



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EFEITO DE INIBIDORES DE TRIPSINA OBTIDOS DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Witt SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

LUIZ CARLOS PEREIRA ALMEIDA FILHO

FORTALEZA-CEARÁ

2013

LUIZ CARLOS PEIREIRA ALMEIDA FILHO

EFEITO DE INIBIDORES DE TRIPSINA OBTIDOS DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Witt SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A448e Almeida Filho, Luiz Carlos Pereira.
Efeito de inibidores de tripsina obtidos de sementes de *Leucaena leucocephala* (lam) r. de Witt sobre o desenvolvimento de *Aedes aegypti* / Luiz Carlos Pereira Almeida Filho. – 2013.
92. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Area de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
1. *Aedes aegypti*. 2. Leucena. 3. Inibidor da tripsina 4. Larvicida. 5. Proteína . I. Título.

CDD 574.192

LUIZ CARLOS PEREIRA ALMEIDA FILHO

EFEITO DE INIBIDORES DE TRIPSINA OBTIDOS DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Witt SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA



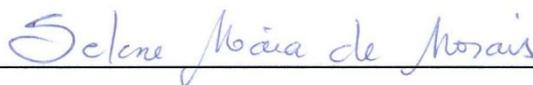
Profª. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª. Dra Ilka Maria Vasconcelos

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª. Dra. Selene Maia de Moraes

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus avós.

Aos meus pais.

Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, sem ele o tudo seria nada.

À professora Dra. **Ana de Fátima Fontenele U. Carvalho**, por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação e sábias palavras, pelos conselhos, ensinamentos e confiança a mim creditada e pelas histórias, pelas risadas e por sempre propiciar um ambiente de trabalho amistoso. A ela o muitíssimo obrigado!

À professora Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, por aceitar participar da avaliação deste trabalho e pelas valiosíssimas contribuições que culminaram no melhoramento do mesmo. A ela meu muito obrigado!

À professora Dra. **Selene Maia de Moraes**, por aceitar, prontamente, participar desta defesa e pelas sugestões e contribuições auferidas. A ela meu muito obrigado!

À professora Dra. **Cristina Paiva da Silveira Carvalho** e ao professor Dr. **Marcio Viana Ramos**, por me orientarem durante o período de graduação. Esses valiosos ensinamentos, me permitiram crescer e me tornar independente, desenvolvendo o perfil desejado de um pesquisador acadêmico. A vocês meu muito obrigado!

À minha mãe **Lúcia Cristyanne**, por todo o apoio e amor durante todos esses anos e que mesmo estando longe, sempre se fez presente em minha vida. Obrigado pela vida, pelo carinho incondicional, pelo “amor de mãe”. Até o teu pousar “pássaro de fogo”!

Às minhas avós **Maria Nilce e Luiza**, pelo carinho e cuidado voltados a mim desde pequeno e nesses últimos anos, pelo amor de vó, pelos ensinamentos e castigos. Vocês são parte da sólida base do meu caráter. Obrigado vovós!

Aos meus avôs **Pedro e Jerônimo**, pelas histórias, pelos domingos no aeroclube, pelas férias no sítio, pelo carinho e por sempre me tratarem como um netinho, para Pedro, o Pingo, e Jerônimo, o Luizinho. Obrigado vovôs!

Ao meu irmão **Lucas Holanda**, pela paciência e calma, pela diária convivência mesmo essa sendo rara, pelas saídas, pelo apoio. Obrigado, irmão!

À minha irmã **Luiziane Holanda**, pelo carinho e dedicação em cuidar do “irmãozinho”, pelo companheirismo e palavras confortantes em momentos difíceis, por ser minha amiga e confidente, pelo amor. Obrigado, irmã!

Aos integrantes do Bioprospec, **Davi Farias, Lady Clarissa, Nathanna Mateus, Renata Maria, Gabrielle Freire, Leonardo Vieira, Pedro Matheus, Renalison Farias, Jackeline Medeiros e Thiago Almeida**, pela convivência sempre harmoniosa, pelos conselhos, pelas risadas, pelos *coffee breaks* na copa, momentos esses sempre muito relaxantes. À **Berenice Alves**, pelos cuidados com todos nós e ao **Valdenor**, por sempre manter o limpo nosso ambiente de trabalho e pelas risadas. Obrigado a todos vocês!

À **Nayana Soares**, pelo companheirismo, paciência e ajuda com experimentos realizados no insetário do Bioprospec. Obrigado Nay!

Ao **Martônio Viana**, pelas conversas e discussões de resultados, que sempre geraram boas ideias, culminando em bons resultados. Mart valeu mesmo!

À **Terezinha Maria**, por todos esses anos de convivência, pela paciência, pelas risadas, pelos puxões de orelha, pelo seu espírito motivacional, pela ajuda com experimentos com mosquitos. Sem você talvez eu não tivesse “chegado lá”. Teh, obrigado por tudo. Obrigado por ser essa amiga!

À **Luína Benevides e Gabriela Fernandes**, minhas amigas na graduação e na vida, pelo companheirismo, pela amizade, por sempre me incentivarem, vocês fazem parte do meu tesouro da graduação, meu muito obrigado!

Aos **AMIGOS**, por todos os momentos felizes que vivemos juntos, em especial a **Cristiano Regis Freitas, Ivan Sampaio e Marcos Passos**, por sempre me levantarem ao perceber o meu fraquejar, por sempre me fazerem rir mesmo em momentos tristes, por não me deixarem desistir, pelos abraços amigos, pelos conselhos, pela amizade e amor sinceros. O meu muito obrigado a vocês.

Obrigado a todos!

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições e Unidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio de financiamento de recursos para o projeto “Valorização de Espécies Vegetais de Áreas Semi-Áridas Susceptíveis à Desertificação no Estado do Ceará: Desenvolvimento de Bioprodutos Alimentícios e Inseticidas/Repelentes com Elevado Valor Sócio-Ambiental Agregado”

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

RESUMO

A dengue é considerada, hoje, a arbovirose mais importante do mundo, tendo distribuição e ressurgência em todos os continentes e aumento das áreas de incidência devido às mudanças climáticas. Um dos motivos que a torna tão importante é ausência de uma vacina eficaz para os quatro sorotipos do vírus. Assim, para o controle dessa doença é necessário que haja o combate ao vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Os atuais programas de combate ao mosquito dispõem de inseticidas sintéticos, contudo o surgimento de populações resistentes a esses inseticidas representa um entrave ao combate deste mosquito. Desta forma, torna-se necessária a busca por novas moléculas inseticidas ou capazes de potencializar o efeito tóxico dos inseticidas atuais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de inibidores de tripsina de sementes de *Leucaena leucocephala* e avaliação do potencial inseticida dessas moléculas sobre as larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Para isso, as proteínas presentes nas sementes de *L. leucocephala* foram extraídas, fracionadas e submetidas à cromatografia de afinidade a anidrotripsina acoplada a sepharose 4B, para a obtenção de uma fração rica em inibidores de tripsina denominada sLITi, a qual foi caracterizada bioquimicamente e utilizada em concentração de 0,3 mg/mL nos ensaios de desenvolvimento das larvas do mosquito. A caracterização bioquímica do sLITi permitiu concluir que os inibidores são termorresistentes (a atividade foi mantida após aquecimento por 30 min. a 100 °C), apresentam considerável resistência ao agente redutor (DTT), tendo decaimento da sua atividade inibitória frente a tripsina apenas quando incubado com 100 mM de DTT por 120 min, o mesmo, também, é resistente às variações de pH na faixa de 2 a 10. Os zimogramas reversos revelaram a presença de bandas proteicas com massa molecular aparente de 20 kDa. Testes biológicos *in vitro* mostraram que o sLITi apresenta atividade inibitória superior a 90% frente a tripsina e 70% frente ao homogenato intestinal de larvas de *Ae. aegypti*. Após a realização de eletroforese bidimensional, foi possível a visualização de isoformas com pI entre 4 e 7, aproximadamente. Esses inibidores são capazes de inibir as proteases de larvas de *Ae. aegypti* *in vivo* em 56%, causando retardo no desenvolvimento e cerca de 70% de mortalidade. Assim, o sLITi possui potencial ação inseticida contra o mosquito vetor da dengue.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Leucena, inibidor de tripsina, larvicida, proteína.

ABSTRACT

Dengue fever is currently the most important arboviral disease in the world, being widely distributed among the continents and having increased incidence areas due to climate change. One of the reasons that makes it so important is the absence of an effective vaccine against the four virus serotypes. So, to control this disease is necessary to fight the disease vector, the mosquito *Aedes aegypti*. Nowadays, health programs use synthetic insecticides to control the mosquito populations. However, the emergence of resistant populations to these insecticides is an obstacle to combating this mosquito. Thus, it is necessary to search for new insecticides or molecules capable of enhancing the toxic effect of current insecticides. The present study aimed to obtain trypsin inhibitors from *Leucaena leucocephala* seeds and evaluate the insecticidal potential of these molecules against *Ae. aegypti* larvae survival and development. For this, the proteins of *L. leucocephala* seeds were extracted, fractionated and subjected to anhydrotrypsin affinity chromatography to obtain a trypsin-enriched fraction (called sLITi), which was biochemically characterized and used at a concentration of 0.3 mg/mL in assays of larvae development. Biochemical characterization of sLITi concluded that the inhibitors are heat resistant (the activity was retained after heating for 30 min at 100 ° C), showed considerable resistance to the reducing agent DTT and reduction of their inhibitory activity against trypsin was demonstrated only when incubated with 100 mM DTT for 120 min. The inhibitor is also resistant to pH changes in a range from 2 to 10. The reverse zymograms revealed the presence of protein bands with apparent mass near 20 kDa. Biological testing in vitro showed that the sLITi showed trypsin inhibitory activity greater than 90% and that sLITi is also capable to inhibit *Ae. aegypti* digestive enzymes by 70%. After two-dimensional electrophoresis isoforms with pI ranging from 4 to 7, approximately, were observed. These inhibitors were able to inhibit proteases of *Ae. aegypti* in vivo by 56%, and was capable to delay the larval development after incubation for 10 days. Thus, sLITi contains proteins with promising insecticidal action against dengue vector.

Keywords: *Aedes aegypti*, Leucena, trypsin inhibitor, larvicidal, protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de casos de dengue no Brasil, nos anos de 1990-2011	21
Figura 2 - Países em áreas de risco de transmissão da dengue em 2008.	23
Figura 3- Distribuição do mosquito <i>Aedes aegypti</i> no Brasil em 2006.	24
Figura 4 - Ciclo de vida de dípteros do gênero <i>Aedes</i>	26
Figura 5 - Porte arbustivo (A); Flor plumosa (B); Fruto (C) e Sementes (D) de <i>Leucaena leucocephala</i>	35
Figura 6 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) do Extrato Bruto de Leucena (EBL) e frações proteicas. 1- Marcador Molecular [Fosforilase b de coelho (97 kDa); Albumina bovina (66 kDa); Ovalbumina do ovo de galinha (45 kDa) Anidrase carbônica bovina (30 kDa) Inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa) alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- EBL; 3-8: Frações proteicas 0,5-3% precipitadas com TCA.	51
Figura 7- Perfil cromatográfico da Fração proteica obtida em TCA 3% (LF3) de <i>Leucaena leucocephala</i> dissolvida em Tris-HCl 50 mM pH 7,5 aplicada em coluna de afinidade a anidrotripsina equilibrada com tampão com o mesmo tampão, fluxo aproximado de 0,5 mL/min, com frações de 1,5 mL. A fração retida foi eluída aplicando-se HCl 50 mM a coluna.	53
Figura 8 (A) -Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) 1- Marcador Molecular [Fosforilase b de coelho (97 kDa); Albumina bovina (66 kDa); Ovalbumina do ovo de galinha (45 kDa) Anidrase carbônica bovina (30 kDa) Inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa) alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- Extrato Bruto de Leucena (EBL); 3- Fração proteica obtida em TCA 3% (LF3); 4- sLITi; 5- Pico não retido da fração proteica obtida em TCA 3% (LF3) anidrotripsina (PNr). (B) 1- Marcador molecular; 2- sLITi em condições redutoras; 3 Pnr em condições redutoras (β - mercaptoetanol.) em ambos os casos foram aplicados 20 μ g de proteína.	55
Figura 9 – Percentual de inibição da atividade proteolítica da tripsina pelo sLITi após a exposição ao agente redutor DTT em diferentes concentrações e tempos	57
Figura 10 – (A) Avaliação da resistência da atividade inibitória percentual de tripsina pelo sLITi quando incubado em diferentes faixas de pH; (B) Termoresistência do sLITi e verificação da atividade inibitória.	58
Figura 11 – (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%), 1- marcador de massa molecular; 2- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 3- sLITi. (B) Zimograma reverso obtido em gel de	

poliacrilamida 15% após a digestão com tripsina bovina, 1- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 2- sLITi. Em ambos os géis foram aplicados 20 µg de proteínas.....	59
Figura 12 (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%), 1- marcador de massa molecular; 2- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 3- sLITi. (B) Zimograma reverso obtido em gel de poliacrilamida 15% após a digestão com tripsina bovina, 1- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 2- sLITi. Em ambos os géis foram aplicados 20 µg de proteínas.....	60
Figura 13 – Gel de eletroforese bidimensional para o sLITi, obtido após a focalização isoeétrica em tira com variação de pH de 3-10 linear e segunda dimensão em gel de acrilamida 15% contendo SDS. Foram utilizados 35 µg de proteínas	62
Figura 14 (A) Percentual de ovos eclodidos de <i>Aedes aegypti</i> após 2 dias de incubação em soluções aquosas contendo Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL; (B) Média do número de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estádios de desenvolvimento após 4 dias incubadas com as amostras Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL.....	63
Figura 15 Aspecto morfológico das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 4 dias incubadas em água e soluções proteicas com concentração de 1mg/mL, (B) albumina sérica bovina, (C) inibidor Bowman-Birk da soja e (D) sLITi. A barra corresponde a 1mm	64
Figura 16 - (A) Média do número de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estádios de desenvolvimento após 7 dias incubadas com as amostras Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL, evidenciando a presença de pupas nos grupos controles; (B) Média do número de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estádios de desenvolvimento após 8 dias incubadas com as amostras Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL, evidenciando a presença de mosquitos nos grupos controles.....	66
Figura 17 (A) Média do número de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estágios de desenvolvimento após 10 dias incubadas com as amostras Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL, evidenciando a presença de mosquitos nos grupos contendo inibidores. (B) Percentual de mortalidade dos indivíduos eclodidos após 10 dias em contato com as soluções com concentrações de 1m/mL de Albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de proteínas solúveis (mg.mL^{-1}) presente no extrato bruto de sementes <i>Leucaena leucocephala</i> obtido por extração com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e detecção das atividades inibitórias de papaína, tripsina e quimotripsina	49
Tabela 2 - Frações obtidas a partir do extrato bruto proteico de <i>Leucaena leucocephala</i> após fracionamento com ácido tricloroacético 20% e monitoramento da atividade inibitória de tripsina em percentual e atividade inibitória específica em UI/ mg de proteína	50
Tabela 3 Atividade inibitória percentual e específica de tripsina e papaína do extrato proteico bruto (EBL), Fração proteica obtida em TCA 3% (F3%) e das frações cromatográficas, pico retido a anidrotripsina (sLITi); pico não retido a anidrotripsina (PNr), obtidas em coluna de afinidade a anidrotripsina, de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i>	54
Tabela 4 Percentual inibitório <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do sLITi sobre a atividade proteolítica do homogenato intestinal das larvas de <i>Aedes aegypti</i> e acetilcolinesterase.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTI	Iodeto de acetilcolina
BSA	Albumina sérica bovina
BANA	N-benzoil-arginina-naftilamida
BApNA	Benzoil Arginina Nitroanilida
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano- sulfonato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
TCA	Ácido tricloroacético
DTT	Ditiotreitol
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
DMAB	ρ -dimetilaminobenzaldeido
TRIS	Tris-hidroxiaminometano
pI	Ponto isoeletrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Insetos vetores de doenças	18
1.2 Dengue	19
1.2.1 Considerações gerais	19
1.2.1 <i>Vetores e o ciclo de vida</i>	22
1.3 Controle dos vetores	27
1.3.1 Inseticidas químicos	27
1.3.2 Bioinseticidas	29
1.4 Proteínas vegetais com potencial inseticida.....	29
1.4.1 Inibidores de proteinases	31
1.4.1.1 <i>inibidores de proteinases serínicas</i>	32
1.5 <i>Leucaena leucocephala</i>	33
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS	37
3.1 Material biológico	37
3.1.1 <i>Sementes de Leucaena leucocephala</i>	37
3.1.2 <i>Insetos e alojamento</i>	37
3.2 Reagentes químicos	37
3.3 Equipamentos.....	38
4. MÉTODOS	39
4.1 Processamento de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i>	39
4.2 Preparo do extrato proteico bruto (EB) de <i>L. leucocephala</i>	39
4.3 Dosagem de proteínas	39
4.4 Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica	40
4.5 Inibição da atividade proteolítica do tipo cisteínica	40
4.6 Inibição da atividade acetilcolinesterásica.....	41

4.7 Obtenção dos inibidores de tripsina semipurificados de <i>L. leucocephala</i>	41
4.7.1 Obtenção de frações proteicas ricas em inibidores de tripsina de <i>L. leucocephala</i>	41
4.7.2 Cromatografia de afinidade a anidrotripsina em coluna de Sepharose 4B	41
4.8 Caracterização bioquímica do inibidor semipurificado	42
4.8.1 Eletroforese dos passos de obtenção	43
4.8.2 Zimogramas reversos	43
4.8.3 Resistência à temperatura	43
4.8.4 Resistência a diferentes pHs	44
4.8.5 Resistência ao agente redutor DTT.....	44
4.8.6 Focalização isoelétrica e eletroforese bidimensional.....	45
4.9 Atividade biológica contra <i>Ae. aegypti</i>	45
4.9.1 Efeito do sLITi sobre o desenvolvimento larval e eclosão	46
4.9.2 Atividade inibitória in vitro do sLITi contra larvas	46
4.9.3 Atividade inibitória in vivo do sLITi contra larvas	47
5. RESULTADOS	48
5.1 Processamento das sementes e obtenção dos inibidores semipurificados de <i>Leucaena leucocephala</i>	48
5.2 Caracterização parcial do sLITi	56
5.2.1 Resistência a agentes físicos	56
5.2.2 Atividades em gel e eletroforese bidimensional.....	56
5.3 Atividades biológicas contra <i>Ae. aegypti</i>	61
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos vetores de doenças

Insetos vetores de doenças são os organismos intermediários no ciclo de vida de patógeno e o responsável pela sua disseminação aos organismos hospedeiros. Esses podem ser apenas um veículo ao patógeno ou podem participar no seu desenvolvimento e/ou reprodução (REY, 2011).

Doenças transmitidas por vetores representam um dos maiores desafios para o bem-estar atual e futuro humano. Vários insetos são responsáveis pelas transmissões da malária, da febre amarela, da encefalite japonesa, bem como de um grupo assim chamado "doenças tropicais negligenciadas", tais como a dengue, a leishmaniose e a doença de chagas (HOTEZ *et al.*, 2007). Todas essas doenças têm sérios impactos sobre muitos países tropicais e subtropicais, onde elas são responsáveis por cerca de 10% das mortes de humanos (WHO, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2011).

Esse tipo de doença também está se tornando uma séria preocupação de saúde para os países mais desenvolvidos (HOTEZ, 2008), devido à migração dos vetores para áreas antes não habitadas, em resposta às mudanças climáticas e ao desmatamento. Assim, mosquitos que antes tinham como hábitat as florestas migraram e adaptaram-se às cidades (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Além disso, o aumento da migração internacional e das trocas comerciais promovem a introdução acidental de vetores e/ou patógenos entre os continentes (ALTIZER *et al.*, 2011).

Dentre os mosquitos, os dos gêneros *Anopheles* sp., *Aedes* sp. e *Culex* sp. são considerados os principais vetores de doenças como a malária, dengue, filariose, febre amarela e encefalites. Em 2008, foram relatados mais de 240 milhões de casos que ocasionaram aproximadamente 900.000 mortes (PAHO, 2012). Assim, com essas doenças do século XVII, a dengue também vem se destacando nos últimos anos como uma epidemia no cenário mundial: 2,5 bilhões de pessoas estão em áreas de risco e são registrados 100 milhões de casos por ano (RACLOZ *et al.*, 2012).

Comparados a outros animais hematófagos, os mosquitos são hematófagos opcionais, pois estes também podem se alimentam do néctar de frutas e de outros fluidos

biológicos Contudo para a ovoposição as fêmeas necessitam realizar o repasto sanguíneo, uma vez que as proteínas do sangue servem de precursoras do vitelo. É durante o processo de repasto que há a transferência de saliva e organismos patógenos ao homem (REITER, 2001).

