por *sequenciamento de novo* dos MS/MS dos peptídeos identificados no banco de dados, demonstraram que a sequência CPEIVVQR apresentou 98% de confiabilidade e o peptídeo SWFKIENAW(sub G)ALGYK foi encontrado como WSKLESANVPGSYK (96%) devido à melhor ionização, e devido a presença dos fragmentos SWFK (97%) e LESANVPGSYK (98%), torna-se mais provável como WSKLESANVPGSYK (Figura 2 A-B). A porcentagem de confiança local neste tipo de análise indica a probabilidade de que a sequência do peptídeo esta correta [31]. O peptídeo LCLTSTVWK (63%), associado a presença do fragmento ASDLTSTVSVK (82%), apresenta maior confiabilidade que o peptídeo N(sub D)RLCLTSTVWK encontrado em banco de dados. Existem situações onde dois resíduos de aminoácidos irão apresentar massa molecular bastante próxima de um terceiro aminoácido, como SV>W [32]. A sequência de aminoácidos AIWGAGGGGLALGR apresentou uma porcentagem de confiança acima de 90% nos resíduos Trp-Gly-Ala-Gly-Gly presentes em WLWGAGGSPNLGR (65%) com substituição dos aminoácidos Ala-Ile>Trp-Leu, que também apresentou um ion precursor mais intenso (Figura 3 A-B)

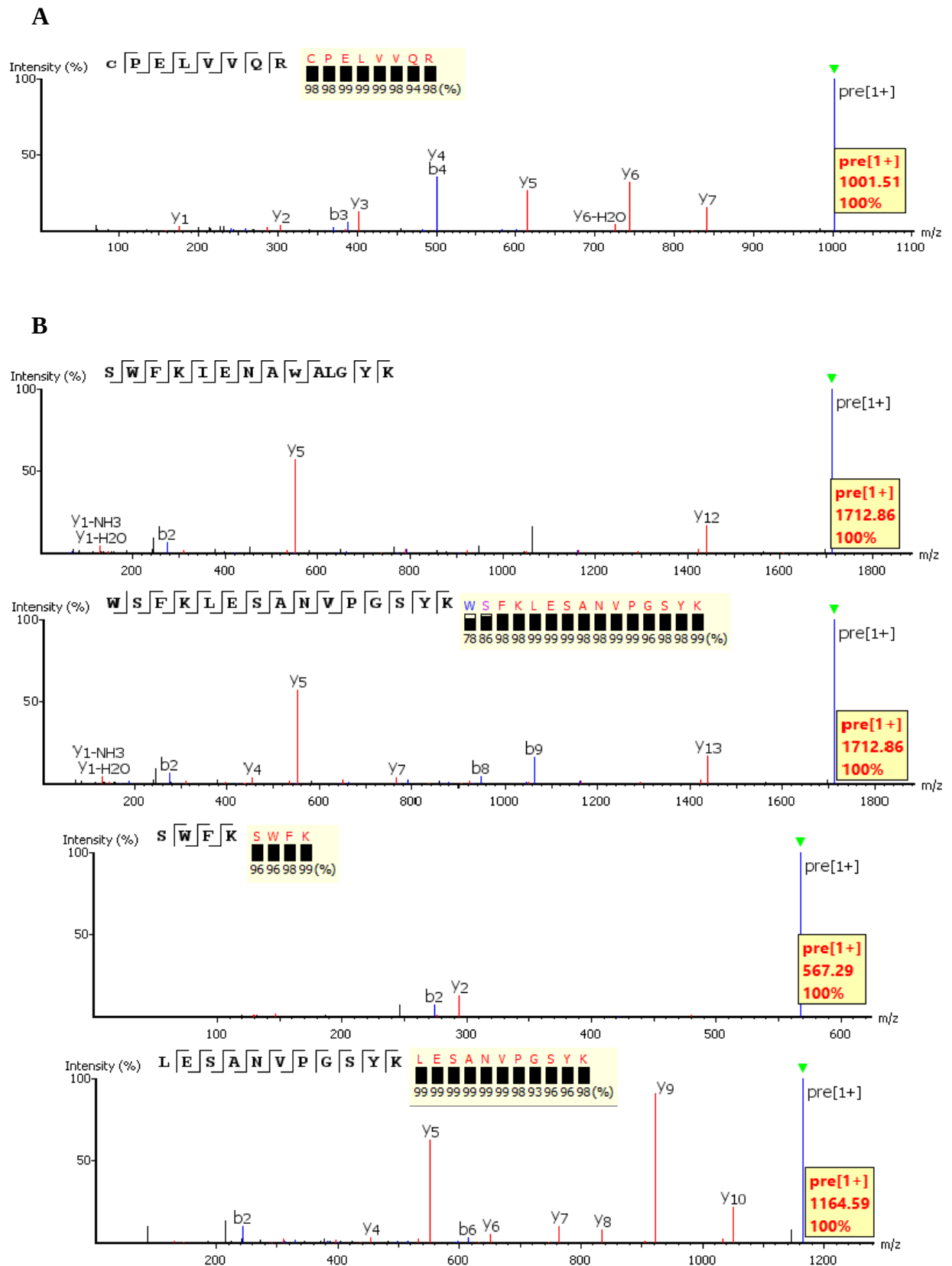


Figura 2. Análise dos MS/MS por *sequenciamento de novo*. (A) Alinhamento convergente da sequência CPELVVQR (98%). (B) Determinação da sequência SWFKLESANVPGSYK a partir do peptídeo com maior ALC e de peptídeos menores.