Já no início do século XX, os programas de saúde se voltaram para o controle populacional dos mosquitos que realizavam a transmissão do patógeno entre os hospedeiros humanos. Entre 1900 e 1950, inúmeros programas alcançaram esse objetivo através da eliminação de focos de reprodução aliado ao uso de inseticidas químicos. Em 1960, doenças transmitidas por vetores não eram mais consideradas um grande problema de saúde pública (GUBLER, 1998a).

Um grande número de estudos empíricos e teóricos sobre doenças humanas transmitidas por vetores tem contribuído para o entendimento da importância ecológica e evolução dos vetores na transmissão da doença, na evolução do patógeno e para desenho de estratégias de controle eficientes. Esses estudos geralmente se concentram em áreas altamente endêmicas, onde as populações dos vetores fundamentais sejam eles mosquitos (*Anopheles*, *Aedes*, ou *Culex*), moscas (*Glossina* e flebotomíneos), ou triatomíneos (*Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*) são alto sustentáveis (RASCALOU *et al.*, 2012). Em áreas como estas o controle do vetor é uma estratégia fundamental para diminuir o impacto dessas doenças em seres humanos, através de produtos químicos ou de controle biológico. No entanto, essas campanhas de combate são inevitavelmente limitadas a sua eficácia local e/ou cobertura espacial (GÜRTLER *et al.*, 2009; VAN DEN BERG, 2011; PEDRINI *et al.*, 2011).

1.2 Dengue

1.2.1 Considerações gerais

Dengue é uma doença flaviviral causada por um dos quatro sorotipos de dengue (DEN 1-4) que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais, sendo seus vetores predominantes os mosquitos do gênero *Aedes*: *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, os que são capazes de carrear qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DEN 1-4) e transmitir a doença através do repasto sanguíneo em seres humanos. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão agora em risco de dengue. A Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO)

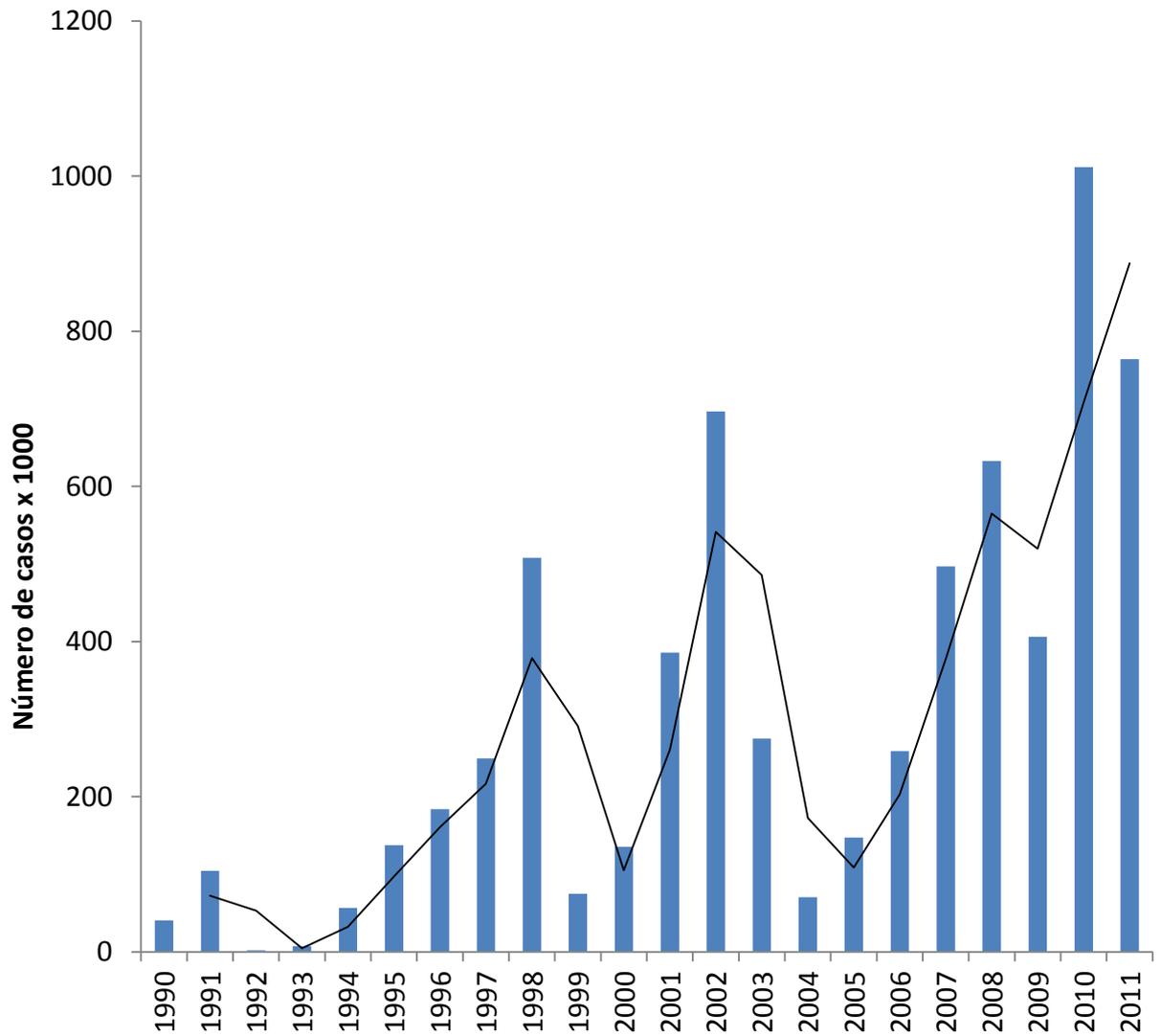
estima que atualmente 50 milhões de indivíduos sejam infectados a cada ano e dependendo do ano, dezenas a centenas de milhares de casos da forma grave e potencialmente fatal da doença, a dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue ocorrem, o que resulta em aproximadamente 24.000 mortes (GUBLER; CLARK, 1994; SHEPARD *et al.*, 2011; WHO, 2012).

A incidência de dengue aumentou dramaticamente nas últimas décadas. Sua proliferação é influenciada por diversos mecanismos - que incluem o crescimento da população com a urbanização não planejada (e conseqüente sobrecarga dos sistemas de água e saneamento), aumento das movimentações nacionais e internacionais, o transporte de mercadorias, tais como pneus, e recursos financeiros limitados para implementação de medidas eficazes de controle (ERLANGER *et al.*, 2008).

A doença se tornou endêmica em mais de cem países na África, nas Américas, no Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e do Pacífico Ocidental. Destes, Sudeste da Ásia e do Pacífico ocidental são os mais gravemente afetados. Não existe atualmente vacina para dengue, assim como não há medicamentos para o tratamento direto da dengue hemorrágica e da síndrome de choque da dengue, de modo que a única forma de controlar ou impedir a propagação do vírus é combater mosquitos vetores diretamente (AL-MUHANDIS; HUNTER, 2011).

Assim como no cenário mundial, a tendência de aumento do número de casos ano após ano se repete também no Brasil: desde a década de 1990 vêm ocorrendo epidemias (FIGURA 1). Durante o ano de 2010, que apresentou o maior número de casos até então, foram relatadas mais de 1 milhão de ocorrências; destas, 656 chegaram a óbito devido a complicações no quadro da doença (SES/SINAN, 2012).

Figura 1 - Número de casos de dengue no Brasil, nos anos de 1990-2011



Fonte: Adaptado de Secretarias Estaduais de Saúde (SES) e Sistemas de Informações de Agravos de Notificações (SINAN) (2012).

1.2.1 Vetores e o ciclo de vida

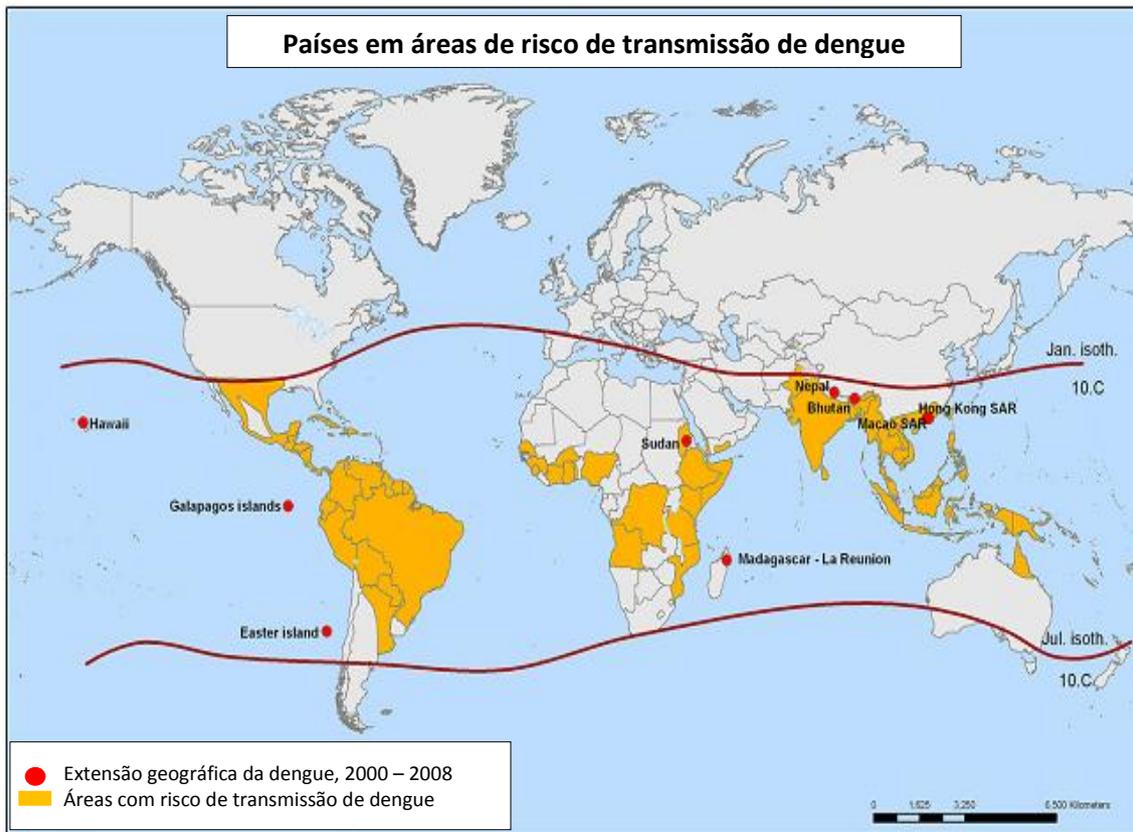
Os vetores da dengue são fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera:Culicidae), sendo apontados *Ae. aegypti*, e *Ae. albopictus*. O principal vetor é o mosquito *Ae. aegypti*, apesar de, em algumas regiões asiáticas, o *Ae. albopictus* apresentar uma importância secundária.

O mosquito *Ae. aegypti* é adaptado ao ambiente urbano e utiliza os recipientes mais frequentes no domicílio ou peridomicílio – tanques de armazenamento de água e vasilhames temporários, dentro e fora das casas, como potes, barris, pneumáticos usados, latas, garrafas e vasos de plantas – para o desenvolvimento de sua fase larvária. Já o *Ae. albopictus* prefere o hábitat natural da floresta, como buracos em árvores, axilas de folhas, e cascas de coco. Cria-se, mais frequentemente, fora das casas, em jardins; e com menor frequência dentro delas, em vasilhames artificiais (BRAGA; VALE, 2007).

Provavelmente, esse vetor foi introduzido nas Américas a bordo de barcos vindos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao Novo Mundo (BISSET, 2002). Atualmente, ele é encontrado em uma larga faixa do continente americano, que se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América (EUA), com a ocorrência de surtos importantes de dengue em vários países, como Venezuela, Cuba, Brasil e, recentemente, Paraguai (FIGURA 2). No Brasil, o *Ae. aegypti* está presente nos 26 Estados e no Distrito Federal (FIGURA 3).

O mosquito *Ae. aegypti* é um inseto holometábolo, o que significa que ele passa por uma metamorfose completa: ovo, larva, pupa e fase adulta. A duração da vida adulta pode variar de duas semanas a um mês, dependendo das condições ambientais (MARICOPA, 2006) (FIGURA 4).

Figura 2 - Países em áreas de risco de transmissão da dengue em 2008



adaptado de World Health Organization, International Travel And Health 2009.

Figura 3- Distribuição do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil em 2006

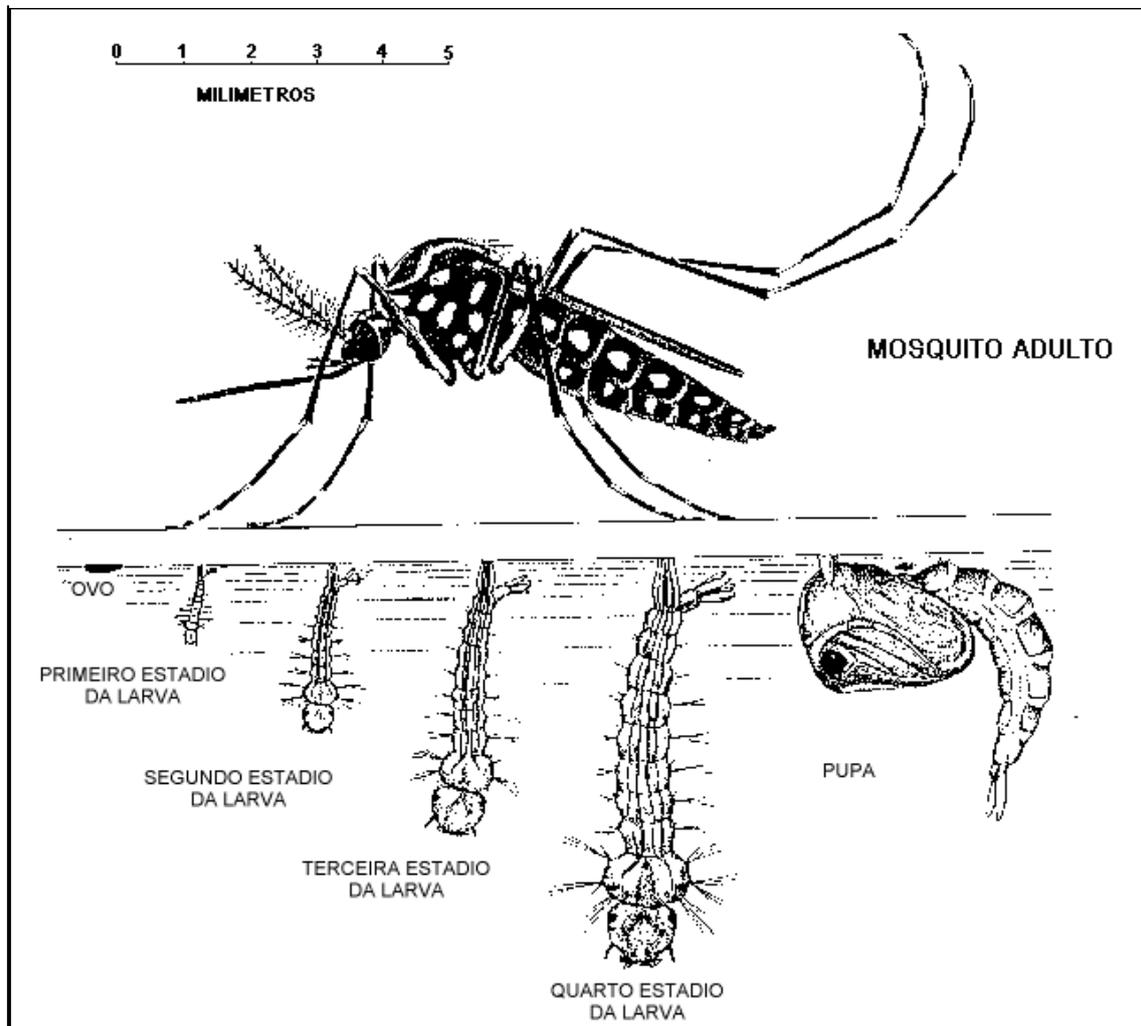


Após o repasto sanguíneo, as fêmeas produzem em média 100-200 ovos/repasto. No entanto, o número de ovos produzidos está diretamente ligado à quantidade de sangue ingerida. As fêmeas podem ovopositar até cinco vezes durante a vida. Os ovos são colocados em superfícies úmidas em zonas susceptíveis de inundação temporária, como buracos de árvores e/ou recipientes feitos pelo homem. A ovoposição pode ser distribuída ao longo de horas ou dias, dependendo da disponibilidade de substratos apropriados. Na maioria das vezes, os ovos são colocados em diferentes distâncias acima da linha de água em dois ou mais locais (CLEMENTS, 1999; FOSTER; WALKER, 2002).

As larvas são providas de grande mobilidade e não selecionam alimentos, podendo filtrar até dois litros de água por dia (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As larvas passam por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), e a duração do desenvolvimento larval depende da temperatura, da disponibilidade de nutrientes e da densidade de larvas. Sob condições ótimas, o tempo necessário para completar o ciclo pode ser de somente 7 dias, incluindo os dois dias da fase de pupa.

Mesmo quando outros hospedeiros, tais como cães, suínos, bovinos, roedores, e aves estão disponíveis, as fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam preferencialmente de sangue humano (HARRINGTON *et al.*, 2001). Devido a inquietude do hospedeiro humano durante a alimentação sanguínea, as fêmeas acabam picando um considerável número de indivíduos para conseguir completar o repasto (GUBLER, 1998b).

Uma vez com o vírus da dengue (que pode ser adquirido através da picada de uma pessoa infectada), a fêmea torna-se vetor permanente da doença. As fêmeas infectadas podem transmitir o vírus a sua prole através de contaminação transovariana. A importância epidemiológica para isso ainda não foi esclarecida, embora se saiba que o vírus persiste em número suficiente para manter as gerações seguintes de mosquitos infectados (JOSHI; SHARMA, 2001).

Figura 4 - Ciclo de vida de dípteros do gênero *Aedes*

Fonte: Unicamp (2010).

1.3 Controle dos vetores

1.3.1 Inseticidas químicos

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001).

Os compostos orgânicos utilizados pertencem, principalmente, aos grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos ou piretróides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores.

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos; ciclodienos; e policloroterpenos. Esses são os mais antigos pesticidas químicos utilizados. Dentre esses encontra-se o DDT, o inseticida mais notório do século passado. Esse inseticida atua sobre os canais de sódio, destruindo o balanço entre os íons sódio e potássio dos axônios impedindo a propagação dos impulsos nervosos em insetos e mamíferos (BRAGA; VALLE, 2007).

Embora esses tenham sido largamente adotados pelos programas de controle de malária, tiveram seu uso descontinuado e chegaram, inclusive, a ser proibidos em vários países devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e de humanos. Devido a esses fatores esses foram substituídos pelos organofosforados (WALISZEWSKI *et al.*, 2003).

O termo organofosforado atualmente usado inclui todos os inseticidas que contêm fósforo. Nesse grupo, os inseticidas podem ser classificados em três subgrupos: os alifáticos (malation, vapon e vidrin), os derivados de fenil (fenitrothion,) e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil). São amplamente utilizados em Saúde Pública por apresentarem muitas vantagens sobre os organoclorados, como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. Apresentam, porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para os

vertebrados que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas (WARE; WHITACRE, 2004).

Os organofosforados têm como mecanismo de ação a fosforilação da acetilcolinesterase, enzima responsável pela quebra do neurotransmissor acetilcolina, inativando-a de forma irreversível. Assim, impedem a interrupção do impulso elétrico, causando paralisia seguida de morte. Temephos é um organofosforado, que foi registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos, é o único larvicida desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos, recomendado pela OMS para uso em água potável (CHAVASSE YAP, 1997).

Contudo, populações resistentes aos organofosforados também foram detectadas, levando à substituição por novos inseticidas, agora da classe dos piretroides. Os piretroides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são produzidos em laboratório, a partir de uma substância natural, o piretro, extraído de crisântemos. São biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, embora possam causar irritação das mucosas nesses animais. Para os animais aquáticos, entretanto, são extremamente tóxicos. Possuem ainda como vantagens, o fato de serem muito ativos (necessidade de pequenas doses) e repelentes. Sua única desvantagem consiste no custo elevado. Esses apresentam modo de ação similar ao do DDT. Atuam, aparentemente, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios, afetando o sistema nervoso periférico e central do inseto, fazendo com que as células nervosas produzam descargas repetitivas e, eventualmente, causando paralisia (BRAGA; VALLE, 2007).