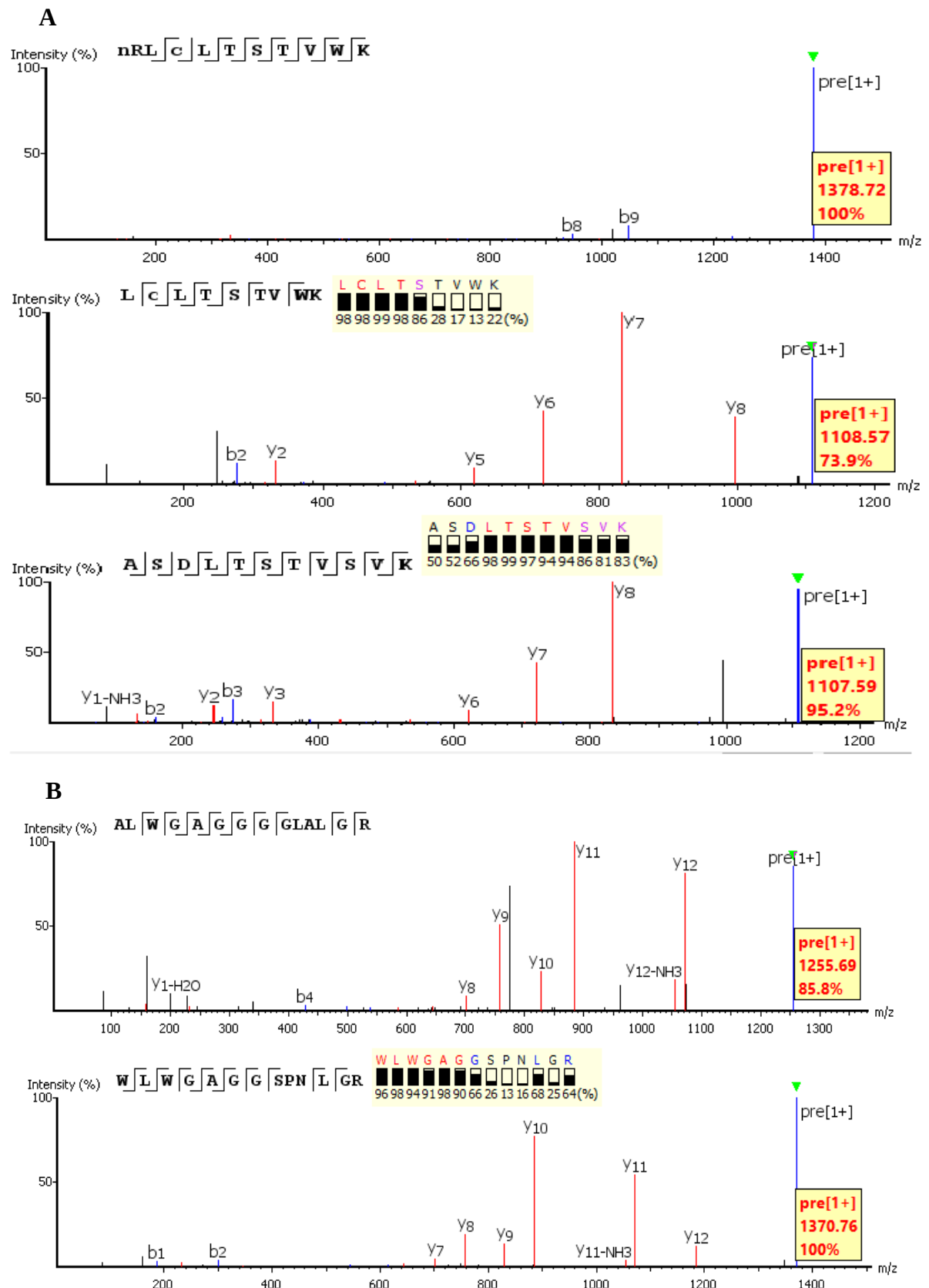


Figura 3. Análise dos MS/MS por *sequenciamento de novo*. (A) Determinação da sequência LCLTSTVSVK baseado confiabilidade da posição dos aminoácidos. (B) Determinação da sequência WLWGAGG baseado confiabilidade da posição dos aminoácidos

Portanto, a análise por *sequenciamento de novo* com determinação do ALC% possibilitou determinar a presença dos peptídeos Trp-Leu-Trp-Gly-Ala-Gly-Gly, Cys-Pro-Leu-Ile-Val-Val-Gln-Ser, Leu-Cys-Leu-Thr-Ser-Thr-Val-Ser-Val-Arg como parte da estrutura primária da lectina extraída de semente de *Abelmoschus esculentus* que se encontram conservados no inibidor de tripsina de semente de *Theobroma cacao*, com algumas modificações residuais, e a sequência Ser-Trp-Phe-Arg-Leu-Glu-Ser-Ala-Asn-Val-Pro-Gly-Ser-Arg, que surge como um novo peptídeo identificado na AEL.

Algumas proteínas que reconhecem e interagem com carboidratos, apresentam propriedades multifuncionais e podem exibir homologia sequencial à inibidores do tipo *Kunitz*, mas não desenvolvem nenhuma atividade de inibição de endopeptidases, como a proteína extraída de sementes de *Labramia bojeri* [33=34].

Atividade de inibição de protease da AEL

Ao realizar atividade de inibição enzimática, a AEL apresentou uma atividade de inibitória de 92%, baseado na ação da tripsina sobre o seu substrato, enquanto o inibidor de soja (controle positivo) apresentou uma atividade de 100%. Zhu-Salzman et al [35] sintetizou uma proteína quimérica a partir da fusão de um inibidor de tripsina e uma lectina para desencadear a mortalidade de *Callosobruchus maculatus*. Associação destas duas características em uma única molécula revela o potencial da AEL como bioinseticida.

A relação entre proteínas de armazenamento biologicamente inativas e proteínas bioativas que apresentam normalmente características enzimáticas sugere que algumas proteínas de armazenamento podem ser derivadas a partir de genes que originalmente codificavam proteínas com atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica [36]. Algumas lectinas apresentam essa característica de forma nativa como a lectina extraída da *Talisia esculenta*, que apresentou atividade para larvas de *Diatraea saccharalis* [37].

Atividade inseticida

A incorporação de lectinas purificadas em dietas artificiais e sua síntese por expressão heteróloga em plantas transgênicas evidenciam seu potencial inseticida afetando negativamente o desempenho de muitos insetos-praga interação com carboidratos presentes

no intestino médio de insetos [38]. AEL demonstrou atividade inseticida contra *Ceratitis capitata* nos diferentes estágios de desenvolvimento, através de sua aplicação tópica. Seu efeito variou de acordo com os estágios de desenvolvimento do inseto: larva 1° instar – larva 2° instar – larva 3° instar – pupa. Os perfis de glicosilação dos tecidos dos insetos variam entre os diferentes estágios de desenvolvimento [39] e como consequência estas proteínas podem ser tóxicas para o estágio de larva, enquanto que têm um efeito menos pronunciado sobre outras fases [40-41].

Na fase larval de 1° instar, a AEL (2mg/mL) apresentou atividade, quando comparada ao controle (ddH₂O) (Fig. 4A), enquanto que na fase larval de 2° instar, seu efeito não foi observado, (Fig. 4B). Em larvas do 3° instar, as concentrações 2mg/mL e 1mg/mL apresentaram atividade (Fig. 4C). Os pesticidas químicos tiveram seu efeito 100% em todos os estágios larvais. Na fase de pupa, a atividade da AEL (2mg/mL) foi significativamente maior (71,1%) que os efeitos dos pesticidas Malathion (50,5%) e Agritoato (46,1%). (Fig. 4D).