Por causa do aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos, a pesquisa sobre os inseticidas naturais e biodegradáveis tem aumentado, com o objetivo de minimizar o impacto ao ambiente, encontrar novos compostos que promovam a mortalidade das larvas e previnam surgimento de linhagens resistentes devido à rotação de compostos. Alguns extratos de plantas podem ser considerados fitoinseticidas e podem servir como alternativas para realizar o controle dos mosquitos (PONTUAL *et al.*, 2012).

Uma das vantagens do uso de extratos vegetais é esses possuírem diferentes princípios ativos (metabólitos secundários, inibidores de tripsina, lectinas e etc) e poderem impedir o desenvolvimento de larvas por atuar em vários pontos do metabolismo dessas (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2004).

1.3.2 Bioinseticidas

Os inseticidas botânicos foram muito populares e importantes entre as décadas de 30 e 40 e o Brasil foi grande produtor e exportador destes produtos, substâncias como rotenona e nicotina, que apresentavam maior segurança no uso agrícola e menor impacto ambiental (MENEZES, 2005).

Apesar de possuir ação e degradação rápidas, toxicidade baixa a moderada para mamíferos, maior seletividade e baixa fitotoxicidade, os inseticidas botânicos apresentam algumas desvantagens tais como necessidade de utilização de composto sinergista, baixa persistência, escassez do recurso natural, necessidade de padronização química e controle de qualidade, dificuldade de registro e custo. Além disso, a falta de dados relacionados à persistência e às dificuldades relacionadas ao isolamento de princípios ativos e à concentração em diferentes partes vegetais, também são algumas barreiras a serem rompidas e mais estudos nesta área são necessários (ISMAN, 2000). Com isso, os inseticidas naturais vêm sendo gradativamente substituídos pelos sintéticos, pois estes não apresentam os problemas citados anteriormente e não possuem variações na eficiência de combate (COSTA *et al.*, 2004).

Inseticidas botânicos são compostos resultantes do metabolismo primário ou secundário das plantas (KIM *et al.*, 2003). Esses podem apresentar mecanismos de ação diversos para causar a morte dos insetos. Eles podem atuar sobre o sistema nervoso central, dificultando o crescimento e o desenvolvimento, interferindo no metabolismo celular (CORRÊA; SALGADO, 2011).

Dentre as moléculas do metabolismo primário de plantas, as proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa são potenciais inseticidas. Dentre essas proteínas estão as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) e os inibidores de enzimas proteolíticas ou glucosidases (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002).

1.4 Proteínas vegetais com potencial inseticida

Plantas e insetos são seres vivos que estão continuamente interagindo de uma maneira complexa. As plantas, uma vez ssesis, desenvolveram diferentes maquinarias metabólicas ou físicas para reduzir o ataque de insetos, incluindo respostas específicas que podem alterar os padrões químicos e físicos das plantas (SMITH; BOYKO., 2006).

As substâncias melhor estudadas que estão envolvidas na defesa a insetos fitófagos são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), lectinas, inibidores de α -amilase e inibidores de protease. Essas substâncias são, particularmente, abundantes em órgãos de reserva tais como tubérculos e sementes (JABER *et al.*, 2010). Essas proteínas possuem diferentes mecanismos de ação sobre os seres fitófagos, podendo atuar dificultando a absorção de nutrientes ou clivagem de proteínas, bem como interferir na síntese de proteínas do predador.

As lectinas são uma classe de proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico que especificamente se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As lectinas possuem diferentes funções, podendo atuar como moléculas de reconhecimento do sistema imune, proteínas de reserva e proteínas de adesão da superfície celular. Além disso, também têm sido implicadas nos mecanismos de defesa contra os agentes patogênicos invasores e predadores. Esta função pode ser um importante papel no âmbito das sementes e de outros tecidos periféricos das plantas (RUDIGER; GABIUS, 2001; TRIGUEROS *et al.*, 2003).

Há vários relatos para a toxicidade de lectinas a diferentes ordens de insetos, incluindo Coleoptera e Lepidoptera (CZAPLA; LANG, 1990) e Homoptera (SAUVION *et al.*, 1996). Os efeitos prejudiciais de lectinas nos parâmetros biológicos de insetos incluem perda de peso larval, mortalidade, inibição da alimentação, atraso no desenvolvimento e redução na fecundidade das primeira e segunda gerações. Há estudos recentes da toxicidade de lectinas a pestes de insetos com importância econômica como o afídeo da ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) (SAUVION *et al.*, 2004), larva da beterraba (*Spodoptera exigua*), (SHAHIDI-NOGHABI *et al.*, 2009) e contra o mosquito vetor da dengue (*Aedes aegypti*) (SANTOS *et al.*, 2012).

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) constituem um grupo de proteínas que são capazes de inativar os ribossomos. Essas proteínas desempenham um papel importante na defesa vegetal, pois, uma vez inativados os ribossomos, a síntese de proteínas

é comprometida e, conseqüentemente, há um desbalanço bioquímico no predador que pode ocasionar sua morte ou afetar seu desenvolvimento. Ricina e abrina constituem exemplos de proteínas que inativam irreversivelmente ribossomos, que possuem efeito tóxico contra uma variedade de insetos, embora esses efeitos sejam variáveis em diferentes ordens de insetos (JABER *et al.*, 2010).

Os inibidores de alfa-amilase são conhecidos como bloqueadores de amido pois impedem a quebra desse em moléculas de maltose, amilopectina e glucose, que podem ser absorvidas pelo organismo. Esses inibidores podem ser extraídos de várias famílias de plantas, em especial, a família Fabaceae.

Insetos pertencentes à subfamília dos bruquídeos (Coleoptera: Bruchidae), como o *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, durante o seu desenvolvimento larval têm como alimentação majoritária o amido. Dado isso já há relatos do uso da biotecnologia para a transformação de plantas, de modo que elas expressem esses inibidores que possuem um efeito inseticida, tais como a ervilha (*Pisum sativum* L.) e feijão azuki (*Vigna angularis* L.) (KLUH *et al.*, 2005).

1.4.1 Inibidores de proteinases

Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos capazes de interagir com enzimas proteolíticas e inibir suas atividades catalíticas (LINGARAJU; GOWDA, 2008). Essas moléculas são encontradas em todas as formas de vida, no entanto, os inibidores de protease de origem vegetal, principalmente os encontrados em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva das famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae são os mais estudados (MACEDO *et al.*, 2009).

Estudos apontam que essas moléculas possuem variadas funções, podendo atuar como reguladores de proteases endógenas, proteínas de reserva e como agentes na defesa vegetal a microrganismos, insetos e outros animais herbívoros. Essas moléculas são classificadas de acordo com as classes enzimáticas, podendo ser, inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas ou inibidores de metaloproteases (MACEDO *et al.*, 2007).

Os inibidores têm sido tradicionalmente agrupados em famílias conhecidas como Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, Abóbora, Cevada, Cistatinas, Thaumatin-like e Ragi A1. Dentre as famílias de inibidores de proteases serínicas, as famílias Kunitz e Bowman-Birk, são as mais estudadas e melhor caracterizadas (OLIVA *et al.*, 2010).

1.4.1.1 Inibidores de proteinases serínicas

Inibidores de proteases serínicas são amplamente distribuídos no reino vegetal e já foram descritos em muitas espécies de plantas, principalmente os pertencentes às famílias Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Salicaceae, Leguminosae e Solanaceae. O papel fisiológico desses inibidores, nas plantas, inclui a regulação das proteinases endógenas durante a dormência das sementes, imobilização das proteínas de reserva (como forma de preservar os tecidos), proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos e proteínas de reserva (HAQ *et al.*, 2004).

As famílias do tipo Kunitz e Bowman-Birk constituem as famílias de inibidores de proteases serínicas mais estudadas. Parte disso, deve-se aos inibidores presentes na soja (*Glycine max*), o SbTI (*Soy bean trypsin inhibitor*) e BBI (*Bowman-Birk inhibitor*). Inibidores do tipo Kunitz, em geral, possuem massa molecular entre 18 a 22 kDa e apresentam estrutura primária constituída por 181 resíduos de aminoácidos, um único sítio reativo que se liga à tripsina, uma ou duas cadeias polipeptídicas. Esses inibidores usualmente contêm quatro resíduos de cisteína (cys39 – cys86 e cys136 – cys145) em duas pontes dissulfeto que, uma vez rompidas, acarretam a perda da atividade biológica desse inibidor (OLIVA *et al.*, 2010).

Os inibidores do tipo Bowman-Birk apresentam baixa massa molecular, variando de 8 a 10 kDa, um alto conteúdo de cistina e dois sítios reativos por molécula, cada um com especificidade para uma faixa de proteases serínicas: tripsina, quimiotripsina e elastase. Essas moléculas podem apresentar atividade inibitória de forma simultaneamente e/ou independentemente das proteases serínicas devido à presença de mais de um sítio reativo (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002).

Ao se tratar de defesa vegetal, os inibidores de protease são considerados moléculas inseticidas. Os mecanismos de ação desses inibidores são variáveis entre as diferentes classes de insetos. Essas moléculas podem se ligar às enzimas proteolíticas dos insetos e impedir a digestão de proteínas promovendo, assim, um déficit nos aminoácidos essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos insetos. Algumas classes de insetos, para compensar o efeito dos inibidores, aumentam a produção de proteases como forma de obter os aminoácidos, porém essa estratégia pode levar à limitação na biodisponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese de proteína, reduzindo o crescimento e desenvolvimento, podendo levar à morte (ANDERSON *et al.*, 2012).

1.5 *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala (Lam.) R. de Witt é uma leguminosa exótica, comum na vegetação brasileira (FIGURA 5), originária da América Central, encontrando-se amplamente distribuída no Brasil, onde seu cultivo se expandiu nas últimas décadas, indo desde os ecossistemas semi-áridos aos úmidos. Resultados de avaliações nessas diferentes áreas mostram sua capacidade de adaptação, através de elevados rendimentos e valor nutritivo, sendo uma fonte promissora de alimentação para não-ruminantes nas regiões tropicais (PRATES *et al.*, 2000).

As folhas da leucena são bipinadas de 15 a 20 cm de comprimento, ráquis pubescente, 4 a 8 pares de pinas de 5 a 10 cm de comprimento, com 10 - 15 pares de folíolos oblongos-lineares. As vagens são finas, achatadas, acuminadas com 15-20 sementes, marron brilhante. A inflorescência é globosa, de 2,5 a 3,0 cm de diâmetro, solitária, formada de 100 a 180 flores brancas e minúsculas (REIS, 2001). A leucena é uma leguminosa de crescimento rápido, atingindo até três metros de altura no primeiro ano. Seu sistema radicular é profundo, onde ocorre a simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, as quais fixam até 400 kg/ha/ano de nitrogênio o que permite a sua utilização na adubação verde.

Assim como a maioria das leguminosas, as sementes de leucena possuem alto teor proteico e frequentemente apresentam inibidores de proteases. Souza-Pinto e colaboradores (1996) descreveram a purificação de um inibidor de tripsina do extrato de sementes de *L. leucocephala*, sendo obtido um inibidor de tripsina do tipo Kunitz dimérico com duas cadeias

polipeptídicas de 15 e 5 KDa. Em 2000, Oliva e colaboradores elucidaram a estrutura primária desse inibidor, assim como sua atividade anti-inflamatória.

Os inibidores proteicos de leucena, também apresentaram atividade contra insetos da ordem Lepdoptera. Bhavani *et al.* (2007) descreveram a presença de dois inibidores de proteases serínicas com massas moleculares distintas e avaliaram os efeitos deletérios provocados por esses no desenvolvimento larval de *Helicoperva armigera*, onde esses inibidores foram capazes de retardar o desenvolvimento das larvas e também causaram mortalidade.

Tendo em vista o potencial inseticida dos inibidores de proteases presentes nas sementes de *Leucaena leucocephala*, é válido investigar a presença de novos inibidores e se esses apresentam potencial inseticida semelhante.

Figura 5 - Porte arbustivo (A); Flor plumosa (B); Fruto (C) e Sementes (D) de *Leucaena leucocephala*.



Fonte: <http://b-and-t-world-seeds.com/images/94.jpg>

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou obter uma fração concentrada do inibidor de tripsina das sementes de *Leucaena leucocephala* e avaliar seu efeito sobre estágios imaturos do vetor da dengue *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Obter uma fração concentrada do inibidor de tripsina de sementes de *Leucaena leucocephala*;
- Realizar a caracterização bioquímica do inibidor presente na fração semipurificada;
- Avaliar a atividade deste inibidor sobre o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*;
- Avaliar a capacidade inibitória deste inibidor *in vivo* sobre as enzimas de larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*;

3. MATERIAIS

3.1 Material biológico

3.1.1 Sementes de *Leucaena leucocephala*

Sementes de *L. leucocephala* foram obtidas no Campus Universitário da Universidade Federal do Ceará localizado no Pici (Fortaleza, Ceará, Brasil).

3.1.2 Insetos e alojamento

As larvas em 3º estágio de *Ae. aegypti* foram obtidas da colônia de mosquitos mantida no Insetário de Culicídeos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec). As larvas, anteriormente aos bioensaios, foram mantidas em bandejas de plástico (30 cm x 45 cm) contendo água decolorinada, sendo alimentadas diariamente com ração para tartaruga (Reptolife, Alcon®, Camboriú, Brasil), sob condições ótimas para desenvolvimento, com umidade 70 - 80%, temperatura 27 – 30 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro. Os insetos remanescentes dos experimentos foram sacrificados por fervura em água por 15 min.

3.2 Reagentes químicos

Albumina sérica bovina (BSA), tripsina (E.C. 3.4.21.4), quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) e papaína (E.C. 3.4.22.2) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU). Marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (GE®, USA). Matriz cromatográfica Sepharose 4B-CNBr foi adquirida na Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU).

Os substratos sintéticos BApNA (N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) e BANA (N α -benzoil-DL-arginina-p-naftilamida) e o substrato proteico Azocaseína foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU).

3.3 Equipamentos

- Agitador magnético Goldfish (Ika, Wilmington, EUA)
- Balança analítica Bioprecisa FA2104N (Shanghai Toposun Industries Co., Zhejiang, China)
- Banho-Maria Dubnoff 304-D (Nova ética, Vargem Grande Paulista, Brasil)
- Centrífuga Rotina 380R (HettichLab, Tuttlingen, Alemanha)
- Espectrofotômetro Thermo Spectronic Genesis 10W (Virginia, EUA)
- Estufa de cultura 002CB (Fanem, Brasil)
- Focalizador Isoelétrico Ettan IPGphor 3 (GE lifesciences, Connecticut, EUA)
- Liofilizadpr Edwards L4KR (Edwards B.O.C. do Brasil, São Paulo, Brasil)
- Scanner de bancada HP Scanjet 2400 (Hewlett-Packard, USA)
- Sistema de eletroforese miniVE (GE lifesciences, Connecticut, EUA)

4. MÉTODOS

4.1 Processamento de sementes de *Leucaena leucocephala*

Após a coleta as sementes foram processadas em moinho de café e peneiradas em malha de 500 μm . Em seguida, a farinha foi submetida à extração com n-hexano na proporção de 1:3 (p/v), sendo realizadas 3 trocas ao total, a fim de se remover os lipídeos presentes. A farinha delipidada foi então estocada em recipiente plástico opaco à temperatura ambiente.

4.2 Preparo do extrato proteico bruto (EB) de *L. leucocephala*

A farinha delipidada de *L. leucocephala* foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5, na proporção 1:10 (p/v), sob agitação constante à temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente a suspensão foi filtrada em malha de nylon, seguida de centrifugação a 15.000 x g, por 15 min. a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi denominado de Extrato Proteico Bruto (EB) de *L. leucocephala*, o qual foi utilizado para os passos posteriores de purificação.

4.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A partir de 100 μL da amostra em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram levemente agitadas e após 5 min foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência padrão na curva de calibração.

4.4 Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica

Para determinação da atividade inibitória da tripsina, foi empregado o ensaio proposto por Erlanger (1961), com algumas modificações. Nesse ensaio, o substrato sintético BApNA (N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) é utilizado por ser específico para clivagem por tripsina. Assim, 5 μ L de uma solução de tripsina (0,3 μ g/ μ L em HCl 1 mM) foram pré-incubados com 345 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM com CaCl₂ 20 mM, pH 7,5 e com 50 μ L da solução teste. Decorridos 10 min, foram adicionados 250 μ L de uma solução de BApNA 1,25 mM para iniciar a reação, a mistura foi, então, novamente incubada por 15 min. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 60 μ L de ácido acético a 30% e a leitura da absorbância das amostras realizada em leitor de microplacas, utilizando o comprimento de onda de 410 nm.

4.5 Inibição da atividade proteolítica do tipo cisteínica

Para determinação da atividade inibitória do tipo cisteínica (anti-papainásica) do sLITi, 20 μ L da solução de papaína (0,2 mg/mL fosfato de sódio monobásico 25 mM pH 6,0) foi pré-incubada com 30 μ g de sLITi e com 40 μ L de tampão fosfato de sódio monobásico 25 mM, pH 6,0, contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM e o volume final foi ajustado para 500 μ L com o mesmo tampão acima e incubado por 10 min a 37 °C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 200 μ l de BANA (1,0 mM em fosfato de sódio monobásico 25 mM, pH 6,0). A reação processou-se por mais 20 min nas mesmas condições de incubação. A reação foi interrompida com a adição de 500 μ L de solução HCl 2 % em etanol e foi adicionado 500 μ L de p-dimetilaminocianomaldeído 0,06% em etanol em cada tubo, os quais permaneceram em repouso por 40 min. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas. A absorbância foi medida a 540 nm (ABE *et al.*, 1992).

4.6 Determinação da atividade anti-acetilcolinesterásica

A atividade acetilcolinesterásica foi mensurada utilizando um leitor de placas de 96 poços e baseou-se no método de Ellman, o mesmo utilizado por Rhee *et al* em 2001. Em placas de 96 poços foram adicionados 25 µL de solução aquosa de ACTI 15 mM, 125 µL de solução de DTNB em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1% de BSA, 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e 25 µL de solução aquosa de sLITi, contendo 0,07; 0,15; 0,3; 0,6 mg/mL. A absorbância foi mensurada a 405 nm a cada 30 seg por 5 vezes. Após essas leituras foram adicionados 25 µL de solução enzimática (contendo 0,22 U/mL de acetilcolinesterase) e foram realizadas 8 leituras da absorbância a 405 nm a cada 30 seg.

A taxa de degradação espontânea da acetilcolina foi calculada, para correção. O percentual de inibição foi calculado pela comparação das taxas de degradação do branco e taxa de degradação na presença do sLITi.

4.7 Obtenção dos inibidores de tripsina semipurificados de *L. leucocephala*

4.7.1 Obtenção de frações proteicas ricas em inibidores de tripsina de *L. leucocephala*

Como maneira de reduzir a diversidade de proteínas presentes no EB antes de iniciar os passos cromatográficos, este foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em diferentes concentrações. Esse processo foi realizado pela lenta adição de TCA 20% sob agitação constante em banho de gelo, seguido de repouso por 20 min e centrifugação a 15.000 x g, por 10 min, à temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos, dialisados em membrana de 8 kDa contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e, então, avaliados quanto à capacidade inibitória de tripsina, assim como o teor de proteínas solúveis presentes. A fração proteica com maior atividade inibitória específica de tripsina foi selecionada para os passos posteriores.

4.7.2 Cromatografia de afinidade a anidrotripsina em coluna de Sepharose 4B

4.7.2.1 Preparo de anidrotripsina

A anidrotripsina foi preparada segundo AKO *et al.* (1972). A 1 litro de solução de tripsina bovina com concentração de 1 g/L em tampão Tris-HCl 75 mM contendo CaCl₂ 3 mM, pH 7,2, foi adicionado 1 litro de solução aquosa contendo 250 mg de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 100 mL de isopropanol. A mistura que agora contem PMSF-Tripsina foi dialisada contra água destilada utilizando membranas de 12 kDa, após 72 horas, o dialisado liofilizado. Para a conversão do PMSF-Tripsina em anidrotripsina, o liofilizado foi tratado com uma solução de hidróxido de potássio 50 mM por 12 min, à temperatura de 4 °C; a reação do KOH com o PMSF-Tripsina foi encerrada com a neutralização do pH (pH 7,0). A mistura que agora contem anidrotripsina foi dialisada contra água destilada conforme descrito anteriormente e liofilizada.

4.7.2.2 Obtenção do inibidor semipurificado por cromatografia de afinidade a anidrotripsina

Para a cromatografia de afinidade à tripsina, foram acoplados aproximadamente 70 mg de anidrotripsina bovina a 2,5 g de matriz Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo instruções do fabricante. Após a preparação da matriz, o gel de aproximadamente 11 mL foi transferido para uma coluna cromatográfica de vidro (15,2 x 2,4 cm). A F3% (fração proteica obtida após precipitação com TCA) previamente solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, foi aplicada (5 mg de proteína por cromatografia) na coluna equilibrada com o mesmo tampão na coluna. Para a eluição do material retido, foi aplicada na coluna uma solução de HCl 50 mM, usando o fluxo constante de 0,5 mL/min e coletando-se 1,5 mL de material adsorvido em cada tubo. O perfil cromatográfico das proteínas foi acompanhado pela absorbância a 280 nm e as proteínas retidas à matriz de afinidade, foram denominadas sLITi (inibidores de tripsina semipurificados de sementes de *L. leucocephala*). Estas proteínas foram dialisadas contra água destilada durante 24 h, sendo realizadas duas trocas, liofilizado e acumulado para posterior caracterização.

4.8 Caracterização bioquímica do inibidor semipurificado

4.8.1 Eletroforese

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foram conduzidos de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas. As proteínas do extrato proteico bruto, fração obtida por precipitação com TCA, pico não adsorvido à matriz de afinidade a anidrotripsina e o sLITi foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1 % e azul de bromofenol (para a marcação da frente de corrida eletroforética, a 0,02 %). O sLITi foi também reduzido com o auxílio de β - mercaptoetanol para verificar a presença de subunidades proteicas. Em todas as corridas eletroforéticas foram utilizados géis de aplicação contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1% e os géis de separação contendo 15% de poliacrilamida em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1 %.

4.8.2 Zimogramas reversos

A visualização do perfil de inibição do sLITi foi realizada conforme Prasad e col. (2010), com algumas modificações. Inicialmente foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida 15% contendo 0,1% de gelatina sob condições não redutoras usando 50 μ g de sLITi. Logo após a corrida eletroforética, os géis foram retirados e incubados com Triton X-100 2,5% por 20 min, a 37 °C, sendo realizadas duas lavagens intercaladas com lavagens utilizando água destilada. Após as lavagens com Triton, os géis foram incubados com o homogenato intestinal de larvas de *Ae. aegypti* (diluído em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com CaCl₂ 20 mM) e tripsina (0,06 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com CaCl₂ 20 mM) por 6 h, a 37 °C. Em seguida, os géis foram corados com uma solução contendo Comassie Brilliant Blue R-250 em MeOH/AcOH/H₂O (4:1:5, v/v/v) por 4 h. Posteriormente, o excesso de corante foi removido do gel com solução de MeOH/AcOH/H₂O (4:1:5, v/v/v), sendo as bandas visualizadas após descoloração, os inibidores resistentes a digestão pelas enzimas.

4.8.3 Resistência à temperatura

A estabilidade térmica do sLITi foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Gomes e col. (2005). Alíquotas de 500 µL foram incubadas em banho-maria por 30 min. nas seguintes temperaturas: 37 (controle), 40, 60, 70, 90 e 100 °C. Após resfriamento das amostras à temperatura ambiente, procedeu-se o ensaio de inibição de tripsina conforme descrito anteriormente no item 4.4. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.4 Resistência a diferentes pHs

Assim como descrito no item 4.4, a presença de atividade inibitória da tripsina em uma ampla faixa de pH também foi mensurada. O substrato específico BApNA foi utilizado neste ensaio. Para tal, as soluções-tampão utilizadas para cada pH foram: glicina 50 mM (pH 2,5 e 10,0); acetato de sódio 50 mM (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio (PBS) 50 mM (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl 50 mM (pH 8,0 e 9,0).

Neste ensaio, 20 µL de solução de tripsina (tipo III) 1% (0,1mg/mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH7,5) foram adicionados a volumes crescentes da amostra com a quantidade máxima de 30 µg de proteínas (1; 5; 10; 50; 100 e 200 µL). O respectivo tampão de diluição completou o volume final de 500 µL e a solução foi incubada a 37 °C por 30 min. Seguidamente, 200 µL de BApNA 1,25 mM foram adicionados e esta solução foi incubada a 37°C por mais 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 150 µL de ácido acético a 30%. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.5 Resistência ao agente redutor DTT

Para avaliar a estabilidade do sLITi na presença de agente redutor, seguiu-se a metodologia descrita por Cruz (2008), onde alíquotas de inibidor foram incubadas a 37 °C com soluções de DTT de concentrações finais de 1, 10 e 100 mM por 15, 30, 60 e 120 min. Ao final do tempo de incubação, foi adicionada iodoacetamida na quantidade de duas vezes a concentração final de DTT, a fim de prevenir a reoxidação dos grupos sulfidril. Após o período de incubação, a mistura de reação foi submetida ao ensaio de atividade inibitória de

tripsina como descrito no item 4.4. O ensaio foi acompanhado por controle sem DTT. O ensaio foi realizado em triplicata

4.8.6 Eletroforese bidimensional

O sLITi foi resolubilizado em solução de 9 M de ureia/tioureia e a concentração de proteínas solúveis foi calculada. Após ajuste de concentrações de proteína para 35 µg, foram adicionados à solução 1% de DTT, 1% de CHAPS e 0,5% de IPG buffer (3-10) e traços de azul de bromofenol. A solução obtida foi então utilizada para reidratação de tiras de pH 3-10 linear imobilizado (*Immobiline strips* GE) overnight, sendo aplicadas 200 µL de solução de reidratação por cada tira. As tiras foram cobertas com óleo mineral a fim de se evitar a evaporação dos reagentes. Após 16 h, as tiras foram submetidas à focalização isoeletrica em focalizador Ettan IPGphor (GE Lifesciences, São Paulo, Brasil) a 20 °C, sendo aplicados 8.000 Vh, 50 µA por tira, em 4 passos: *step* 30min. a 300 V; *step* 30 min. a 500 V; gradiente 500 – 1000 V em 60 min.; gradiente de 1000 – 5000 V em 90 min.; *step* 5000 V/h até concluir os 9.000V/h desejados. As tiras contendo as proteínas focalizadas foram reduzidas com 1% de DTT em solução de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 29,3% de glicerol v/v, 2% de SDS p/v, traços de bromofenol) por 15 min sob agitação suave. Após esse período, a solução foi descartada e, em seguida, foi adicionada uma solução contendo 2,5% de iodoacetamida em tampão de equilíbrio. As tiras foram, então, lavadas rapidamente em tampão de corrida concentrado 10 vezes e colocadas cuidadosamente sobre os géis de poliacrilamida 15% em sistema de eletroforese miniVE (GE Lifesciences, São Paulo, Brasil). O espaço foi selado com solução de agarose fundida (tampão de corrida, agarose 0,5%, traços de azul de bromofenol). A amperagem inicial foi de 10 mA por gel, aumentando-se para 20 mA por gel após 30 min. de corrida. Após corrida os géis foram corados com Coomassie coloidal.

4.9 Atividade biológica contra *Ae. aegypti*

4.9.1 Efeito do sLITi sobre a eclosão e desenvolvimento larval

Para avaliar o efeito do sLITi sobre a eclosão cerca de 10 ovos de *Ae. aegypti* foram inseridos em tubos de ensaio de 10 mL contendo solução a uma concentração de 1.000 µg/mL em água destilada. Foram utilizados como controles o inibidor Bowman-Birk da soja (BBI), albumina sérica bovina (BSA) e água destilada, sendo os dois primeiros na mesma concentração do sLITi. Foram realizadas 10 repetições para os grupos sLITi, BSA e água e para o BBI foram realizadas 3 repetições. Às soluções foi acrescentado 1% de etanol a fim de evitar crescimento microbiano. Foi realizada a contagem diferencial das larvas diariamente e, a cada 3 dias, as larvas foram alocadas em novas soluções de mesmas concentrações e adição de 5 mg de ração pulverizada aos tubos. Ao fim de 2 dias, foi contabilizada a eclosão e ao fim de 10 dias as taxas de mortalidade e desenvolvimento larval dos grupos.

4.9.2 Atividade inibitória in vitro do sLITi contra larvas

A atividade inibitória sobre enzimas digestivas de larvas de *Ae. aegypti* foi realizada utilizando-se o homogenato do intestino de larvas de 4º estágio como fonte de enzima. Cerca de 200 larvas foram dissecadas em banho de gelo, sendo retirado o sistema digestório e rapidamente transferido para microtubos contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Em seguida, o conteúdo foi macerado e centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e armazenado a -20 °C até uso posterior. No ensaio enzimático, 60 µL de solução enzimática (alíquota do homogenato de larvas) foram pré-incubados, por 15 min a 37 °C, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20 mM, e 100 µL do sLITi (1 mg/mL). Após esse período, a reação foi iniciada adicionando-se 200 µL de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Decorridos 30 min, a reação foi interrompida adicionando-se 300 µL de solução de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 min e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 M na proporção 1:2 (v/v) e seguido da leitura das absorbâncias a 440 nm.

4.9.3 Atividade inibitória *in vivo* do sLITi contra larvas

Para determinação da atividade *in vivo*, 100 larvas de 4º estágio foram incubadas em solução aquosa de sLITi, com concentração de 2 mg/mL, por 24 h. Após esse período as larvas foram submetidas a banho em água destilada e depois dissecadas conforme descrito no tópico anterior. Neste caso, foi avaliada a capacidade do homogenato em clivar a azocaseína seguindo o protocolo descrito anteriormente. O teste foi feito em triplicata, tendo atividade padrão a clivagem da azocaseína pelo homogenato intestinal de larvas incubadas apenas em água.

5. RESULTADOS

5.1 Processamento das sementes e obtenção da fração rica em inibidores de tripsina de *Leucaena leucocephala*

Os processos de delipidação e pulverização das sementes de *L. leucocephala* resultaram em uma farinha fina que, quando homogeneizada com tampão, possibilitou a obtenção de um extrato com alto teor de proteínas solúveis (4,34 mg/mL). Vista a obtenção das moléculas com atividade inibitória de enzimas proteolíticas, utilizou-se esse extrato para o ensaio de inibição de proteases serínicas (tripsina e quimotripsina) e cisteínica (papaína), onde foi detectada atividade inibitória para a tripsina bovina e papaína (TABELA 1).

Devido à concentração e variabilidade de proteínas presentes no extrato bruto, foram realizadas precipitações independentes, encerrando diferentes concentrações de ácido tricloroacético (TCA), para precipitar proteínas com massas moleculares mais elevadas. Neste caso foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5% de TCA (m/v). As frações obtidas foram dialisadas, tiveram suas proteínas solúveis dosadas e, então, foram submetidas novamente ao ensaio de inibição de tripsina e quantificados seu percentual de inibição e atividade inibitória específica. As frações de 0,5 – 3,0% de TCA mantiveram atividade inibitória de tripsina, enquanto que a fração 3,5% de TCA teve um decaimento na atividade inibitória (TABELA 2). Alíquotas contendo 20 µg de proteínas dessas frações e do extrato bruto foram reservadas para a análise do perfil proteico, onde foi possível perceber que houve a concentração das proteínas com massa molecular próxima a 20 kDa (FIGURA 6). A fração que continha 3% de TCA foi escolhida para os passos seguintes por apresentar elevada atividade específica (2384,33 UI/mg de proteína).

Tabela 1 - Concentração de proteínas solúveis (mg/mL) no extrato bruto de sementes de *Leucaena leucocephala* (EBL) obtido por extração com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e avaliação das atividades inibitórias de papaína, tripsina e quimotripsina

Concentração de proteínas solúveis (mg/mL)			
EB		4,34 ± 0,7	
Inibição de atividades enzimáticas (%)			
	Papaína	Tripsina	Quimotripsina
EB	100,0 ± 1,3	95,8 ± 3,1	-

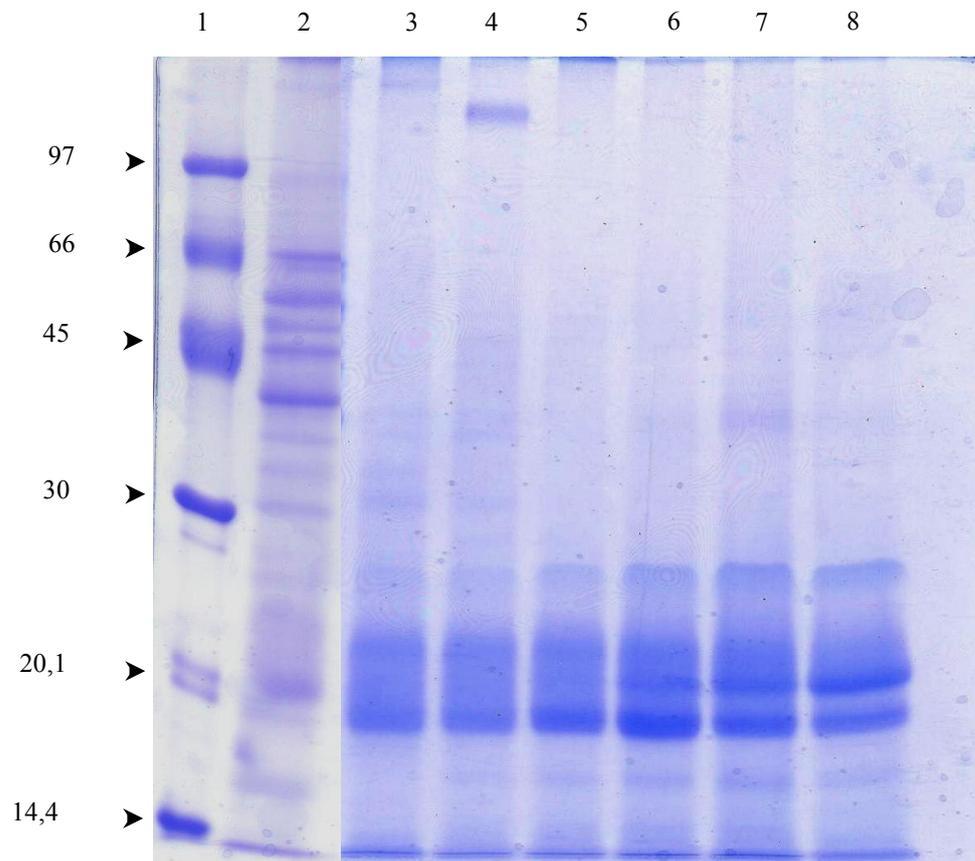
Tabela 2 - Frações obtidas a partir do extrato bruto de *Leucaena leucocephala* após fracionamento com ácido tricloroacético (TCA) a 20% e monitoramento da atividade inibitória de tripsina

Amostras	Atividade inibitória de tripsina	
	Inibição (%)	Atividade específica UI/ mg de proteína
EB*	95,8 ± 3,1	385,95
Fração obtida por precipitação com TCA (%)		
F**0,5	94,9 ± 1,5	639,55
F1,0	95,8 ± 1,3	574,24
F1,5	97,3 ± 0,7	747,04
F2,0	92,8 ± 2,1	1.605,67
F2,5	82,2 ± 1,3	1.935,58
F3,0	95,2 ± 0,9	2.384,33
F3,5	65,3 ± 2,3	548,77

* EB – Extrato bruto proteico de *Leucaena leucocephala*.

** Frações correspondentes ao percentual de ácido tricloroacético utilizado na obtenção da mesma.

Figura 6 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) do Extrato Bruto de Leucena (EB) e frações proteicas obtidas após precipitação com ácido tricloro acético (TCA). 1- marcador de massa molecular [fosforilase b de coelho (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina de galinha (45 kDa) anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa); alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- EB; 3-8: Frações proteicas 0,5-3% precipitadas com TCA, respectivamente.



Dada à obtenção de uma fração do extrato bruto elevada atividade inibitória de tripsina, decidiu-se aplicá-la em coluna de sepharose 4B com anidrotripsina acoplada (cromatografia de afinidade). Na coluna, contendo aproximadamente 10 mL de matriz previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, foram aplicados 5 mg dessa fração dissolvida em mesmo tampão. A coluna foi então eluída com o mesmo tampão e foram coletadas frações de 1,5 mL para acompanhamento da absorbância a 280 nm. Após a completa eluição do não adsorvido à coluna, foram aplicados 30 mL de HCl 50 mM para promover a eluição das proteínas adsorvidas à matriz, novamente com o monitoramento da absorbância a 280 nm (FIGURA 7). Esses picos cromatográficos foram dialisados contra água destilada e juntamente com a fração 3% (F3%) e o extrato bruto foram submetidos a ensaio de inibição de tripsina e papaína (TABELA 3). Alíquotas desses picos, da F3% e do extrato bruto também foram submetidas à precipitação proteica com o auxílio do *kit 2-D clean UP* da GE Lifescience (São Paulo, Brasil). As proteínas obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS (FIGURA 8 A).

Na figura 7, os perfis eletroforéticos das proteínas da F3% e do pico retido são semelhantes, contudo ao ser reduzida a abundância das proteínas com massa molecular próximas a 20 e 15 kDa pela cromatografia de afinidade a anidrotripsina é possível verificar a presença de outras proteínas de massa molecular mais elevada como visto no pico não retido.

De modo a avaliar a presença de subunidades nas proteínas do pico retido, uma alíquota deste foi incubada com o agente redutor β - mercaptoetanol, visto que esse é capaz de quebrar as pontes dissulfeto. As proteínas reduzidas do pico retido e do pico não retido foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS (FIGURA 8 B). Em ambos os picos a banda proteica com massa próxima a 20 kDa foi reduzida dando origem a uma banda proteica de massa próxima a 15 kDa e outra subunidade menor.

Devido à baixa abundância de proteínas e elevada atividade específica, o pico retido foi denominado *sLITi* (inibidor semipurificado de *L. leucocephala*).