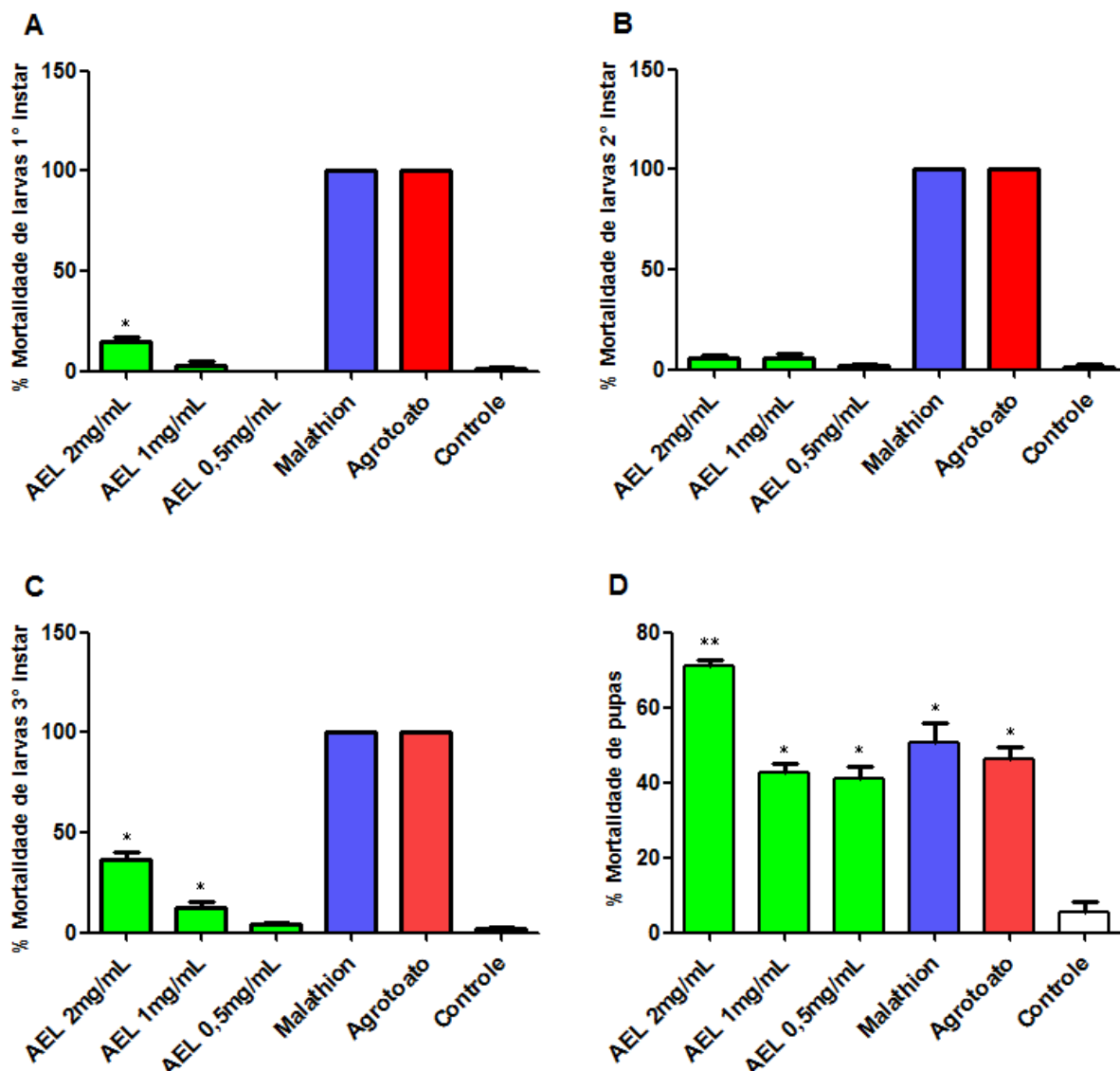


Figura 4. Avaliação *in vitro* da atividade inseticida da AEL e dos organofosforados nas fases de larva de 1° instar (A), 2° instar (B), 3° instar (C) e pupa (D) de *Ceratitidis capitata*. Em (A), a lectina apresentou efeito na concentração 2mg/mL, em (B) não apresentou atividade, em (C) apresentou atividade com 2mg/mL e 1mg/mL. Nas 03 fases larvais os químicos usados foram superiores à lectina. Em (D), a lectina (2mg/mL) foi superior aos pesticidas. Resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. da taxa de mortalidade (n=10). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle, ** comparado ao grupo químico (ANOVA, teste de Bonferroni).

A sua atividade foi evidenciada nos estágios onde há um aumento da ecdisona, um hormônio esteroide secretado pela glândula protorácica de insetos, que ao entrar na hemolinfa é convertida em sua forma ativa, 20-hidroxiecdisona (20 E), sendo responsável por iniciar pequenas mudanças durante o período larval e também pela metamorfose [42]. Seus níveis são regulados pelo Hormônio Juvenil, que concede a realização destas mudanças e previne

seu efeito sobre alterações na expressão gênica responsável pela metamorfose durante o período larval, garantindo uma proliferação isofórmica necessária para o crescimento, mas no último estágio larval e pupa encontra-se apenas em níveis basais [43-45].

Em termos gerais, os efeitos inseticidas das lectinas estão associados a características antinutricionais que são frequentemente observados como resultado de sua ingestão sobre peso larval, fecundidade, formação de pupa, aumentando o período larval e atrasando a emergência do adulto. [46]. A aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) teve seu efeito sobre *Nilaparvata lugens* associado à diminuição de ácido graxos presentes na hemolinfa o que resultou em um atraso no seu crescimento. Contudo, as evidências mostradas pelas alterações morfológicas em larvas de 3º instar e pupa desencadeadas pela AEL e a exibição de seu efeito apenas em estágios onde não há dieta pelo inseto, sugere que sua aplicação tópica resultou em uma aceleração no desenvolvimento do inseto. Nestas fases, os níveis de lipídeos presentes no inseto encontram-se reduzidos [47], o que também levou a efeitos e mudanças morfológicas diferentes às desenvolvidas pelos organofosforados (OP) testados. (Figura 5)

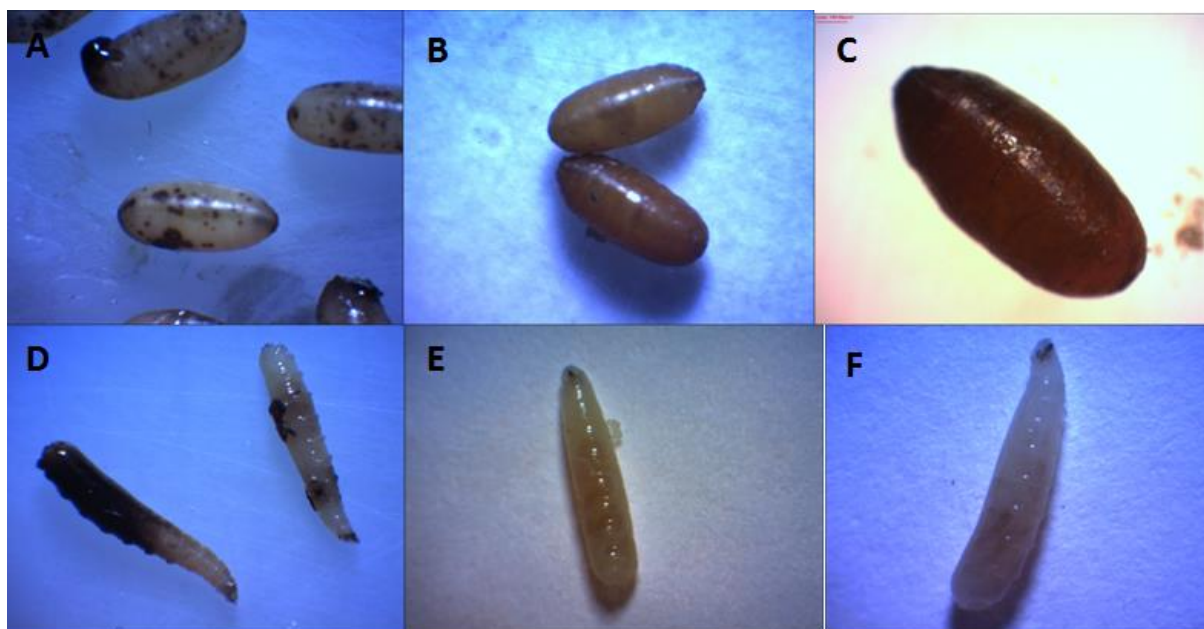


Figura 5. Avaliação das alterações morfológicas causadas por AEL e organofosforados em *Ceratitidis capitata*. (A) Efeito da atividade da AEL (2mg/mL) sobre pupas. (B) Pupa em seu estado morfológico normal. (C) Efeito da ação de Malathion (0.175mg/mL) sobre pupas. (D) Efeito da atividade da AEL (2mg/mL) sobre larvas 3º instar. (E) Larva 3º instar em estado morfológico natural. (F) Efeito da ação de Malathion (0.175mg/mL) sobre larvas 3º instar

Com a revelação da característica molecular e função catalítica da AEL e as mudanças bioquímicas e hormonais do inseto foi possível descrever seu provável mecanismo de ação. O baixo nível de nutrientes nas fases de 3º instar e pupa desencadeia uma proteólise para utilização do glutamato como forma de energia em uma reação de oxidação realizada na mitocôndria pela enzima Glutamato Desidrogenase (GDH) que será utilizado no ciclo Krebs durante a metamorfose [47]. No período larval, principalmente em larva de 1º e 2º instar, há um aumento nos níveis de β -galactosidases e β -manosidases que diminuem os níveis de seus substratos na hemolinfa [48]. Então, como não há presença de seus ligantes, a lectina não atua via reconhecimento de carboidratos e como partir da larva 3º instar não há mais dieta e o resultado da proteólise é a única fonte energética da *Ceratitis capitata*, o impedimento desta ação proteolítica desencadeada pela AEL como inibidor de serinoproteínases, possivelmente aumentaram os níveis de ecdsona para acelerar a sua metamorfose. Durante a fase de pupa, a ecdsona já se encontra em níveis elevados para regular a proliferação e diferenciação de hemócitos e aciona a via apoptótica pela regulação e expressão da quinase de adesão focal (FAK), fosfatidil-inositol 3'-quinase (PI-3K), Src, ERK e Akt promovendo remodelagem de tecidos para formação do adulto [49].

Diferentemente dos produtos químicos se ligam ao centro ativo da acetilcolinesterase (via fosfatidilcolina) de forma irreversível causando inibição e consequente acúmulo de acetilcolina nas sinapses que impedem repolarização da célula nervosa [50]. O uso intensivo de malathion e outros OP no controle de pragas ocasionam uma resistência mediada por alterações na acetilcolinesterase em muitas espécies de insetos [51], e diminui o efeito de outros pesticidas [52-53]. Além de induzir resistência, também contribuem para mortalidade dos predadores e / ou parasitóides da *Ceratitis capitata*, poluição e problemas de saúde humana [54-55].

Atividade nematocida

Em nematóides de galha *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, AEL (0,5 mg/mL) interferiu na eclosão de larvas das 02 espécies. Em *M. javanica*, ela foi capaz de diminuir significativamente o número de eclosão de larvas a partir do 3º dia de avaliação, enquanto em *M. incognita*, a partir do 1º dia. (Figura 6). O gênero *Meloidogyne spp* se torna singular pela sua capacidade de interferir no mecanismo intracelular da célula hospedeira, induzir a diferenciação de células da raiz em células especializadas de alimentação chamadas de células

gigantes para fornecer nutrientes necessários para o parasitismo, em vez de causar a morte celular do hospedeiro e a sua capacidade de manter essa interação por 3-6 semanas necessárias para a conclusão do seu ciclo de vida. [56],