Figura 7- Perfil cromatográfico da fração proteica obtida com TCA 3% (LF3) de *Leucaena leucocephala* dissolvida em Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e aplicada em coluna contendo matriz de sepharose 4B com anidrotipsina acoplada equilibrada com o mesmo tampão. Fluxo aproximado de 0,5 mL/min, com frações de 1,5 mL. A fração retida foi eluída com HCl 50 mM

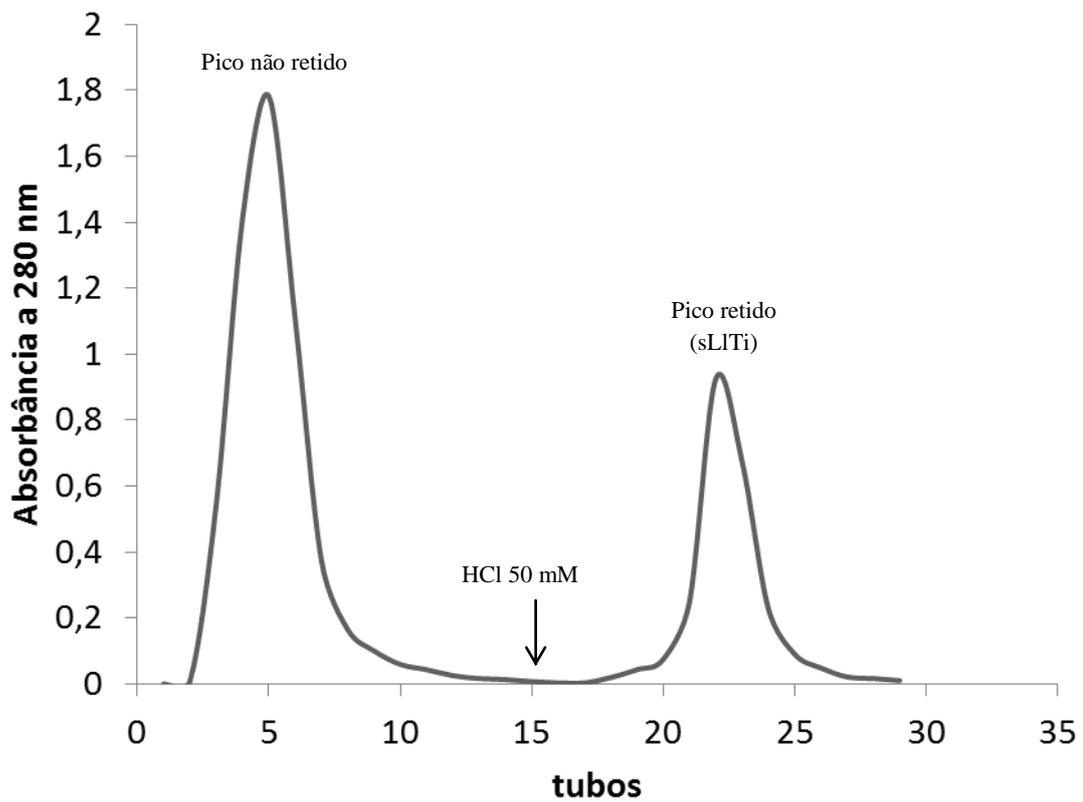
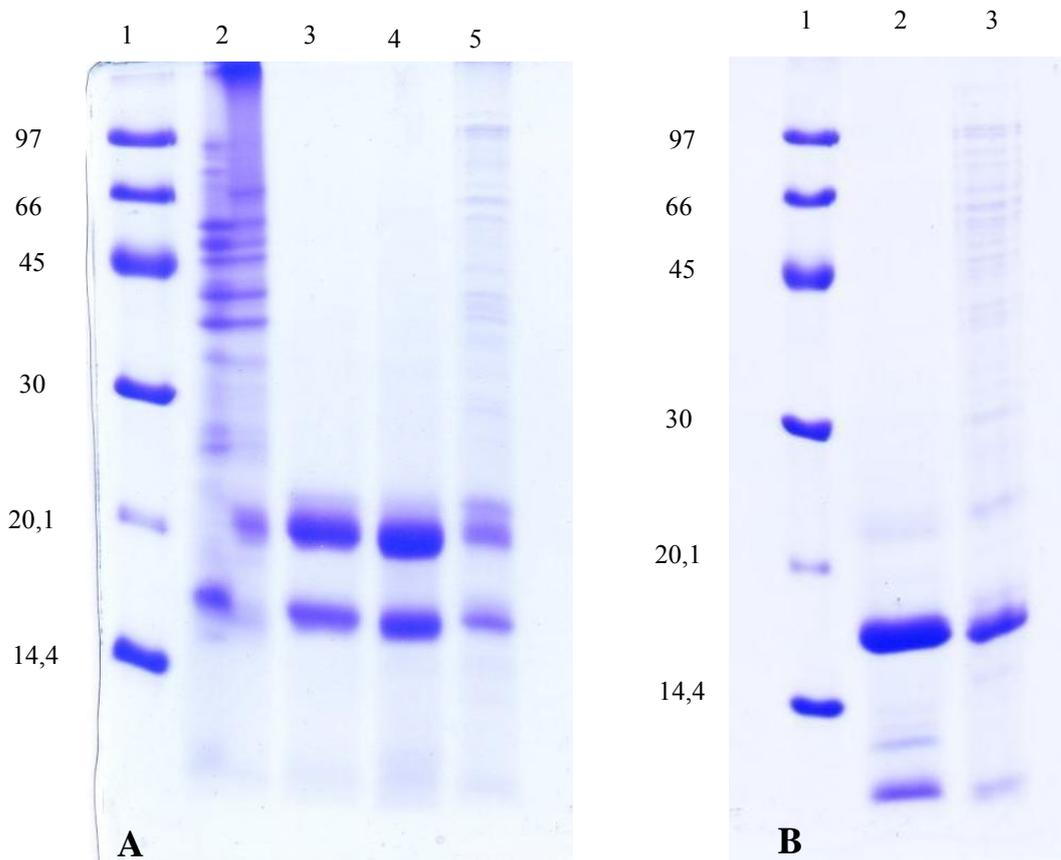


Tabela 3 Atividade inibitória de tripsina e papaína do extrato proteico bruto (EB), fração proteica obtida TCA 3% (F3%) e das frações cromatográficas, pico retido (sLITi); pico não retido (PNr) a sepharose 4B contendo anidrotripsina acoplada, de sementes de *Leucaena leucocephala*

Amostra	Atividade inibitória de tripsina		Atividade inibitória de papaína	
	Inibição (%)	Atividade específica UI/mg de proteína	Inibição (%)	Atividade específica UI/mg de proteína
EB	95,8 ± 3,1	340,95	100 ± 1,3	-
F3%	95,2 ± 0,9	2.384,33	90 ± 0,3	-
sLITi	93,3 ± 0,3	3.487.13	ND	ND
PNr	ND	ND	ND	ND

* ND : atividade não detectada.

Figura 8 (A) Perfil eletroforético em condições não redutoras (SDS-PAGE 15%) 1- marcador de massa molecular [fosforilase b de coelho (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina de galinha (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa); alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- extrato Bruto de Leucena (EB); 3- fração proteica obtida em TCA 3% (LF3); 4- sLITi; 5- pico não retido (PNr) anidrotripsina-sepharose 4B. (B) Perfil eletroforético em condições redutoras (β - mercaptoetanol) (SDS-PAGE 15%) 1- marcador de massa molecular; 2- sLITi; 3 - pico não retido (PNr) anidrotripsina-sepharose 4B. Em ambos os casos foram aplicados 20 μ g de proteína.



5.2 Caracterização bioquímica parcial do sLITi

5.2.1 Resistência a agentes físicos e químicos

Na caracterização parcial do sLITi foram realizados testes físicos e químicos como a resistência deste a agentes redutores como o DTT e a variações de pH e de temperatura. Quando avaliada a resistência ao agente redutor, o sLITi mostrou-se resistente. Das variações testadas, tempo e concentração, nas concentrações (10 e 100 mM) e maior tempo aplicado (120 min) houveram decaimento significativo da atividade inibitória de tripsina, próximo 5 e 10% e mantendo 89% e 79% de atividade inibitória inicial, respectivamente (FIGURA 9).

Ao ser avaliado quanto à resistência a diferentes faixas de pH, o sLITi manteve sua atividade inibitória superior a 85% em todos os pHs testados e apenas em pH 4,0 foi quantificada atividade inferior a 90% (FIGURA 10 A).

Quanto a resistência à temperatura, o sLITi foi resistente, não havendo diferenças significativas quanto aos percentuais de inibição da atividade proteolítica da tripsina. A fim de se avaliar a resistência quanto ao tempo a 100 °C, o sLITi foi mantido por 150 min a essa temperatura e após a realização do ensaio ainda foi constatada a mesma atividade inibitória (FIGURA 10 B).

5.2.2 Atividades em gel e eletroforese bidimensional

As atividades em gel visaram à localização espacial das proteínas que apresentam atividade inibitória para tripsina (FIGURA 11) e para o homogenato larval (FIGURA 12). Foram realizadas SDS-PAGEs contendo 1% de gelatina no gel tendo sido aplicado nos poços 20 µg de proteína. Após a digestão da gelatina e revelação do gel por coloração com coomassie, as bandas visualizadas correspondem aos inibidores. Em ambos os casos utilizou-se como controle positivo o SBTi (inibidor de tripsina da soja) e foram realizadas SDS-PAGEs para comparação.

Figura 9 – Percentual de inibição da atividade da tripsina pelo sLITi após exposição ao agente redutor DTT em diferentes concentrações e tempos. O (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle.

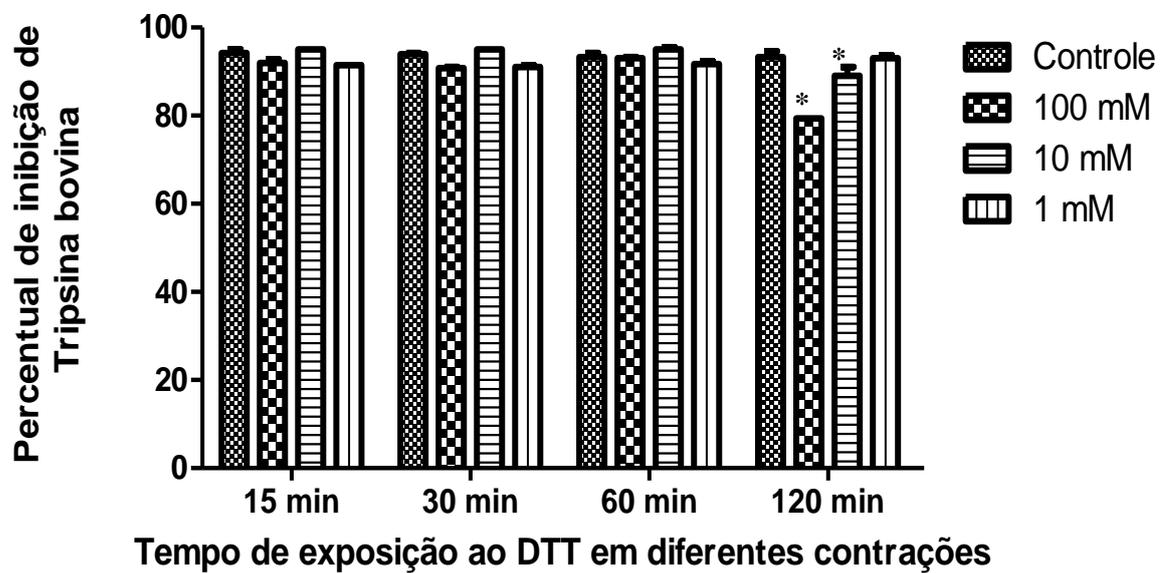


Figura 10 – Avaliação da atividade inibitória de tripsina pelo sLITi quando incubado em diferentes valores de pH (A); e temperatura (B).

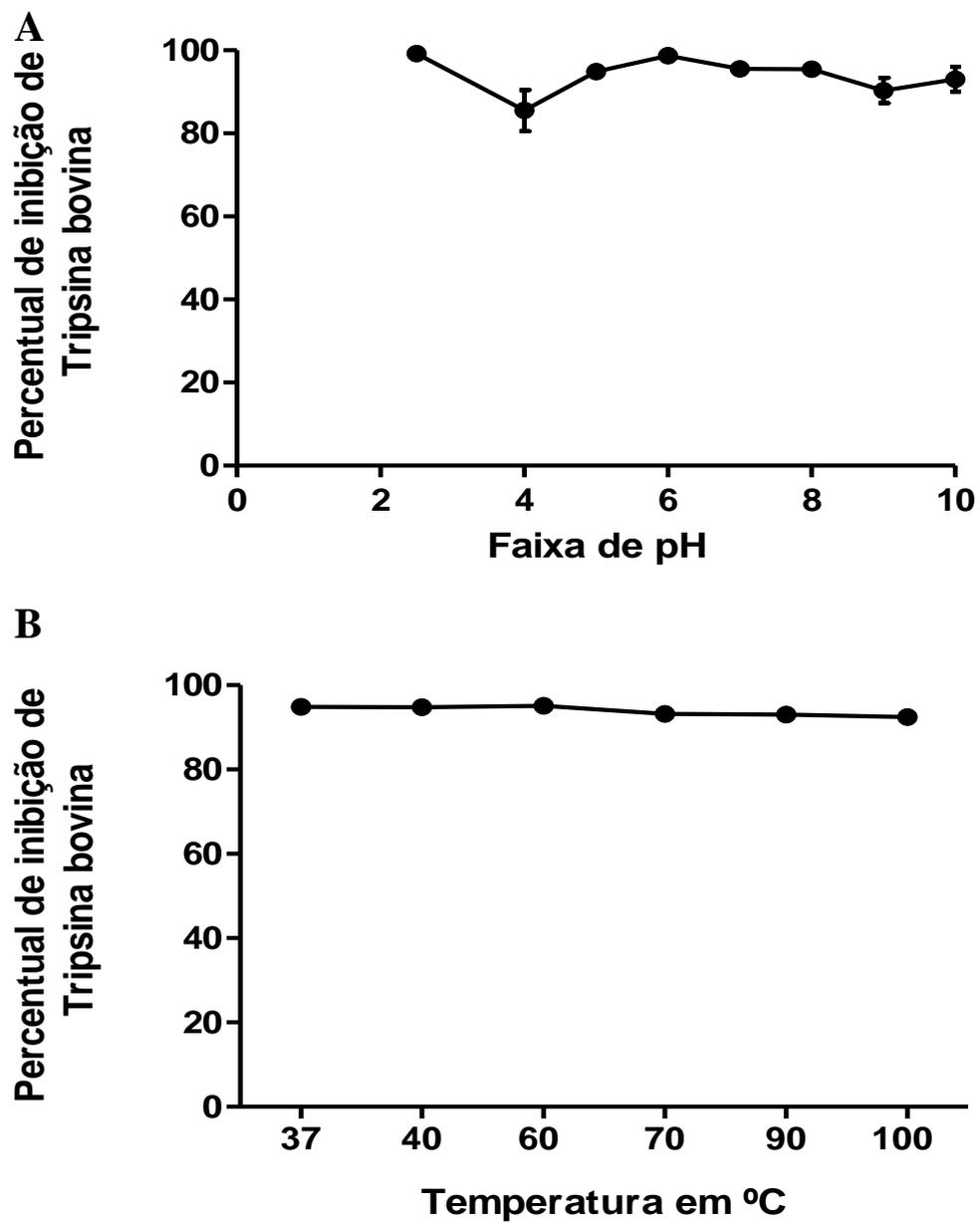


Figura 11 – (A) Perfil eletroforético em condições não redutoras (SDS-PAGE 15%) 1- marcador de massa molecular [fosforilase b de coelho (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina de galinha (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa); alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 3- sLITi. (B) Zimograma reverso obtido em gel de poliacrilamida 15% contendo 0,1 % de gelatina, após a digestão com tripsina bovina, 1- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 2- sLITi. Em ambos os géis foram aplicados 20 µg de proteínas.

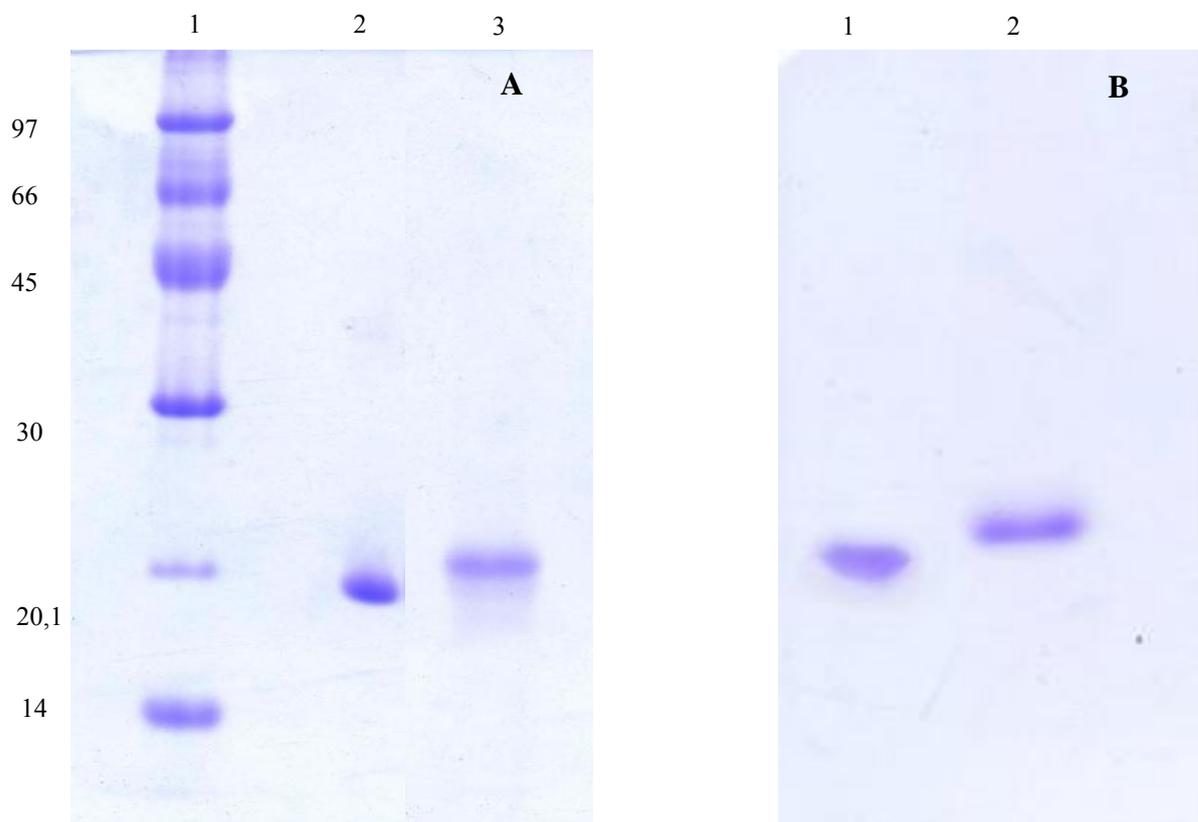
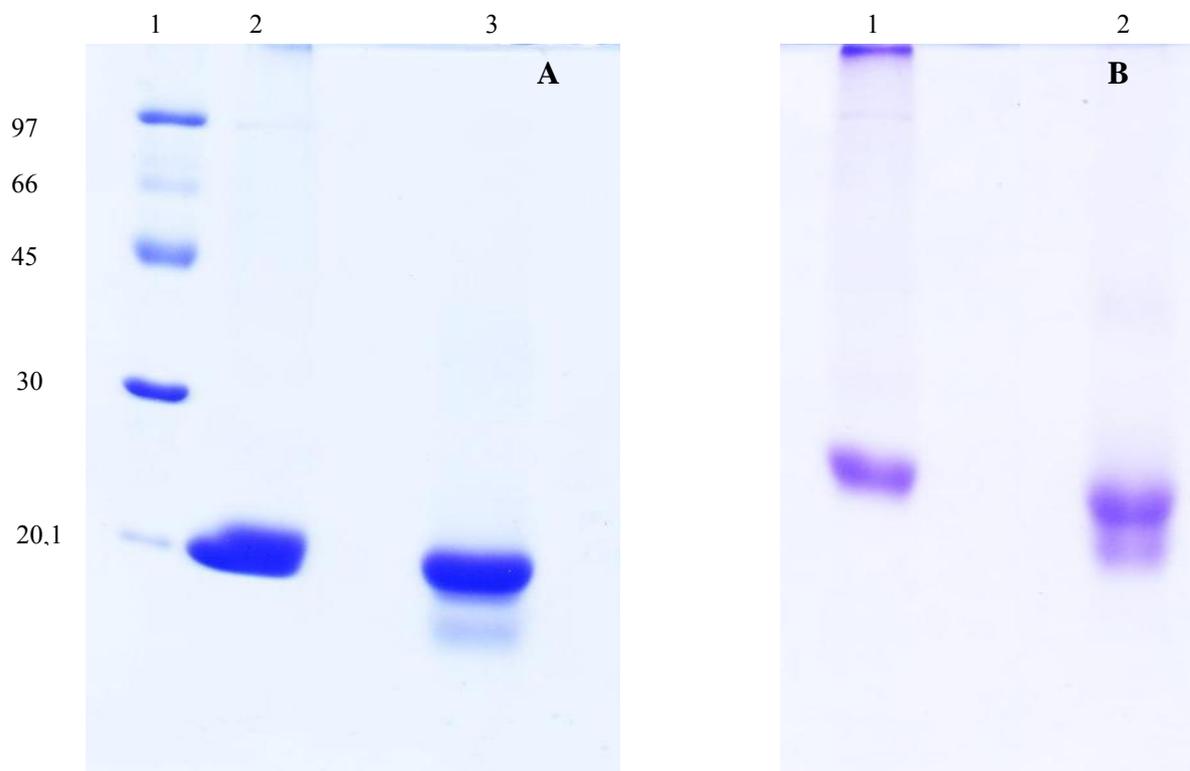


Figura 12 - (A) Perfil eletroforético em condições não redutoras (SDS-PAGE 15%) 1- marcador de massa molecular [fosforilase b de coelho (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina de galinha (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa); alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 3- sLITi. (B) Zimograma reverso obtido em gel de poliacrilamida 15% contendo 0,1 % de gelatina, após a digestão com o homogenato larval de *Aedes aegypti*, 1- inibidor de tripsina da soja (SBTi); 2- sLITi. Em ambos os géis foram aplicados 20 µg de proteínas.



Nos zimogramas foi possível perceber que há apenas uma banda proteica com atividade inibitória para tripsina com massa molecular próxima a 20 kDa, enquanto que para as proteases do homogenato intestinal das larvas há a presença de pelo menos três, sendo duas próximas a 20 kDa e uma com massa molecular superior.

Pelo fato do sLITi apresentar mais de uma banda quando submetido à eletroforese unidimensional, optou-se por fazer uma eletroforese bidimensional. Nos géis corados com coomassie coloidal foi possível a visualização de mais de 25 *spots* com massas moleculares próximas a 20 e 14 kDa, estando estes distribuídos na faixa de pH mais ácido (FIGURA 13).

5.3 Atividades biológicas contra *Ae. aegypti*

Dada as atividades anteriormente descritas para o sLITi e tendo conhecimento do potencial inseticida de inibidores de enzimas proteolíticas, avaliou-se, então, o efeito do sLITi sobre a eclosão dos ovos e o desenvolvimento das larvas eclodidas em solução contendo o inibidor com concentração de 1 mg/mL. O sLITi, ao final de 2 dias, apresentou atividade inibitória da eclosão dos ovos de *Ae. aegypti* em torno de 50% quando comparado aos controles negativos (água e BSA), e não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle positivo [inibidor da soja (BBI)] (FIGURA 14 A).