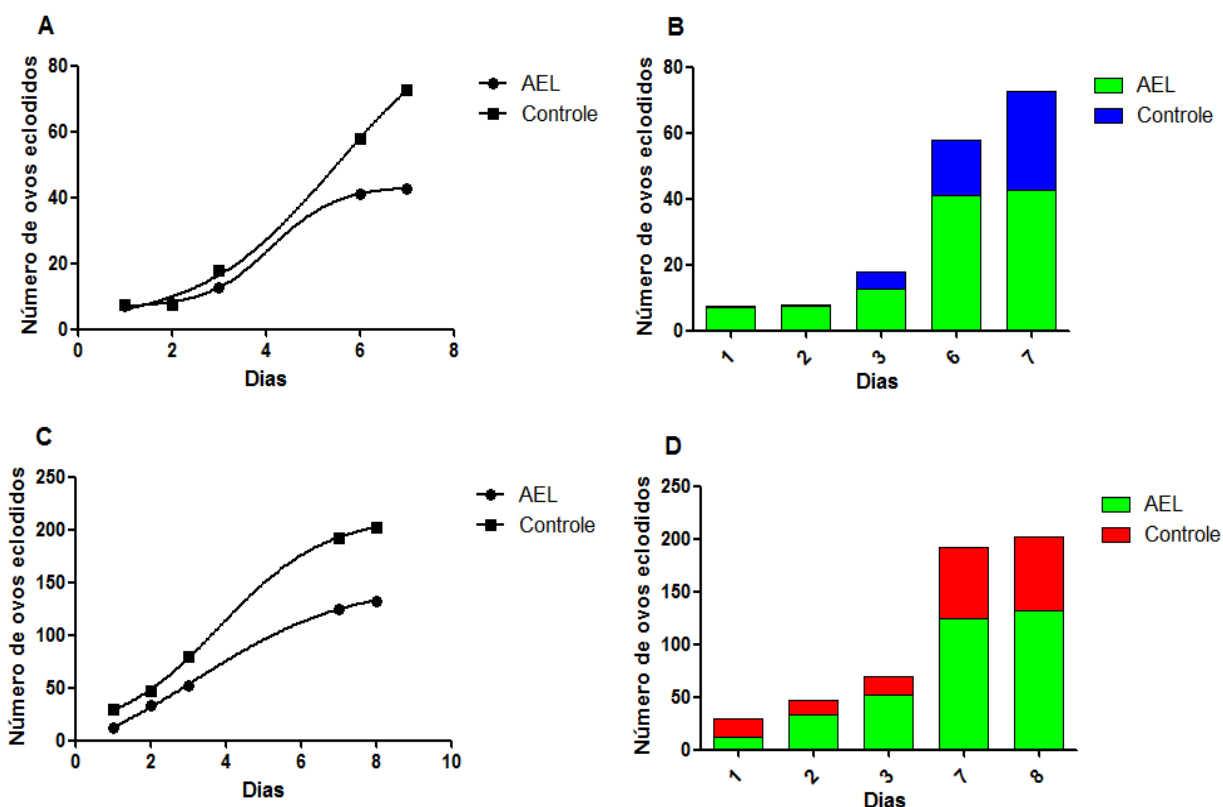


Figura 6. Atividade *in vitro* da AEL(0.5mg/mL) sobre eclosão de larvas de *M. javanica* e *M. incognita*. (A) e (C) Curva inibição/tempo da eclosão de larvas *M. javanica* e *M. incognita*, respectivamente, tratadas com AEL e controle (ddH₂O). (B) AEL apresentou efeito apenas a partir do 3º dia com aumento progressivo sobre a inibição da eclosão de larvas de *M.javanica*. (D) AEL apresentou efeito desde 1º dia de avaliação com aumento progressivo sobre a inibição da eclosão de larvas de *M. incognita*. Resultados são expressos como media $\pm$ E.P.M. da taxa de eclosão (n=10). (Teste T student)

Essa diferença temporal do efeito da AEL sobre a eclosão dos ovos nas 02 espécies pode estar relacionada à idade das fêmeas que depositaram os ovos ou fatores externos, como temperatura e saturação do solo, que diferiram entre as espécies no período de coleta. [57] ou o reconhecimento dos carboidratos ocorreu de forma diferenciada. Os tipos de resíduos de carboidratos e sua distribuição ao longo do corpo dos nematóides são diferentes entre as espécies e indica especificidade a sinais químicos atrativos, desta forma a versatilidade

estrutural dos carboidratos confirma o perfil de glicosilação como uma característica individual e podem ser considerados como um perfil para o armazenamento de informação [58]

Eles apresentam 02 tipos de receptores: os quimiorreceptores, ligados à membrana do neurônio, e os receptores de superfície, ambos contendo carboidratos [59] que são responsáveis por responder a estímulos externos. A ação nematocida da AEL sobre larvas juvenis (J2) dos nematóides de galha foi perceptível desde o período de 24h. Em *M.javanica*, não foi observado alteração do seu efeito durante o período de 03 dias de avaliação. A taxa de mortalidade em larvas juvenis (J2) de *M.incognita* apresentou um aumento gradativo entre 23-72hs (8.56% para 11.34%) (Figure 7).

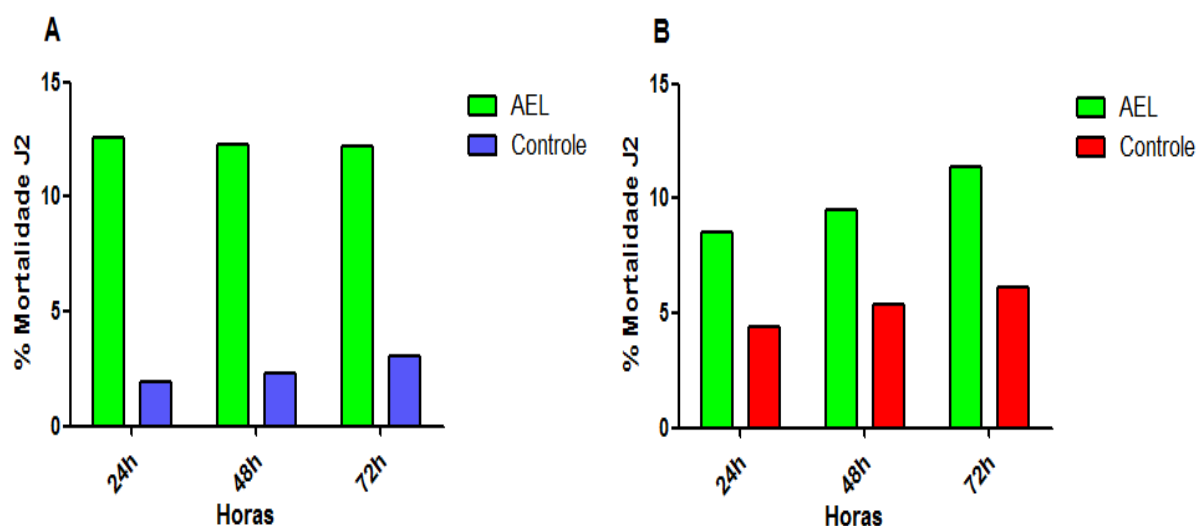


Figura 7. Avaliação *in vitro* da atividade da AEL (0.5mg/mL) sobre larvas juvenis (J2) de *M. javanica* e *M. incognita*. (A) Mortalidade de J2 de *M.javanica* tratadas com AEL, havendo uma discreta redução durante período de avaliação. (B) Mortalidade de J2 de *M.incognita* tratadas com AEL, havendo um aumento progressivo durante período de avaliação.

Realizado a análise de taxa de eclosão e mortalidade de J2, levando em consideração o controle como ocorrência natural dos eventos, percebeu-se que as 02 espécies de nematoides apresentaram comportamentos diferentes em contato com AEL. Ao avaliar a taxa de eclosão nos 1º, 3º e 7º dias, percebe-se que ocorreu um aumento progressivo da sua atividade em *M.javanica* e diminuição para *M.incognita*, mas sobre a taxa de mortalidade em larvas,

ocorreu um aumento de seu efeito sobre *M. incognita* e diminuição em *M. javanica* (Figura 8).

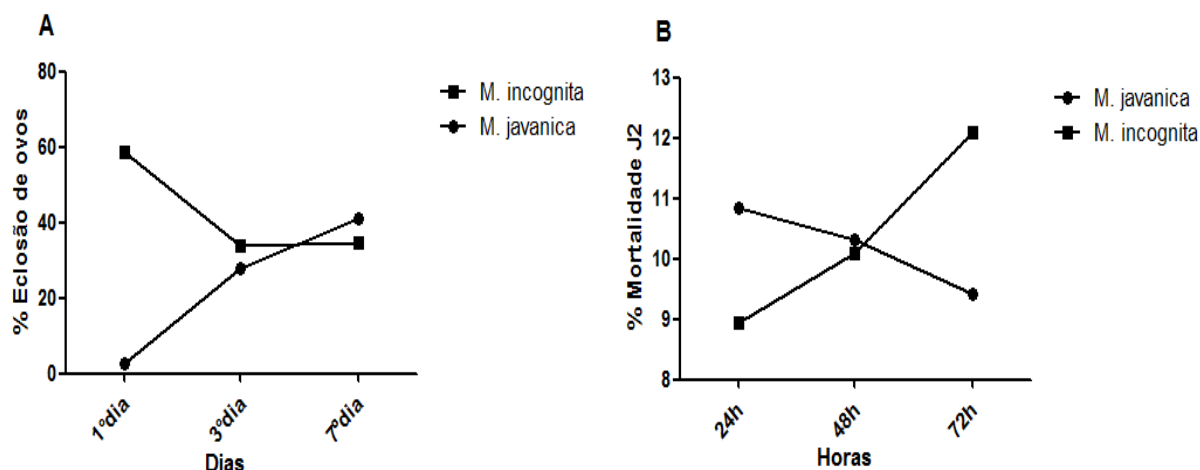


Figura 8. Análise comparativa da atividade da AEL (0.5mg/mL) sobre a eclosão de larvas e mortalidade de J2 de *M. javanica* e *M. incognita*. (A) Avaliação do 1º, 3º e 7º dia, com redução do efeito de AEL sobre eclosão de *M. incognita*, enquanto há um aumento para *M. javanica*. (B) Redução do efeito nematocida da AEL em J2 de *M. javanica*, enquanto há um aumento de seu efeito para *M. incognita*, nas primeiras 72h.

Os efeitos das lectinas sobre nematóides foram estudadas por Zuckerman [58], que relatou um bloqueio na reação do sistema quimiorreceptor do nematóide através da ligação de lectinas que desencadeia uma mudança quimiotrópica. Lectina isolada de *Acacia farnesiana* (AFAL) foi capaz de inibir a eclosão de ovos com ação crescente ao longo do tempo em *M. incognita* e seu efeito sobre J2 só foi possível avaliar após 48 h. AFAL interage com a membrana que cobre a casca do ovo, que consiste em quitina, desta forma ela pode passar pela casca e ter um efeito direto sobre as células fitonematóide. É também possível que a interação de AFAL com os ovos desagrega a estrutura de proteção do ovo, que prejudica o seu desenvolvimento normal [60]. Lectina RVL (*Remusatia vivipara*) manose-específica, apresentou um grande efeito nematocida em *M. incognita* através de sua ligação à quimiorreceptores [61]. Estes receptores são sintetizados e secretados como proteínas efetoras pelos J2, responsáveis pela manutenção do parasitismo, como o fator de alongação 1α (EF-1 α) [62], que também é produzido durante a embriogênese mas com a função de proliferação e diferenciação celular [63]. Desta forma, a ligação de lectinas à estes tipos de receptores possibilitam suas atividades em larvas e em ovos, como demonstrado pela AEL.

Atividade fungistática

A presença de manose, quitina e outros sacarídeos são importantes componentes da parede celular de fungos e o reconhecimento destes carboidratos pelas lectinas pode inibir seu crescimento [64], porém esta propriedade é relativamente baixa na maioria dos casos em comparação com outras proteínas vegetais com propriedades anti-fúngica / antimicrobiana. [65]

Apesar da lectina *Abelmoschus esculentus* (AEL) ser manose e galactose específica, ela não apresentou atividade fungicida contra as linhagens testadas. Este efeito é geralmente associado a proteínas que se ligam a quitina, como a lectina de sementes de *Moringa oleifera*, uma quitinase que apresentou efeitos sobre *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides* pela inibição da germinação de esporos e crescimento micelial. [66], mas algumas lectinas do tipo galactose e manose específica também apresentam atividades antifúngicas [67-68].

Klafke e colaboradores [69] em ensaios para avaliação do crescimento inibitório e fungicida em leveduras mostrou que AEL apresentou atividade apenas no crescimento da *Candida parapsilosis*. Paredes celulares de fungos filamentosos consistem nos componentes básicos de paredes celulares das leveduras (manoproteínas, β -glucanas e quitina), mas, geralmente, contem mais quitina (10-15% de quitina) e podem conter polímeros adicionais [70], o que pode ter impedido a ação da molécula. A lectina de girassol (*Helianthus annuus*) com os mesmo ligantes específicos da AEL foi capaz de inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (filamentoso) e de *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. albicans* [71]. Isto sugere que os efeitos da AEL não estão relacionados apenas a reconhecimento de seu ligante..

6. CONCLUSÕES

Atividades desencadeadas pela lectina extraída de sementes de *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) em organismos fitoaptógenicos está relacionada à seu domínio de reconhecimento de ligantes específicos e a sua propriedade de inibição de serinoproteinases que pode atuar de forma sinérgica ou independente à depender do parasita, portanto, deve ser caracterizada como um inibidor de endopeptidase com domínio lectínico. Como proteínas que apresentam estas propriedades moleculares independentes são utilizadas para indução de resistência através de sua introdução heteróloga em espécimes vegetais modificadas geneticamente, a AEL se torna uma ferramenta valiosa para este fim. Contudo, devem-se avaliar outros métodos de aplicação, como dieta, e verificar sua ação sobre insetos benéficos para garantir sua viabilidade.

REFERÊNCIAS

- [1] W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiol* 109 (1995) 347–352.
- [2] D.K. Mandal, N. Kishore, C.F. Brewer, Thermodynamics of lectincarbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to concanavalin A, *Biochemistry* 33 (1994) 1149–1156
- [3] A. Garcia-Pino, L. Buts, L. Wyns, A. Imberty, R. Loris, How a plant lectin recognizes high mannose oligosaccharides, *Plant Physiol* 144 (2007) 1733–1741.
- [4] T.L. Hopkins, M.S. Harper, Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure, *Arch. Insect Biochem. Physiol* 47 (2001) 100–109.
- [5] C. Ripoll, B. Favery, P. Lecompte, E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, P. Abad, L. Jouanin, Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes, *Plant Sci.* 164 (2003) 517–523.
- [6] J.H. Wong, T.B. Ng, R.C. Cheung, X.J. Ye, H.X. Wang, S.K. Lam, P. Lin, Y.S. Chan, E.F. Fang, P.H. Ngai, L.X. Xia, X.Y. Ye, Y. Jiang, F. Liu, Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 87 (2010) 1221–1235.
- [7] E.L.N. Costa, R.F.P. Silva, L.M. Fiuza, Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensia*, 26(2) (2004): 173-85
- [8] M. L. R. Macedo, C. F. R. Oliveira, C. T. Oliveira, Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection, *Molecules*. 20(2) (2015): 2014-2033
- [9] B. Al Atalah, G. Smagghe, E.J.M. Van Damme, Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects. *Plant Science*. 221–222 (2014): 21–28.
- [10] E. J. M. Van Damme, N. LANNOO, W. J. PEUMANS, Plant lectins. *Advances in Botanical Research*, 48 (2008): 107–209