As larvas eclodidas permaneceram incubadas nas respectivas soluções e foi avaliado o efeito sobre o desenvolvimento durante 10 dias. As larvas receberam alimentação diária de 5 mg de ração/replicata e ao final do décimo dia, quando eclodiram os primeiros mosquitos nos grupos tratados, foi determinada a taxa de mortalidade. Ao 4º dia as larvas incubadas com os inibidores BBI e sLITi apresentaram retardo no desenvolvimento (FIGURA 14 B), pois as larvas permaneceram em estádios iniciais (1º e 2º), enquanto as larvas dos controles BSA e água estavam em estádios mais avançados (4º inicial ou tardio) (FIGURA 15).

Figura 13 – Gel de eletroforese bidimensional para o sLITi, obtido após a focalização isoeétrica em tira com variação de pH de 3-10 linear e corrida eletroforética em gel de acrilamida 15% contendo SDS. À direita os marcadores de massa molecular [fosforilase b de coelho (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina de galinha (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa); alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)] . Nesse gel foram utilizados 35 µg de proteína.

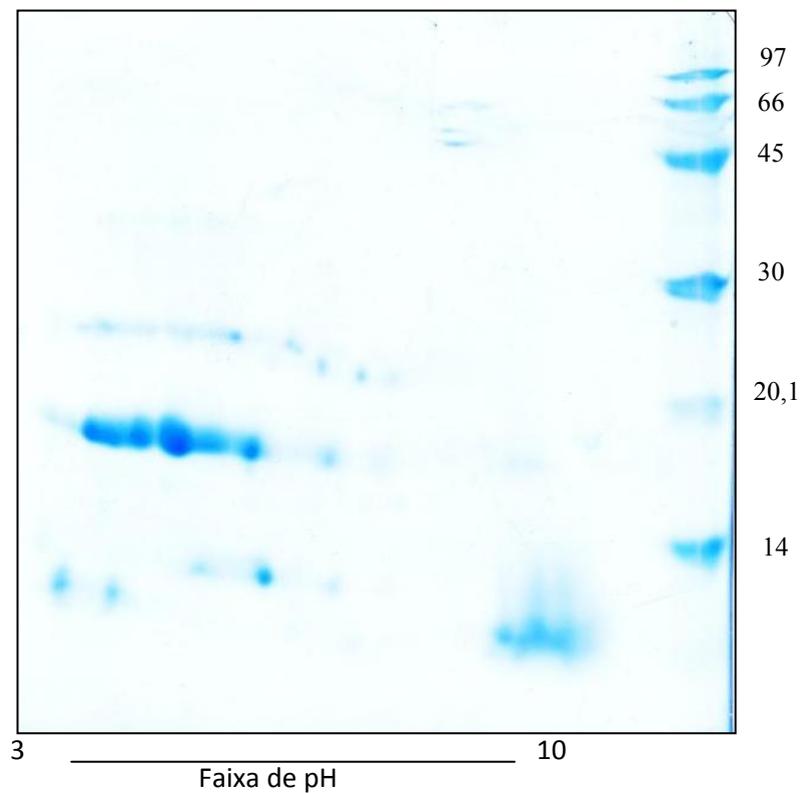


Figura 14 (A) Percentual de ovos eclodidos de *Aedes aegypti* após 2 dias de incubação em soluções aquosas contendo albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1 mg/mL; (B) Média do número de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes estádios de desenvolvimento após 4 dias incubadas com as amostras albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi com concentrações de 1mg/mL. (*) indica valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle (H₂O e BSA).

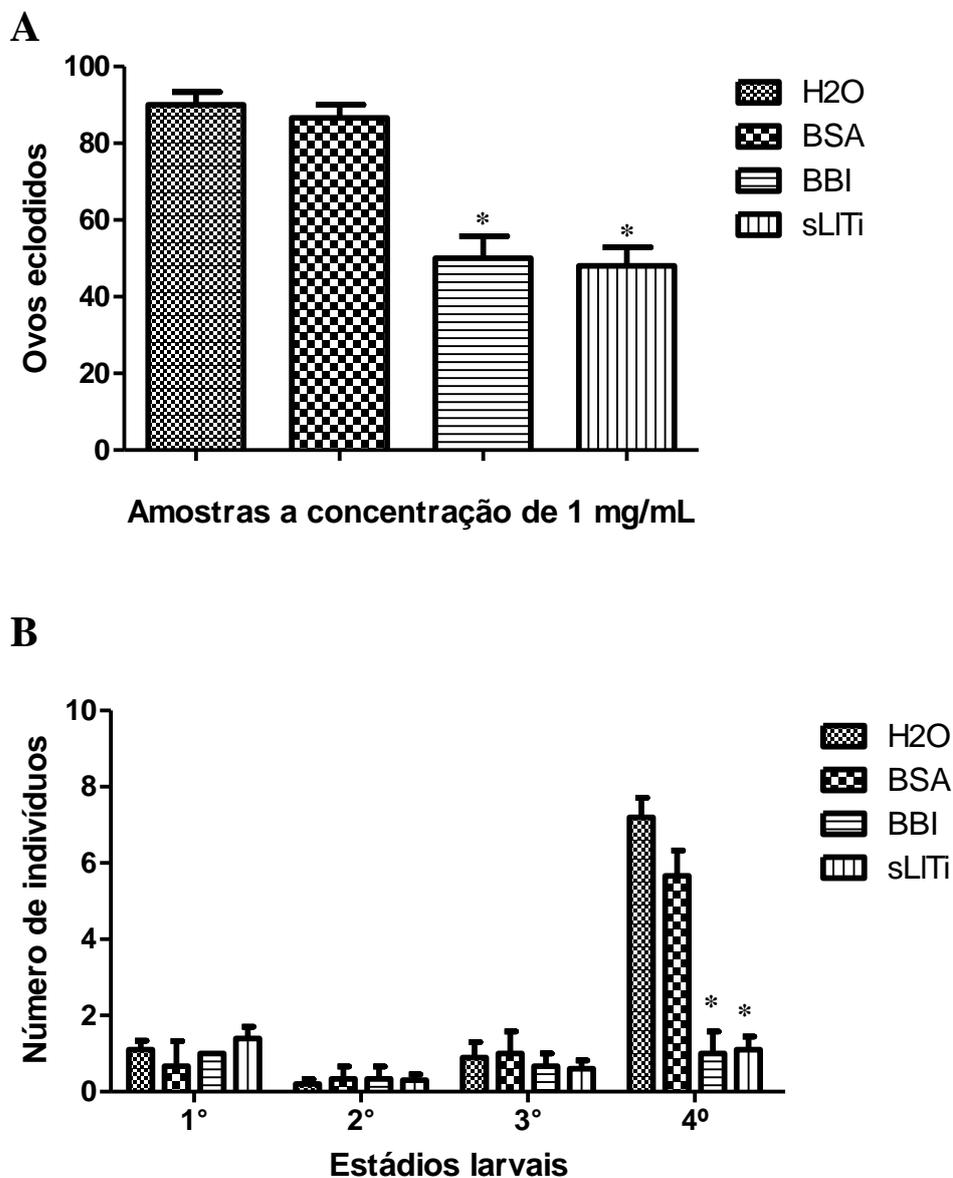


Figura 15 Aspecto morfológico das larvas de *Aedes aegypti* após 4 dias incubadas em água destilada e soluções proteicas com concentração de 1mg/mL, (A) larvas em 4º estágio presentes em água destilada; (B) larvas em 4º estágio presentes na solução de albumina sérica bovina, (C) larvas em 2º estágio presentes na solução de inibidor Bowman-Birk da soja e (D) larvas em 2º estágio presentes na solução de sLITi. C e D demonstram o retardo do desenvolvimento quando as larvas são incubadas com inibidores de proteases serínicas. A barra corresponde a 1mm.



Os efeitos deletérios do sLITi e do BBI sobre as larvas em desenvolvimento foram visualizados sob a forma de retardo na mudança de estágio larval, encapsulamento sob a forma de pupa e eclosão dos mosquitos. Aos 7 dias do experimento, nos controles água e BSA já foi possível a observação de pupas diferente do observado nos tratamentos contendo inibidores de proteases, onde as larvas estavam em 3° ou 4° estádios (FIGURA 16A).

Após 8 dias de experimento, foi possível observar a presença de pupas nos tratamentos com inibidores e mosquitos nos controles. O efeito inseticida dos inibidores permaneceu, pois as larvas que não conseguiram driblar a ação inibitória das suas proteases não sobreviveram. O número de indivíduos presentes nos tratamentos com inibidores é significativamente menor, tendo média de 1 indivíduo por repetição, enquanto nos grupos controles (água e BSA) as médias foram respectivamente 8 e 7 indivíduos (larvas, pupas e mosquitos) por repetição (FIGURA 16B).

O experimento foi encerrado depois de decorridos 10 dias, quando eclodiram os primeiros mosquitos nos grupos testes (FIGURA 17 A). O número de larvas vivas foi contabilizado e a taxa de mortalidade foi calculada como [número de indivíduos vivos/número de ovos eclodidos], tendo sido obtido para o sLITi uma taxa de mortalidade de 68%, semelhante o BBI de 77%, ambos contrastando com os controles (água e BSA) que apresentaram 13 e 19%, respectivamente (FIGURA 17 B).

Após os resultados do experimento de desenvolvimento, optou-se por verificar se o sLITi era capaz de inibir *in vivo* as proteases intestinais das larvas de *Ae. aegypti* em 4° estágio. As larvas foram incubadas em solução contendo 2,0 mg/mL do sLITi por 24 h, após esse período foram dissecadas e procedeu-se o ensaio. Neste, o sLITi foi capaz de reduzir em 56% a atividade proteolítica presente no intestino das larvas. Realizou-se também um ensaio de inibição *in vitro* do homogenato intestinal das larvas. Uma alíquota do homogenato foi incubada com 100 µL de solução de sLITi 1 mg/mL e a atividade inibitória obtida foi superior, 70% (TABELA 4).

O sLITi foi também submetido a ensaio de inibição de acetilcolinesterase, tendo em vista que essa é um enzima serínica e o alvo de muitos inseticidas. Neste ensaio as proteínas presente foram capazes de reduzir a quebra do iodeto de colina pela acetilcolinesterase em 30,5% (TABELA 4).

Figura 16 - (A) Média do número de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes estádios de desenvolvimento após 7 dias de incubação com albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi (1mg/mL), evidenciando a presença de pupas nos grupos controle; (B) Média do número de larvas de *Ae.aegypti* em diferentes estádios de desenvolvimento após 8 dias de incubação com as amostras albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi (1 mg/mL), evidenciando a presença de mosquitos nos grupos controles. (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle (H₂O e BSA).

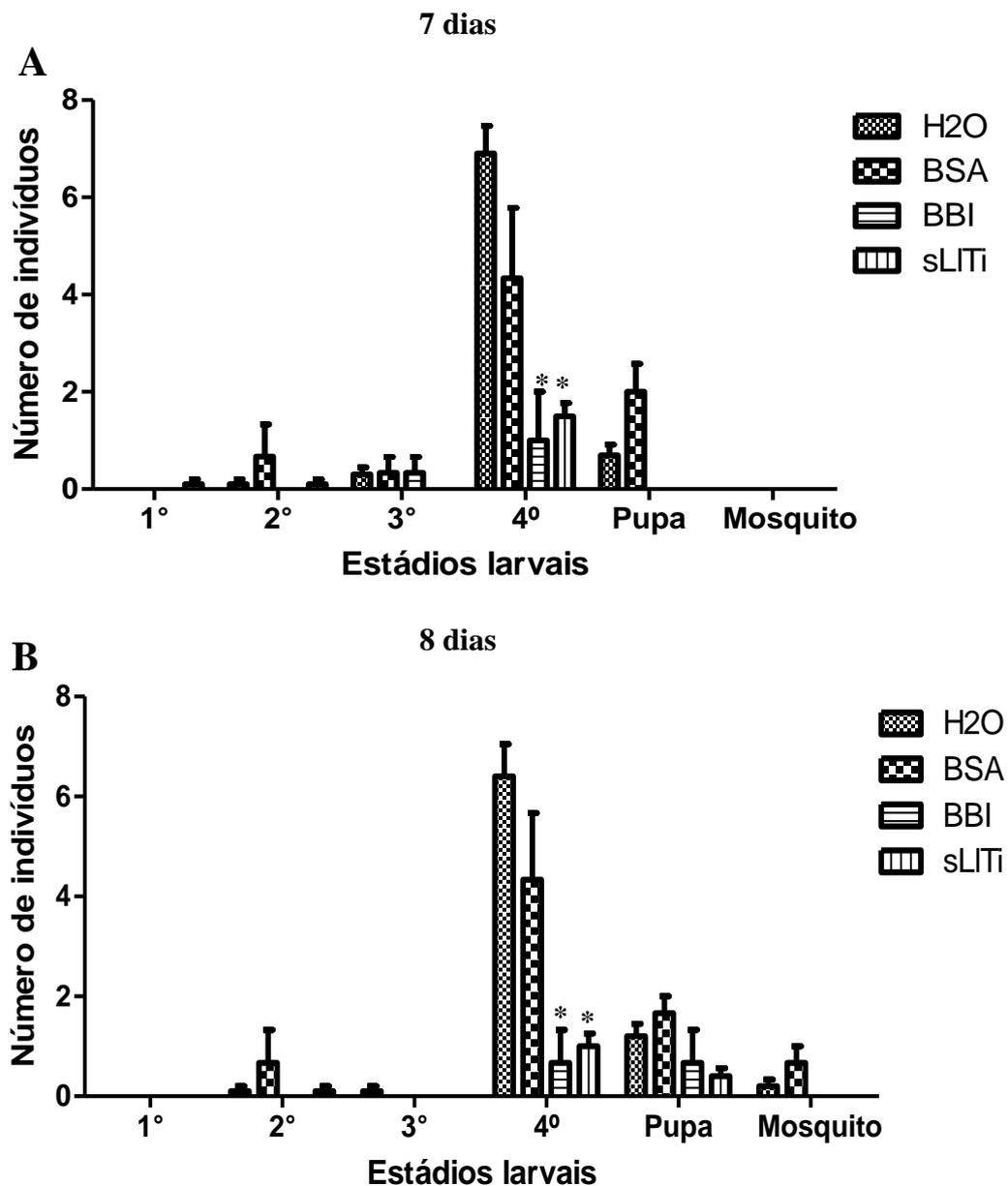


Figura 17 (A) Média do número de *Aedes aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento após 10 dias incubadas com as amostras albumina sérica bovina, inibidor Bowman-Birk da soja e sLITi (1mg/mL), evidenciando a presença de mosquitos nos grupos testes. (B) Percentual de mortalidade dos indivíduos eclodidos após 10 dias em contato com as amostras acima referidas. (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle (H₂O e BSA).

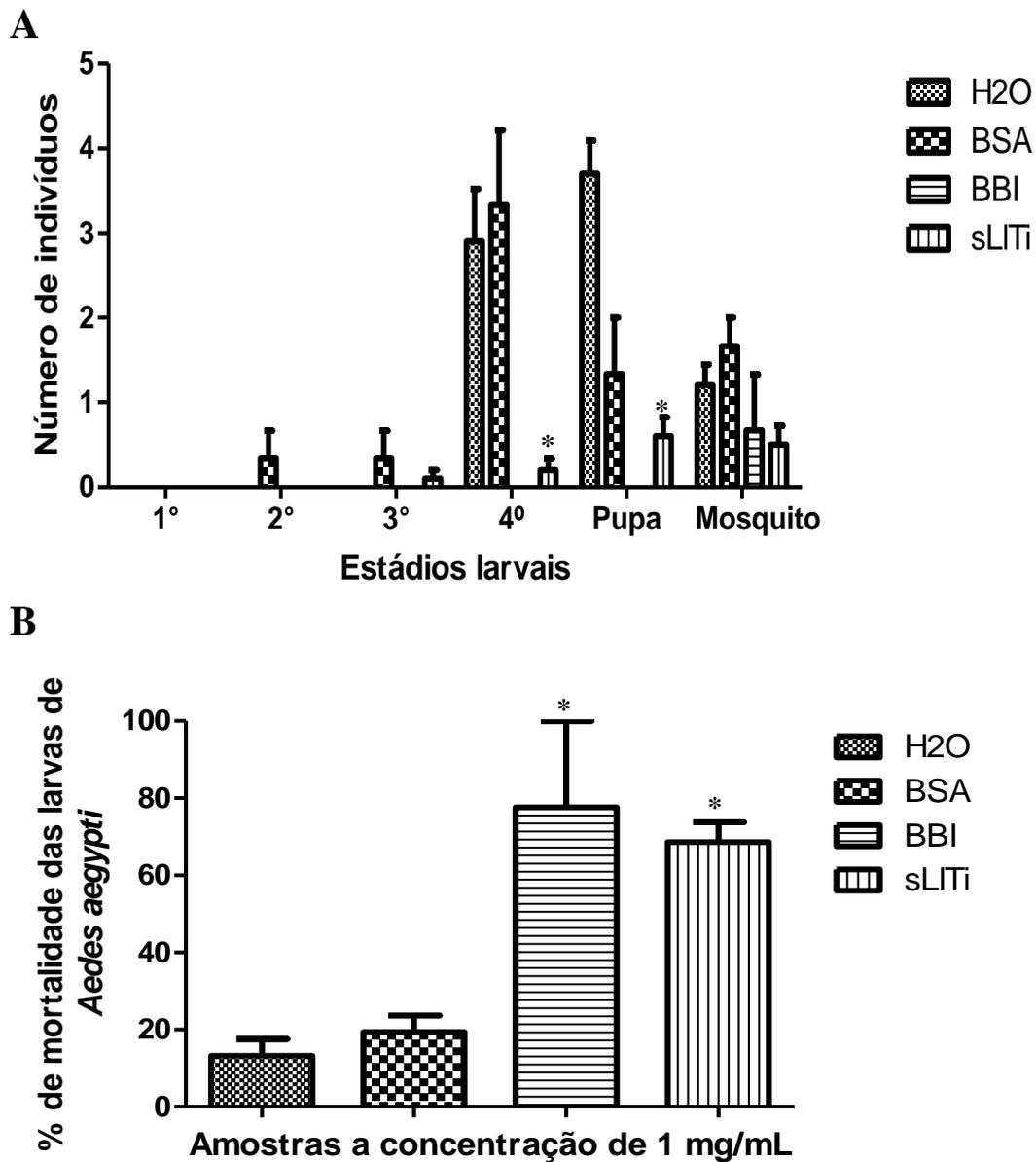


Tabela 4 Percentual inibitório *in vivo* e *in vitro* do sLITi sobre a atividade proteolítica do homogenato intestinal das larvas de *Aedes aegypti* e acetilcolinesterase

Amostra/ via	Atividade inibitória (%)	
	Homogenato intestinal	Acetilcolinesterase
sLITi <i>in vitro</i>	70 ± 2,6	30*
sLITi <i>in vivo</i>	56 ± 4,1	ND**

* - Valor correspondente à média das atividades inibitórias.

**ND – Não determinado.

6. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as sementes de *L. leucocephala* apresentam inibidores de tripsinae que essas podem ser semipurificadas por meio de precipitação do extrato bruto com TCA 3% e cromatografia de afinidade em coluna de anidrotripsina-sepharose 4B e ser semipurificados através de cromatografia de afinidade em coluna de anidrotripsina. Souza-Pinto *et al.* (1996) descreveram a presença de um inibidor de protease serínica obtido a partir de sementes de *L. leucocephala* e, assim como o referido autor, outros descreveram a presença de inibidores de proteases em sementes de Leguminosae (OLIVEIRA *et al.*, 2007ab; LIN; NG, 2008), Solanaceae (JACINTO *et al.*, 1998; VALUEVA *et al.*, 1998), Poaceae (ABE *et al.*, 1993; ABE; WHITAKER, 1988; KONDO *et al.*, 1990; ABE; ARAI, 1991). Essas são as famílias vegetais mais estudadas quanto a inibidores de proteases serínicas. Há relatos também para as famílias Cucurbitaceae (TSOI *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2004), Asteraceae (KOUZUMA *et al.*, 2000), Rutaceae (SHEE; SHARMA, 2007; SHEE *et al.*, 2007), Euphorbiaceae (SRITANYARAT *et al.*, 2006; CHAUDARY *et al.*, 2008), e recentemente Cactaceae (AGUIRREZABALA-CÁMPANO *et al.*, 2012), todas pertencentes às Angiospermas, além de relatos da ocorrência desses em famílias de Gimnospermas (Cycadales, Coniferales e Ginkgoales) (SAWANO *et al.*, 2008; TORRES-CASTILLO *et al.*, 2009).