- [11] T. Walski, E.J.M. Van Damme, G. Smagghe, Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. *Journal Insect Physiology* 70 (2014), 94–101.
- [12] G.M. Poppy, J.P. Sutherland, Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiology Entomology* 29 (2004) 257–268
- [13] G.S.F. Soares, A.M.S. Assreuy, C.A.A. Gadelha, V.M. Gomes, P. Delatorre, R.C. Simões, B.S. Cavada, J.F. Leite, C.S. Nagano, N.V. Pinto, H.L.F. Pessoa, T. Santi-Gadelha, Purification and Biological Activities of *Abelmoschus esculentus* Seed Lectin, *Protein J* 31 (2012) 674–680.
- [14] L.G. Monte, T. Santi-Gadelha, L.B. Reis, E. Braganhol, R.F. Prietsch, O.A. Dellagostin, R.R. Lacerda, C.A.A. Gadelha, F.R. Conceição, L.S. Pinto, Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells, *Biotechnol Lett* 36 (2014) 461–469.
- [15] A.B. Chakraborty, H. Xie, S.J. Skilton, J.C. Gebler, W. Chen, Improving the analytical workflow for protein biopharmaceutical characterization with a novel LC–MS system solution. *Current Trend In Mass Spectrometry, Special Issues*, (2009)
- [16] E. P. Siskos, M. A. Konstantopoulou, B. E. Mazomenos, Insecticidal activity of *Citrus aurantium* peel extract against *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* adults (Diptera:Tephritidae), *J. Appl. Entomol* 133 (2009) 108–116
- [17] K. Xing, A.A. Hoffmann, C-S. Ma, Does Thermal Variability Experienced at the Egg Stage Influence Life History Traits across Life Cycle Stages in a Small Invertebrate? *PLoS ONE* 9(6) (2014) e99500
- [18] J.I.S. Boneti, S. Ferraz, Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro, *Fitopatologia Brasileira* 6 (3) (1981) 553.
- [19] J.F. Southey, Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 5 (1970) 148.

- [20] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95 (1961): 271-278.
- [21] F.Q. Oliveira, J.B. Malaquias, L.L. Ferreira, T.S. Ribeiro, A.I.A. Pereira. Efficacy of molasses and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill on the control of *Cosmopolites sorditus* Germar, 1824, *Eng Ambient*, 7 (2010) 127–132.
- [22] D.M.C. Nguyen, D.J. Seo, K.Y. Kim, R.D. Park, D.H. Kim, Y.S. Han, T.H. Kim, W.J. Jung, Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*, *Microbial Pathogenesis* 59(60) (2013) 52-59.
- [23] W.S. Abbot, A method of computing the effectiveness of an insecticide, *J. Econ. Entomol* 18 (1925) 265–267
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9 Clinical and Laboratory Standards Institute 32(2) (2012).
- [25] H. Tai, L. McHenry, P.J. Fritz, D.B. Furtek, Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors, *Plant Molecular Biology*. 16(5) (1991): 913-915
- [26] S. Krauchenco, S.C. Pando, S. Marangoni, I. Polikarpov,. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds, *Biochemistry. Biophysical. Research. Communication*..312 (2003): 1303–1308
- [27] S. Krauchenco, R.A.P. Nagem, J.A. Silva, S. Marangoni, I. Polikarpov, Threedimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie*. 86 (2004): 167–172.
- [28] S. Khamrui, H. Dasgupta, J.K. Dattagupta, U. Sen, Single mutation at P1 of a chymotrypsin inhibitor changes it to a trypsin inhibitor: X-ray structural (2.15 angstrom) and biochemical basis. *Biochemistry. Biophysical. Acta, Proteins Proteomics* 1752, (2005): 65–72.

- [29] J. Colinge, A. Masselot, M. Giron, T. Dessingy, J. Magnin, OLAV: towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification. *Proteomics* 3(8) (2003): 1454–1463
- [30] A.I. Nesvizhskii, O. Vitek, R. Aebersold, Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods*, 4(2007): 787–797
- [31] Ma, B., Zhang, K.-Z., Hendrie, C., Liang, C.-Z., Li, M., Doherty-Kirby, A., & Lajoie, G. (2003). PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 2337–2342.
- [32] M.D. Cantu, E. Carrilho, N.A. Wulff, M.S Palma. (2008). Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quím. Nova* [online]. 31(3): 669-675
- [33] M.L.R. Macedo, M.G.M. Freire, L.T.D. Martins, D.S. Martinez, V.M. Gomes, M.B. Smolka, M.H. Toyama, S. Marangoni, L.C.B.B. Coelho,. Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. seeds homologue to Kunitz-type trypsin inhibitor with lectin-like properties *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 52 (2007a): 7548–7554.
- [34] M.L.R. Macedo, M.G.M. Freire, L.T.D.M. Martin, D.S.T. Martinez, V.M. Gomes,, M.B. Smolka, M.H. Toyama, S. Marangoni, L.C.B.B. Coelho,. Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. seeds homologue to Kunitz-type trypsin inhibitor with lectin-like properties. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 55, (2007b) 2653–2658.
- [35] K. Zhu-Salzman, J.E. Ahn, R.A. Salzman, H. Koiwa, R.E. Shade, S. Balfe, Fusion of a soybean cysteine protease inhibitor and a legume lectin enhances anti-insect activity synergistically, *Agricultural and Forest Entomology*., 5 (2003): 317–323.
- [36] E.J.M. Van Damme, Q. Hao, A. Barre, P. Rougé, F.V. Leuven, W.J. Peumans, Major protein of resting rhizomes of *Calystegia sepium* (Hedge Bindweed) closely resembles plant mases but has no enzymatic activity. *Plant Physiology*. 122, (2000): 433–445
- [37] Md, Freire, O.L. Franco, C.E. Kubo, L. Migliolo, R.H. Vargas, C.F. de Oliveira, J.R. Parra, M.L. Macedo, Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 161(1) (2012): 86-92