O presente trabalho visou a obtenção de uma fração proteica obtida de semente de *L. leucocephala* que concentrasse inibidor de tripsina (LTI), possivelmente aquele anteriormente purificado por Souza-Pinto *et al.* (1996). Após a realização da cromatografia de afinidade a anidrotripsina-sepharose 4B e eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS, foi possível a visualização de bandas proteicas com massa molecular próxima à descrita para o LTI que corresponde a 20 kDa. Esse resultado nos levou a acreditar se tratar do mesmo inibidor. Contudo, após o início da caracterização bioquímica onde foram realizados ensaios inibitórios para proteases serínicas (tripsina e quimotripsina), observou-se que o pico obtido (sLTI) não foi capaz de inibir a atividade proteolítica da quimotripsina. Tal resultado contrasta com o descrito por Oliva e colaboradores (2000), ao realizarem a caracterização bioquímica do inibidor purificado por Souza-Pinto *et al.* (1996). A atividade inibitória a papaína presente na F3% foi perdida após a cromatografia de afinidade a anidrotripsina-sepharose 4B, o que levou ao descarte da possibilidade de um inibidor

bifuncional como o obtido de sementes de *Crotalaria palida* (CpaTi) (GOMES *et al.*, 2005) e o ApKTI (MIGLIOLO *et al.*, 2010).

Diante dos resultados iniciais de caracterização e tendo em vista a probabilidade de um novo inibidor ou uma isoforma cujas modificações na sua estrutura tornaram-no incapaz de reagir com o sítio catalítico da quimotripsina, deu-se continuidade ao processo de caracterização bioquímica do sLTI. A presença de isoformas de inibidores é bastante comum e relatada por diversos autores (BHATTACHARYYA; BABU, 2009). Sementes de leguminosas podem expressar mais de um inibidor de protease e podem, também, expressar de 6 a 10 isoformas de um mesmo inibidor, possuindo características distintas como ponto isoelétrico, resistência à temperatura e capacidade inibitória (MORRISON *et al.*, 2007). Pelos fatos supracitados supõe-se que o sLTI possua outro inibidor de protease serínica com propriedades distintas daquele purificado por Souza-Pinto *et al.*(1996).

A existência de múltiplas isoformas é um fenômeno comum, e pode ser explicada através de modificações pós-traducionais ou por fenômenos de duplicação gênica (MACEDO *et al.*, 2002). A aparente perda de um número significativo de resíduos de aminoácidos durante modificações pós-traducionais tem sido relatado para inibidores de várias espécies de leguminosas (SILVA, 2004). A origem e o papel fisiológico das isoformas de inibidores em plantas ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma possibilidade levantada seria seu papel na defesa vegetal, uma vez que deleções genéticas poderiam promover a inativação do gene codificador. Contudo, a presença de regiões duplicadas para codificar outra proteína com similaridade estaria presente e manteria a defesa pertinente à molécula perdida.

A especificidade dos inibidores presentes na família Kunitz pode variar. Poucos inibidores desta família são específicos para quimotripsina e não inibem tripsina (MACEDO *et al.*, 2007); alguns são potentes inibidores de tripsina e também inibem quimotripsina, como o inibidor isolado de *Derris trifoliata* (BHATTACHARYYA; BABU, 2009), ou têm a habilidade de inibir enzimas de diferentes classes, como o inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* (ApKTI), que inibe tripsina e papaína (MIGLIOLO *et al.*, 2010).

A elucidação da especificidade dos inibidores de proteases é sem dúvida, uma das mais importantes formas utilizadas para o esclarecimento do mecanismo de ação e do controle sobre atividade enzimática (MELLO, 2005). Diferentes percentuais de inibição pelo sLTI foram observados para enzimas serínicas testadas (tripsina, homogenato intestinal de larvas de

Ae. aegypti e acetilcolinesterase), o que nos permite especular a presença de uma ou mais moléculas capazes de estabelecer interações com os sítios ativos presentes nestas enzimas, mostrando assim que os inibidores das sementes de *L. leucocephala* podem interagir com diferentes proteases serínicas. A funcionalidade dos inibidores obtidos de *L. leucocephala* também foi mostrado por Souza-Pinto (1996), onde o LTI apresentou atividade inibitória para diferentes proteases serínicas como plasmina, calicreína humana, tripsina e quimotripsina (OLIVA *et al.*, 2000).

A partir da análise do EB e do material proveniente da coluna de afinidade foi possível verificar a obtenção de um alto grau de pureza, o que permitiu o prosseguimento dos estudos. Foi possível observar através de eletroforese e de um zimograma reverso para tripsina que os inibidores presentes no sLITi possuem uma massa relativa próxima a 20 kDa. Características similares de massa são relatadas para outros inibidores obtidos de sementes de plantas da subfamília Mimosoideae, como o de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007), *Dimorphandra mollis* (MELLO *et al.*, 2001) e *Archidendron ellipticum* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

O LTI purificado por Souza-Pinto *et al.* (1996) e caracterizado por OLIVA *et al.* (2000) é um inibidor dimérico que apresenta duas subunidades diferentes com massas moleculares de 15 e 5 kDa, sendo essas ligadas por pontes dissulfeto. Tais características são semelhantes aos dos inibidores obtidos de *Sapindus saponaria* (MACEDO *et al.*, 2010) e *Glycine max* cv “Dull Black” (LIN; NG, 2008). A realização de eletroforese do sLITi em presença de β - mercaptoetanol revelou também a presença de bandas proteicas com massas moleculares aparentes de 5 e 15 KDa. Após a realização de eletroforese bidimensional, constatou-se que apesar do grau de pureza aparente, há a presença de um considerável número de isoformas da subunidade maior com pontos isoelétricos distintos, mas próximos a 4,0, com variação aparente entre 4,0 e 7,0. Semelhantemente, o inibidor de tripsina da soja SBTi possui ponto isoelétrico em 4,5 (KUNITZ, 1947). Corroborando a grande variação de pI observada para os inibidores presentes no sLITi, Morrison *et al.* (2007) descreveram a presença de isoformas de inibidores de tripsina em sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.), os quais possuíam pontos isoelétricos distintos, variando entre 4,6 e 7,6. Já EE *et al.* (2009) descreveram a purificação de um inibidor de tripsina do tipo Kunitz das sementes de *Acacia victoriae* que possui três isoformas e pontos isoelétricos entre 5,13 e 4,27. Assim, supõe-se

que os inibidores presentes no sLITi sejam classificados como do tipo Kunitz devido à presença de pontes dissulfeto e semelhança funcional aos inibidores previamente descritos.

A fim de caracterizar o sLITi em diferentes condições de temperatura, pH e concentrações de DTT, ensaios de estabilidade foram realizados. O inibidor sLITi mostrou uma grande estabilidade a uma ampla faixa de pH, tendo uma pequena redução, próxima a 6%, da sua atividade quando em pH 4, provavelmente devido à proximidade ao ponto isoelétrico como visto na eletroforese bidimensional. Resultados semelhantes foram encontrados para o inibidor isolado de *Poecilanthe parviflora* (GARCIA *et al.*, 2004), tendo sido tal estabilidade atribuída à presença de pontes dissulfeto. Quando submetidos a diferentes temperaturas, o sLITi foi considerado termoestável, pois a manutenção de sua atividade inibitória foi praticamente inalterada mesmo quando este foi aquecido a 100 °C por 30 min. Estes resultados são comuns para inibidores da família Kunitz (MELLO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2007). E semelhante a esses, o sLITi apresentou perda de atividade inibitória à tripsina em torno de 10% quando exposto ao agente redutor DTT em concentração de 100 mM. Este resultado é superior quando, pois mostra que esse inibidor é mais resistente quando comparado ao inibidor de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007) que teve decaimento de sua atividade em 56% quando utilizada a mesma concentração do agente redutor. Diferentemente do sLITi podemos destacar alguns inibidores que apresentam resistência ao DTT, sendo eles os inibidores presentes nas sementes de *Erythrina caffra* (ETI), *Dimorphandra mollis* (DMTI) e *Putranjiva roxburghii* (PrTI), isolados por Lehle *et al.* (1994), Mello *et al.* (2001) e Chaudhary *et al.* (2008), respectivamente.

Segundo Hansen *et al.*, 2007, nos inibidores do tipo Kunitz clássicos, como no inibidor de soja, duas pontes dissulfeto são localizadas sobre a superfície da proteína, o que as tornam altamente acessíveis ao solvente, mas essas não contribuem diretamente na funcionalidade do inibidor e sim na sua estrutura, pois as características inibitórias são individuais de cada proteína. Em contrapartida ao proposto por esses autores, no presente trabalho o sLITi teve sua atividade inibitória reduzida após a redução das pontes dissulfeto, indicando a possível participação dessas na manutenção da conformação estrutural para possibilitar a interação com o sítio da enzima.

Inibidores de protease têm sido utilizados na biotecnologia vegetal para aumentar a resistência de plantas transgênicas a insetos-praga, devido ao potencial inseticida dessas moléculas e seu pequeno tamanho, abundância, estabilidade, além da alta especificidade para

uma determinada classe de enzimas digestivas (MACEDO *et al.*, 2010). A atividade digestiva de enzimas do tipo tripsina foi amplamente relatada entre espécies de insetos e sua especificidade assemelha-se às tripsinas de vertebrados (TERRA; FERREIRA, 1994; LAM *et al.*, 2000; PILON *et al.*, 2006). Entretanto, tripsinas de ambos os grupos podem diferir em pH ótimo, massa molecular, sensibilidade a íons, ponto isoelétrico e sensibilidade a inibidores vegetais (BIRK, 2003). No caso do inseto *Ae. aegypti*, as proteases do seu intestino são majoritariamente serínicas; Kunz (1978) relata que as larvas deste mosquito possuem pelo menos 12 proteases serínicas, sendo essas do tipo tripsina e quimotripsina. Uma recente análise genômica realizada por Venancio *et al.* (2009) revelou que há pelo menos 51 genes que codificam para tripsinas durante o estágio larval. Assim, não há dúvidas de que proteases serínicas apresentam importância vital nos papéis de digestão e desenvolvimento do inseto *Ae. aegypti*.

O sLITi demonstrou atividade inibitória de aproximadamente 70%, sobre o homogenato intestinal das larvas de *Ae. aegypti* quanto avaliado *in vitro*. Isso possibilita estudar sua atividade e sugerir estudos mais aprofundados frente a essa espécie. Gomes *et al.* (2005) relataram a atividade inibitória, exercida pelo inibidor bifuncional obtido de sementes *Crotalaria palida* (CpaTI), sobre proteases obtidas do intestino médio de *Callosobruchus maculatus* em 75% e de *Ceratitis capitata* em 100%. Muitos estudos têm sido realizados nesta área, direcionando a ação de inibidores de proteases, já que estes possuem a capacidade de retardar o desenvolvimento e diminuir a sobrevivência de uma gama de insetos (GIRARD *et al.*, 1998; RAMOS, 2008).

Tendo em vista o bom resultado sobre as enzimas digestivas das larvas *in vitro*, decidiu-se avaliar o efeito *in vivo*, e observou-se que a inibição foi de 56%, contrastando com o resultado obtido em testes *in vitro*. Resultado notável, pois existem inibidores de proteases que são potentes inibidores de proteases de insetos *in vitro* e não são capazes de produzir efeitos deletérios sobre as larvas alimentadas com eles (DE LEO *et al.*, 1998). Vários mecanismos têm sido relatados para esta incapacidade como, por exemplo, o inseto ser capaz de alterar o padrão enzimático presente no seu intestino médio quando alimentado com inibidores de proteases, através da expressão de diferentes enzimas de mesma classe mecanicista, com sítios catalíticos distintos, tal qual a mudança para proteases do tipo quimotripsina, em vez de proteases do tipo tripsina (WU *et al.*, 1997; GATEHOUSE, *et al.*, 1997). Outro mecanismo utilizado para desintoxicar o inibidor de protease é a degradação

através de proteases endógenas dentro do intestino do inseto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o sLITi é capaz de inibir as proteases das larvas de *Ae. aegypti* tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando que as larvas não foram capazes de bloquear ou refugar a atividade inibitória do sLITi.

Sabendo-se da capacidade inibitória *in vivo*, decidiu-se avaliar o efeito do sLITi sobre o desenvolvimento de *Ae. aegypti*, uma vez que períodos mais longos de incubação com o inibidor podem desencadear respostas adaptativas, sobrepujando o efeito inseticida desejado, como descrito anteriormente (BOWN *et al.*, 2004; OPPERT *et al.*, 2005; BRIOSCHI *et al.*, 2007). Neste experimento, os ovos viáveis foram incubados em soluções controles e contendo inibidores de proteases e as larvas eclodidas tiveram seu desenvolvimento avaliado. Ao se tratar da eclodibilidade dos ovos de *Ae. aegypti* o sLITi foi capaz de inibir a eclosão em 53% quando comparado ao controle negativo. A literatura relata que compostos ovicidas são aqueles capazes de interromper o desenvolvimento do embrião, de alterar a sobrevivência das larvas no interior dos ovos ou reduzir a eclosão dessas (GOVINDARAJAN; KARUPPANNAN, 2011). Há poucos relatos de proteínas capazes de inibir a eclosão dos ovos de dípteros, como a lectina de *Moringa oleífera*, WSMoL, obtida de sementes. Esta foi capaz de inibir a eclosão dos ovos de *Ae. aegypti* em 70% mesmo em baixas concentrações (0,15 mg/mL) (SANTOS *et al.*, 2012), valor inferior ao encontrado no presente estudo (0,3 mg/mL de proteínas solúveis). A atividade ovicida é mais relatada para metabólitos secundários, sendo utilizados extratos etanólicos ou metanólicos de folhas como as de *Delonix elata* (MARIMUTHU *et al.*, 2012), *Citrullus colocynthis* e *Cucurbita maxima* (MULLAI; JEBANESAN, 2007) e *Cardiospermum halicacabum* (GOVINDARAJAN, 2011) e extratos aquosos como o de *Calotropis gigantea* (KUMAR *et al.*, 2012). Dessa forma, é notável o efeito deletério dos inibidores de *L. leucocephala* sobre diferentes estágios de vida.

Ao avaliar o efeito do sLITi sobre o desenvolvimento das larvas, observou-se um retardo no desenvolvimento das larvas, ou seja, a mudança de estágio larval foi realizada mais lentamente nas larvas tratadas com inibidores em todos os tempos avaliados (4, 7, 8 e 10 dias). Além disso, o sLITi ocasionou aproximadamente 70% de mortalidade nos indivíduos que não foram capazes de sobrepujar os efeitos deletérios causados pela ingestão dos inibidores. Embora inibidores de tripsina, em geral, não causem toxicidade aguda a insetos, tem sido demonstrado que o prejuízo causado pela digestão crônica dessas moléculas está associado à sua mortalidade (PONTUAL *et al.*, 2012). A mortalidade observada neste

trabalho pode ser explicada por um dos mecanismos de ação dos inibidores, onde os insetos aumentam a expressão de enzimas proteolíticas. Esse aumento na expressão de enzimas como tripsina e quimotripsina pode causar o retardo no desenvolvimento, devido à limitação da síntese proteica, pois enzimas serínicas são ricas em aminoácidos sulfurados (cisteína e metiona) que são necessários para o início desse processo (RAMOS *et al.*, 2009). Corroborando os achados do presente estudo, outros autores também relatam os efeitos deletérios causados no desenvolvimento dos insetos, quando na dieta destes são adicionados inibidores de proteases, sejam serínicos ou cisteínicos, os inibidores DMTI –II obtidos de sementes de *Dimorphandra mollis* causaram retardo no desenvolvimento e mortalidade de 70% em *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) quando incorporados a uma concentração de 1% (m/m) na dieta (MACEDO *et al.*, 2002). O inibidor bifuncional CpaTI obtido de sementes de *Crotalaria pálida*, na concentração de 4% (m/m), reduziu o peso médio e causou mortalidade de 60% das larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera) (GOMES *et al.*, 2005). Em contraste, o inibidor SBTI obtido de sementes de *Glycine max*, mesmo em concentração elevada [3% (m/m)], causou apenas 27% de mortalidade a *Ceratitis capitata* (SILVA *et al.*, 2006). Bhavani e colaboradores (2007) relataram o efeito inseticida de dois inibidores de proteases serínicas obtidos de sementes de *L. leucocephala*, descritos como inibidor de alta massa e inibidor de baixa massa molecular, sobre o desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera), que quando acrescidos à dieta das larvas ocasionou 100% de mortalidade. Tal resultado ratifica o proposto por esse trabalho e demonstra o potencial inseticida dos inibidores de *L. leucocephala* que não se resume aos insetos da ordem Diptera.

Durante os dias de avaliação do desenvolvimento, as larvas em contato com a solução do sLITi à concentração de 1 mg/mL apresentaram retardo na mudança de estágio quando comparados aos controles água e BSA. Contudo, a partir do 7º dia de avaliação, foi possível perceber que os indivíduos dos grupos controle tiveram seu desenvolvimento retardado. Esse retardo pode ter causas multifatoriais, como a elevada densidade populacional que pode retardar o desenvolvimento e a sobrevivência (HAWLEY, 1985), a competição por alimento (FOCKS *et al.* 1993) e o contato físico entre as larvas (BROADIE; BRADSHAW, 1991). O efeito da densidade populacional e competição por alimento sobre o desenvolvimento larval foi relatado por Teng e Apperson (2000), e tendo relatado que a alimentação das larvas deve ser de 0,5 – 2,0 mg de alimento/indivíduo diariamente. No presente trabalho, as larvas receberam diariamente 5 mg de alimento independente da

população presente nas replicatas. Diante desses dados, pode ser sugerido que a carência de alimento nos grupos controle e a sua elevada densidade populacional promoveram o retardo no desenvolvimento das larvas, sendo, portanto, comparável ao desenvolvimento das larvas incubadas com os inibidores. Esses fatores podem ter causado uma análise subestimada do potencial inseticida do sLITi sobre o desenvolvimento das larvas, o qual pode ser superior ao observado nesse trabalho.

A enzima acetilcolinesterase é o alvo de muitos pesticidas, como os organofosforados. Neste trabalho, a atividade inibitória dessa enzima foi avaliada, pois há relatos que o PMSF, um inibidor sintético de proteases serínicas, é capaz de inibir essa enzima (TURINI *et al.*, 1969; SKAU; SHIPLEY, 1999). O sLITi em baixas concentrações (0,07 mg/mL), quando avaliado frente a essa enzima foi capaz de reduzir em média a taxa de degradação do substrato em 30%. Embora os testes tenham sido realizados sobre a acetilcolinesterase de *Torpedo californica* (enguia elétrica), Houghton *et al.* (2006) afirmaram que tal enzima é conservada entre os diversos reinos animais, podendo atuar, portanto, sobre a acetilcolinesterase das larvas. Ademais, o padrão inibitório não foi considerado concentração-dependente, o que sugere que mesmo a menor concentração utilizada (0,07 mg/mL) foi capaz de interagir com os possíveis sítios reativos da acetilcolinesterase. Semelhantemente ao exposto nesse trabalho com relação à inibição da atividade da acetilcolinesterase, Wright *et al.* (1993) mostraram que o inibidor de carboxipeptidases da batata foi capaz de inibir completamente a acetilcolinesterase presente em corpos celulares de axônios e neurônios de humanos, quando utilizado em concentrações de 0,1 mM. Em contraste, a pepstatina (inibidor de proteases aspárticas) não foi capaz de inibir a atividade desta enzima neste mesmo trabalho, mesmo quando utilizado na mesma concentração. Além de outros poucos estudos (*e.g.* fasciculina II isolada do veneno de *Dendroaspis angusticeps*) (FOSSIER *et al.*, 1986), são escassos na literatura relatos de inibidores proteicos dessa enzima, o que enfatiza novamente o potencial dos inibidores de *L. leucocephala*.

Diante dos resultados obtidos com *Ae. aegypti* que tornam o sLITi um promissor inseticida, é válido ressaltar que são raros os relatos de estudos com enfoque de inibidores de protease sobre o desenvolvimento deste inseto (DE ARRUDA *et al.*, 2011). Já é relatado que os inibidores de proteases são capazes de potencializar o efeito tóxico das proteínas Cry obtidas de *Bacillus thuringiensis* sobre diferentes ordens de insetos, como Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). De acordo com Jeffers & Roe (2008), essa é uma das perspectivas mais promissoras para o uso desses inibidores no que concerne ao controle de insetos. O sLITi também apresentou atividade anticolinesterásica, indicando outro possível alvo para a sua atividade inseticida, que demanda mais estudos.