- [38] G. Vandenborre, G. Smagghe, E.J.M. Van Damme, Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects, *Phytochemistry* 72 (2011) 1538–1550
- [39] K. Aoki, M. Perlman, J.M. Lim, R. Cantu, L. Wells, M. Tiemeyer, Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo, *Journal Biology Chemistry*. 282 (2007): 9127–9142.
- [40] A. Lehrman, I. Ahman, B. Ekbom,. Influence of pea lectin expressed transgenically in oilseed rape (*Brassica napus*) on adult pollen beetle (*Meligethes aeneus*), *Journal Applied Entomology*. 131(2007): 319–325
- [41] M. Melander, I. Ahman, I. Kamnert, A.C. Strömdahl, Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae, *Transgenic Research*. 12 (2003): 555–567
- [42] W.G. Goodman, M. Cusson, The juvenile hormones, in: L.I. Gilbert (Ed.), *Insect Endocrinology*, Elsevier, Amsterdam, (2012) 310–365
- [43] L.M. Riddiford, Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis, *General and Comparative Endocrinology*. 34 (1978): 438–446
- [44] L.M. Riddiford, Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions, *Advanced Insect Physiology*. 24 (1994): 213–274
- [45] K. Hiruma, L.M. Riddiford, Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Journal Insect Physiology*. 56 (2010): 1390–1395.
- [46] C.F.R. Oliveira, L.A. Luz, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, S. Marangoni, M.L.R. Macedo, Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*., 46 (2011): 498–504
- [47] D. Nestel, D. Tolmasky, A. Raboss, L.A. Quesada-allue. Lipid, Carbohydrates and Protein Patterns During Metamorphosis of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), *Ann. Entomol. Soc. Am* 96(3) (2003) 237-244

- [48] F.C. Silva, A. Alcazar, L.L. Macedo, A.S. Oliveira, F.P. Macedo, L.R. Abreu, E.A. Santos, 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* 36(7) (2006): 561-569
- [49] I. Mamali, M.N. Tatari, I. Micheva, M. Lampropoulou, V.J. Marmaras. Apoptosis in medfly hemocytes is regulated during pupariation through FAK, Src, ERK, PI-3K p85a, and Akt survival signaling. *J. Cell. Biochem* 101 (2007) 331–347
- [50] M. Eto, *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*. CRC Press, Cleveland (1974) 123-158.
- [51] G. Oakeshott, C. Claudianos, P.M. Campbell, R. Newcomb, R.J. Russell, Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford (2005) 309–381.
- [52] J.H. Baek, J.I. Kim, D.W. Lee, B.K. Chung, T. Miyata, S.H. Lee, Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*, *Pestic. Biochem. Physiol* 81 (2005) 164–175
- [53] J.C Hsu, D.S. Haymer, W.J. Wu, H.T. Feng, Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36 (2006) 396–402.
- [54] C. Magana, P. Hernandez-Crespo, A. Brun-Barale, F. Couso-Ferrer, J.M. Bride, P. Castañera, R. Feyereisen, F. Ortego, Mechanisms of resistance to malathion in the Medfly *Ceratitis capitata*, *Insect Biochem Mol Biol* 38 (2008) 756–762
- [55] J. Vontas, P. Hernández-Crespo, J.T. Margaritopoulos, F. Ortego, H-T Feng, K. D. Mathiopoulos, J-C. Hsu, Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pestic Biochem Physiol* 100 (2011) 199–205.
- [56] M-C. Caillaud, G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. De Almeida Engler, P. Abad, M-N. Rosso, B. Favery, Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165 (2008) 104–113
- [57] G. DE Guiran, Facteurs induisant chez *Meloidogyne incognita* un blocage du développement des oeufs considéré comme une diapause, *Revue Nématol* 3(1) (1980) 61-69.

- [58] B.M. Zuckerman, Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses, *Journal of Nematology* 15 (1983) 173–182
- [59] H.B Jonsson,. Receptors and recognition in nematodes. In: Veech, JA;Dickson, DW editors *Vistas on Nematology*, Hyattsville: Society of Nematology, (1987) 153-158.
- [60] T. Santi-Gadelha, B.A.M. Rocha, C.A.A. Gadelha, H.C. Silva, R.E.R. Castellon, F.J.T. Gonçalves, D.O. Toyama, M.H. Toyama, A.J.F. de Souza, L.O.S. Beriam, J.L. Martinsh, P.P. Joazeiro, B.S. Cavada, Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (2012) 15–22.
- [61] G.G. Bhat, K.N. Shetty, N.N. Nagre, V.V. Neekhara, S. Lingaraju, R.S. Bhat, S.R. Inamdar, K. Suguna, B.M. Swamy, Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematocidal activity, *Glycoconj J* 27 (2010) 309–320.
- [62] M. Jaouannet, L. Perfus-Barbeoch, E. Deleury, M. Magliano, G. Engler, P. Vieira, E.G.J Danchin, M.D. Rocha, P. Coquillard, P. Abad, M.-N. Rosso, A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist*, 194 (2012): 924–931.
- [63] A. Ismail, B.F. Matthews, N.W Alkharouf, RKN Lethal DB: A database for the identification of Root Knot Nematode (*Meloidogyne spp.*) candidate lethal genes, *Bioinformation* 8(19) (2012):950-95.
- [64] A.P. Boleti, M.D. Freire, M.B. Coelho, W.D. Silva, P.A. Baldasso, V.M. Gomes, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L. Macedo, Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 55(7) (2007) 2653-2658
- [65] C.P. Selitrennikoff, Antifungal proteins, *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2001) 2883–2894.
- [66] J. M. Gifoni, J. T. A. Oliveira, H. D. Oliveira, A. B. Batista, M. L. Pereira, A. S. Gomes, H. P. Oliveira, T. B. Grangeiro, I. M. Vasconcelos, A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Biopolymers*, 98 (2012) 406–415.

- [67] V. M. M. Melo, I. M. Vasconcelos, V. M. Gomes, M. Da cunha, A. A. Soares, J. T. A. Oliveira, A Cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus Niger* and glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, 169 (2005) 629-639
- [68] J.D. Souza, M.B.R. Silva, A.C.C. Argolo, T.H. Napoleão, R.A. Sá, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva, L.C.B.B. Coelho, A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65(5) (2011) 696–702
- [69] G.B. Klafke, G.M. Moreira, L.G. Monte, J.L. Pereira, T.M. Brandolt, M.O Xavier, T. Santi-Gadelha, O.A. Dellagostin, L.S. Pinto, Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology, *Mycopathologia* 175(1-2) (2013) 147-51.
- [70] T. Fontaine, C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine, C.E. Vorgias, M. Diaquin, J.P. Latge, Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall, *Journal Biology.Chemistry*. 275 (2000) 27594–27607..
- [71] M. Regente, G.B Taveira, M. Pinedo, M.M Elizalde, A.J Ticchi, M.S Diz, A.O Carvalho, L. de la Canal, V.M Gomes, A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications, *Current Microbiology*. 69(1) (2014): 88-95