7. CONCLUSÃO

O sLTI obtido a partir de sementes de *Leucaena leucocephala* apresenta forte inibição de tripsina (superior a 90%) e características semelhantes aos inibidores do tipo Kunitz, pontes dissulfeto, massa molecular aparente de 20 kDa, termoestabilidade, resistência à ampla variação de pH e ao agente redutor DTT e ponto isoelétrico próximo a 4.

O sLTI apresenta atividade inibitória da eclosão dos ovos de *Aedes aegypti* e é capaz de inibir a atividade proteolítica presente no intestino médio das larvas em 56%, comprometendo o desenvolvimento e causando elevada taxa de mortalidade, sendo assim um potencial inseticida para essa espécie. Contudo mais estudos são necessários, como, por exemplo, a avaliação do efeito sinérgico do sLTI juntamente com as proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, n. 209, v. 3, p. 933-937, 1992.

ABE, M.; ARAI, S. Some properties of a cysteine proteinase inhibitors from corn endosperm. **Agricultural and Biological Chemistry**, n. 55, v. 9, p. 2417-2418, 1991.

ABE, M.; WHITAKER, J. R. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from the endosperm of corn. **Agricultural and Biological Chemistry**, n. 52, v. 1, p.1583-1588, 1988.

AGUIRREZABALA-CÁMPANO, M. T.; TORRES-ACOSTA, R. I.; BLANCO-LABRA, A.; MEDIOLA-OLAYA, M. E.; SINAGAWA-GARCÍA, S. R.; GUTIÉRREZ-DÍEZ, A.; TORRES-CASTILLO, J. A. Trypsin inhibitors in xoconostle seeds (*Opuntia joconostle* Weber.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** n. 1, v. 8, p. 1 – 8, 2012.

AKO, H.; FOSTER, R. J.; RYAN, C. A. The preparation of anhydro-trypsin and its reactivity with naturally occurring proteinase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. n. 47, v. 6, p. 1402–1407, 1972

AL-MUHANDIS, N.; HUNTER, P. R. The value of educational messages embedded in a community-based approach to combat dengue fever: a systematic review and meta regression analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, n. 5, v. 8, e1278, 2011.

ALTIZER, S.; BARTEL, R.; HAN, B. A. Animal migration and infectious disease risk. **Science**, n. 331, v. 6015, p. 296–302, 2011.

ANDERSON, M.; STEVENS, J.; DUNSE, K.; FOX, J.; EVANS, S. **Biotechnological Approaches for the Control of Insect Pests in Crop Plants**. Pesticides – Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech, 2012.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C.R. Purification and biochemical characterization of a serine protease inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, p. 703–712. 2009.

BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. A Kunitz protease inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, n. 67, v. 3, p. 232–241. 2006.

BHAVANI, P.; BHATTACHERJEE, C.; PRASAD, D. T. Bioevaluation of Subabul (*Leucaena leucocephala*) proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera*. **Arthropod-Plant Interactions**, n. 1, v. 4, p. 255-261, 2007.

BIRK, Y. **Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering**. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-170. 2003.

BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, n. 54, v. 3, p. 202-219. 2002.

BOWN, D. P.; SON, H. S. W.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, n. 29, v. 3, p. 278–290. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 218-254, 1976.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n. 16, v. 4, p. 279-293, out. 2007

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. n. 37, v. 12, p. 1283–1290. 2007.

BROADIE, K. S.; BRADSHAW, W. E. Mechanisms of interference competition in the western treehole mosquito, *Aedes sierrensis*. **Ecological Entomology**, n. 16, v. 2, p. 145–154. 1991.

CAMPBELL, G. L.; HILLS, S. L.; FISCHER, M.; JACOBSON, J. A.; HOKE, C. H.; HOMBACH, J. M.; MARFIN, A. A.; SOLOMON, T.; TSAI, T. F.; TSU V. D.; GINSBURG,

A. S. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systemic review. **Bulletin of the World Health Organisation**, n.89, v. 10, p. 766–774, 2011.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, n. 40, v. 11, p.1515-1539. 2002.

CHAUDHARY, N. S.; SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A.K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, n. 69, v. 11, p. 2120-2126, 2008.

CHAVASSE, D.C.; YAP, H.H. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. Geneve:97.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**, Vol. II. Egg laying. Cabi, Wallingford. 1999

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, RJ, 1994, 228p.

CORREA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 13, v. 4, p.500-506, 2011

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica**, v.26, n.2, p.173-85, 2004.

CRUZ, A. C. B. **Purificação, caracterização e análise da atividade bioinseticida de um inibidor de sementes de catantua (*Piptadenia moniliformes*)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

CZAPLA, T. H.; LANG B. A. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Crysmelidae). **Journal of Economic Entomology**, n. 83, v. 6, p. 2480-2485. 1990.

DE ARRUDA, E. J.; ROSSI, A. P. L.; PORTO, K. R. D.; DE OLIVEIRA, L. C. S.; ARAKAKI, A. H.; SCHEIDT, G. N.; ROEL, A. R. Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 54, v. 3, p. 503-509, 2011.

DE LEO, F.; BONADE-BOTTINO, M. A.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology**, n. 118, v. 3, p. 997-1004, 1998.

EE, K. Y.; ZHAO, J.; REHMAN, A.; AGBOOLA, S. O. Purification and characterization of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Benthams seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 57, v. 15, p. 7022-7029, 2009.

ERLANGER, B. F.; KOLOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 95, v.2, p. 271-278, 1961.

ERLANGER, T.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. **Medical and Veterinary Entomology**, n. 22, v. 3, p. 203–221. 2008.

FOCKS, D. A.; HAILE, D. G.; DANIELS, E.; MOUNT, G. A. Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) simulation results and validation. **Journal of Medical Entomology** n. 30, v. 3, p.1018–1028. 1993.

FOSSIER, P.; BAUX, G.; TAUE, L. Fasciculin II, a protein inhibitor of acetylcholinesterase, tested on central synapses of aplysia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, n. 6, v. 2, 1986.

FOSTER W.A.; WALKER E.D. Mosquitoes (Culicidae) In: MULLEN, G.; DURDEN, L. (Eds.). **Medical and veterinary entomology**. London: Academic, 2002. p. 203-262.

GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. **The Protein Journal**, n. 23, v. 5, p. 343–350. 2004.

GATEHOUSE, L. N.; SHANNON, A. L.; BURGESS, E. P.; CHRISTELLER, J. T. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 27, v. 11, p. 929-944, 1997.

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÈGUE, MH.; JOUANIN, L. High level of resistance to protease inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 28, v. 4, p. 229–237. 1998.

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

GONZÁLEZ, C.; WANG, O.; STRUTZ, S. E.; GONZÁLEZ-SALAZAR, C.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; SARKAR, S. Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 4, v. 1, e585, 2010.

GOVINDARAJAN, M. Mosquito larvicidal and ovicidal activity of *Cardiospermum halicacabum* Linn. (Family: Sapindaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus* (say.) and *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 15, v. 7, p. 787 -794, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; KARUPPANNAN, P. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. 4, v. 1, p. 24–28. 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998b.

GUBLER, D. J. Ressurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging Infectious Diseases Journal.**, v. 4, n. 3, p. 442-450, 1998a.

GUBLER, D.; CLARK, G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 50, v. 6, p. 50–60. 1994

GÜRTLER, R. E.; GARELLI, F. M.; COTO, H. D. Effects of a five-year citywide intervention program to control *Aedes aegypti* and prevent dengue outbreaks in northern Argentina, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 3, v. 4, e427, 2009.

HANSEN, D.; MACEDO-RIBEIRO, S.; VERÍSSIMO, P.; IM, S.Y.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.V. Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 360, v. 4, p. 735–740. 2007.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 431, v. 1, p 145-159. 2004.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. **Journal of Medical Entomology**, n. 38, v. 3, p. 411-422. 2001.

HAWLEY, W. A. The effect of larval density on adult longevity of a mosquito, *Aedes sierrensis* epidemiological consequences. **Journal of Animal Ecology** n. 54, v. 3, p. 955–964. 1985.

HILL, C. A.; KAFATOS, F. C.; STANSFIELD, S. K.; COLLINS, F. H. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. **Nature Reviews Microbiology**, n. 3, v. 3, p. 262–268, 2005.

HOTEZ, P. J. Neglected infections of poverty in the United States of America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 2, v. 6, e:256, 2008.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, n. 357, v. 10, p. 1018–1027, 2007.

HOUGHTON, P.; REN, Y.; HOWES, M. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, n. 23, v. 2, p. 181 - 199, 2006.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-608, 2000.

JABER, K.; HAUBRUGE, E.; FRANCIS, F. Development of entomotoxic molecules as control agents: illustration of some protein potential uses and limits of lectins (Review) **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** n. 14, v. 1, p. 225-241, 2010.

JACINTO, T.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin. **Plant Science**, v. 138, n.1, p. 35-42, 1998.

JEFFERS, L. A.; ROE, R. M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. **Journal of insect physiology**, n. 54, p. 319-332, 2008

JOSHI, V.; SHARMA, R.C. Impact of vertically-transmitted dengue virus on viability of eggs of virus-inoculated *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin.**, n. 25, p. 103-106, 2001.

KIM, S.I.; ROH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S. AHN, Y. J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, n.39, v. 3, p.293-303, 2003.

KLUH, I.; HORN, M.; HÝBLOVÁ, J.; HUBERT, J.; DOLECKOVÁ-MARESOVÁ, L.; VOBURKA, Z.; KUDLÍKOVÁ, I.; KOCOUREK, F.; MARES, M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, n. 66, v.1, p. 31-39, 2005.

KONDO, H.; ABE, K.; NISHIMURA, I.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Two distinct cystatin in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 265, v. 26, 15832–15837, 1990.

KOUZUMA, Y.; INANAGA, H.; DOI-KAWANO, K.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine proteinase

inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds. **Journal of Biochemistry**, n. 128, v. 2, p. 161-166, 2000.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; K. V. BHASKARA RAO.; KIRTHI, A. V.; RAHUMAN, A. A. Larvicidal, repellent and ovicidal activity of *Calotropis gigantea* against *Culex gelidus*, *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) **Journal of Agricultural Technology**. n. 8, p. 869-889, 2012.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**. n. 30, v. 4, p. 291–310, mar. 1947.

KUNZ, P. A. Resolution, properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry** n. 8, p. 43–51, 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, ago. 1970.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 30, v. 1, p. 85–94. 2000.

LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. **Journal of Molecular Biology**. n. 239, v. 2, p. 276-284. 1994.

LIN, P.; NG, T.B. A stable trypsin inhibitor from Chinese dull black soybean with potentially exploitable activities. **Process Biochemistry** , n. 43, v. 9, p. 992-998, 2008.

LINGARAJU, M. H.; GOWDA, L. R. A. Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1784, v. 5, p. 850–855. 2008.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n. 73, v. 4, p. 213–231, 2010.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, n. 68, v. 8, p. 1104–1111, 2007.

MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 40, v. 10, p. 891-898. 2002.

MACEDO, M. L. R.; PANDO, S. C.; CHEVREUIL, L. R.; MARANGONI, S. Properties of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds against digestive proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Protein and Peptides Letters**, n. 16, v. 12, p. 1459 - 1465. 2009.

MARICOPA COUNTY ENVIRONMENTAL SERVICES. Life Cycle and Information on *Aedes aegypti* mosquitoes disponível em <<http://www.maricopa.gov/EnvSvc/VectorControl/Mosquitos/MosqInfo.aspx>> acessado em 21 jan. 2013.

MARIMUTHU, G.; RAJAMOHAN, S.; MOHAN, R.; KRISHNAMOORTHY, Y. Larvicidal and ovicidal properties of leaf and seed extracts of *Delonix elata* (L.) Gamble (family: Fabaceae) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston) and dengue (*Aedes aegypti* Linn.) (Diptera: Culicidae) vector mosquitoes. **Parasitology Research**. n. 111, v. 1, p. 65- 77, 2012.

MELLO, G. C. **Estudo dos papéis biológicos de dois inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* BENTH: Atividades inseticidas e inflamatória**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MELLO, G. C.; OLIVA, M. L. V.; SUMIKAWA, J. T.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds, **Journal of Protein Chemistry**, n. 20, v. 8, p. 625–632. 2001.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; SALES, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, n. 29, v. 2, p. 148-156, 2010.

MORRISON, S. C.; SAVAGEA, G. P.; MORTONA, J. D.; RUSSELLB, A. C. Identification and stability of trypsin inhibitor isoforms in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in New Zealand. **Food Chemistry**. n. 100, v. 1, p. 1-7, 2007.

MULLAI, K.; JEBANESAN, A. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of the leaf extract of two cucurbitaceous plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae). **Tropical Biomedicine**. n. 24, v. 1, p 1-6, 2007.

OLIVA, M. L.; SILVA, M. C.; SALLAI, R. C.; BRITO, M. V.; SAMPAIO, M. U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie**. n. 92, v. 11, p. 1667-1673. 2010.

OLIVA, M. L.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F.; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 1477, v. 1-2, p. 64-74, 2000.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, L. L.; ANDRADE, L. B.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**. n. 45, v. 10-11, p. 858-865, 2007a.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, L. L.; ANDRADE, L. B.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. n. 55, v. 18, p. 7342-7349, 2007b.

OPPERT, B.; MORGAN, T. T. D.; HARTZER, K.; KRAMER, K. J. Compensatory proteolytic responses to dietary protease inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, n. 140, p. 53–58. 2005.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Malaria key facts. Washington DC, 2012. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2573&Itemid=2060>. Acessado em: 12 dez. 2012.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, n. 30, v. 3, p. 589-595. 2009.

PEDRINI, M. R.; REID, S.; NIELSEN, L. K.; CHAN, L. C. Kinetic characterization of the group II *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus propagated in suspension cell cultures: implications for development of a biopesticides production process. **Biotechnology Progress**, n. 27, v. 3, p. 614–624, 2011.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, n. 109, v. 2, p. 347-352, 1995.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 23–29. 2006.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; DIAS DE ASSIS, C. R.; DE SOUZA BEZERRA, R.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Effect of Moringa oleifera flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n. 79, v. 3, p. 135-152. 2012.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman–Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 98, v. 1, p. 80-88, 2010.

PRATES, H. T.; PAES, J. M. V.; PIRES, N. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de Leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

RACLOZ, V.; RAMSEY, R.; TONG, S.; HU, W. Surveillance of dengue fever virus: a review of epidemiological models and early warning systems. **PLoS. Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, e1648, 2012.

RAMOS, V. S.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P.; MACEDO, M. L. R. Regulator y effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology A.**, n. 152, v. 2, p. 255–261, 2009.

RAMOS, V.S. **Efeito de um inibidor de tripsina de sementes de *Plathymenia foliolosa* sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Anagasta kuehniella*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional) - Universidade Estadual de Campinas, 2008.

RASCALOU, G.; PONTIER, D.; MENU, F.; GOURBIÈRE, S. Emergence and prevalence of human vector-borne diseases in sink vector populations. **PLOS ONE**, n. 7, v. 5, e36858, 2012.

REGNAULT-ROGER, C.; STAFF, V.; PHILOG`ENE, B.; TERR ´ON, P.; VINCENT, C. **Biopesticidas de Origen Vegetal.** Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2004.

REIS, J. B. C. **Composição químico-bromatológica de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e de Pau-Ferro (*Caesalpinia férrea* Mart.) em três alturas de corte.** 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2001.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environmental Health Perspectives**, n. 109, v. 1, p. 141–161, 2001.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 4ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011. 410 p.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, n. 915, p. 217–223, 2001.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, n. 7, v. 1, p. 17-23. 2001.

RUDIGER H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, n. 18, v. 8, p. 589-613. 2001.

SANTOS, N. D.; DE MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G.K.; COELHO, L.C.; NAVARRO, D.M.; PAIVA, P. M. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**. n.7, v. 9, e44840, 2012.

SAUVION, N.; NARDON, C.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A. M.; RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, n. 50, v. 12, p. 1137 -1150, 2004.

SAUVION, N.; RAHBÉ, Y.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME E.J.M.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the potato-peach aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 79, v.3, p. 285-293, 1996.

SAWANO, Y.; HATANO, K.; MIYAKAWA, T.; KOMAGATA, H.; MIYAUCHI, Y.; YAMAZAKI, H.; TANOKURA, M. Proteinase inhibitor from ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. **Plant Physiology**, n.146, v. 4, p. 1909-1919, 2008.

SHAHIDI-NOGHABI, S.; VAN DAMME, E. J. M.; SMAGGHE, G. Expression of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-IO) from elderberry bark in transgenic tobacco plants results in enhanced resistance to different insect species. **Transgenic Research**, n. 18, v. 2, p. 249-259. abr. 2009.

SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMED, F.; SHARMA, A. K., Structure-function studies of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor revealed a stable core beta sheet structure surrounded by α -helices with a possible role for α -helix in inhibitory function. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 41, v. 4, p.410 - 414, out. 2007.

SHEE, C.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from seeds of *Murraya koenigii*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, n. 22, v. 1, p. 115–120, 2007.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G.H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 84, v. 2, p. 200-207, 2011.

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

SILVA, J.A. **Aspectos estruturais, funcionais e conformacionais do inibidor de tripsina CTI de sementes de *Copaifera langsdorffii***. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SKAU, K.A.; SHIPLEY, M. T. Phenylmethylsulfonyl fluoride inhibitory effects on acetylcholinesterase of brain and muscle. **Neuropharmacology**. n. 38, v. 5, p. 691-698. mai. 1999

SMITH, C.M.; BOYKO, L.V. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 122, v. 1, p. 1-16, 2006.

SOUZA-PINTO, J. C.; OLIVA, M. L.; SAMPAIO, C. A.; DAMAS, J.; AUERSWALD, E. A.; LIMÃOS, E.; FRITZ, H.; SAMPAIO, M. U. Effect of a serine proteinase inhibitor from *Leucaena leucocephala* on plasma kallikrein and plasmin. **Immunopharmacology**. n. 33, v. 1, p. 330 -332, jun. 1996.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A., WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, n. 67, v. 15, p.1644–1650, 2006.

TENG, H.; APPERSON, C. S. Development and survival of immature *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in the laboratory: effects of density, food, and competition on response to temperature. **Journal of Medical Entomology** n. 37, v. 1, p. 40-52. 2000.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, n. 109, v. 1, p. 1–62. 1994.

TORRES-CASTILLO, J. A.; MONDRAGÓN JACOBO, C.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a highly stable trypsin-like protease inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). **Phytochemistry**, n. 70, v. 11, p. 1374-1381. 2009.

TRIGUEROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANT, L.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 1621, v. 3, p. 292-298, jun. 2003.

TSOI, A. Y. K.; WONG, R. C. H.; NG, T. B.; FONG, W. P. First report on a potato I family chymotrypsin inhibitor from the seeds of a Cucurbitaceous plant, *Momordica cochinchinensis*. **Biological Chemistry**, n. 385, v. 2, p. 185-189, 2004.

TURINI, P.; KUROOKA, S.; STEER, M.; CORBASCIO, A. N.; SINGER, T. P. The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 167, v. 1 98-104, 1969.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; KLADNITSKAYA, G. V.; MOSOLOV, V. V. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. **FEBS Letters**, n. 426, v. 1, p. 131-134, 1998.

VAN DEN BERG, H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, n. 16, v. 12, p. 575–590, 2011.

VENANCIO, T. M.; CRISTOFOLETTI, P. T.; FERREIRA, C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; TERRA, W. R. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. **Insect Molecular Biology**, n. 18, v. 1, p. 33–44, 2009.

WALISZEWSKI, S. M.; GOMEZ-ARROYO, S.; INFANZON, R. M.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; HART, M. M. Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 71, v. 1, p. 156 – 162. 2003.

WARE, G.W.; WHITACRE, D.M. **An Introduction to Insecticides**. 4th edition. Willoughby, Ohio: MeisterPro Information Resources, 2004, pp. 225-247.

WONG, R. C.; FONG, W. P.; NG, T. B. Multiple trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* seeds, the Chinese drug mubiezhi. **Peptides**. n. 25, v. 2, p. 163-169, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Washington DC, 2012. Dengue media centre: Dengue and Haemorrhagic Fever. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> acessado em: 07 jan. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Washington DC, 2012. World malaria report. Geneva, Switzerland: World Health Organisation. Disponível <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/> acessado em: 18 dez. 2012.

WRIGHT, C. I.; GEULA, C.; MESULAM, M. M. Protease inhibitors and indoleamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer disease. **Neurobiology**. n. 90, v. 2, p. 683-686, 1993.

WU, Y.; LLEWELLYN, D.; MATHEWS, A.; DENNIS, E. S. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. **Molecular Breeding** n. 3, v. 5, p. 371-380, 1997.