



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

ANTONIO VINÍCIUS DE SOUZA RODRIGUES

**PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E
ANTIMICROBIANO DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE *Dioclea megacarpa* Rolfe**

FORTALEZA

2026

ANTONIO VINÍCIUS DE SOUZA RODRIGUES

**PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E
ANTIMICROBIANO DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE *Dioclea megacarpa* Rolfe**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho

FORTALEZA

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R611p Rodrigues, Antonio Vinícius de Souza.
Purificação e avaliação do potencial larvicida e antimicrobiano de um inibidor de protease de *Dioclea megacarpa* Rolfe / Antonio Vinícius de Souza Rodrigues. – 2026.
38 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2026.

Orientação: Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.

1. Arboviroses. 2. *Aedes aegypti*. 3. Mucunã. I. Título.

CDD 570

ANTONIO VINÍCIUS DE SOUZA RODRIGUES

**PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E
ANTIMICROBIANO DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE *Dioclea megacarpa* Rolfe**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 14/01/2026

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Ticiane Monteiro Abreu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e aos **meus guias**, que me provam, todos os dias, que não existem caminhos fechados para quem está determinado a trilhá-los. Laroyê, Exu!

À minha mãe, **Gislane Gomes de Souza**, por ser o maior exemplo de força e amor que eu poderia ter, por nunca desistir de mim e por se doar tanto em prol de todos ao seu redor, inclusive eu. Por me ensinar, dia após dia, que as dificuldades da vida nunca devem pesar mais no coração do que a nossa vontade de vencer. Tudo o que eu faço é pela senhora.

À minha irmã, **Letícia Souza de Carvalho**, por me escutar tagarelar incessantemente sobre assuntos que ela (ainda) não entende, por todo o seu entusiasmo e brilho que iluminam minha vida dia após dia. Você é uma flor linda e eu adoro ver você crescer!

À minha falecida avó, **Arizan Gomes de Souza**. Sua luz brilha, sem descanso, no coração de todos que tiveram a alegria de lhe conhecer, e eu gosto de pensar que brilha de um jeitinho especial através de mim. Todo grande passo que eu dou é acompanhado da falta do teu sorriso meigo e do aconchego do teu abraço. Espero estar lhe honrando, vózinha.

Aos amigos que fiz na faculdade e, com sorte, levarei pra vida: **Iasmim Medeiros, José Mailton, Ramon Vasconcelos, Thayná Vasconcelos e Eduarda Ricarte**. Obrigado por todas as risadas, memórias e momentos de alegria que construímos, vocês foram uma força motriz na minha caminhada. Que as dores da vida não nos torne amargos.

À minha professora orientadora, **Marina Duarte Pinto Lobo**, por ser um exemplo de pessoa e de educadora. Por me acolher sem hesitação desde o primeiro momento, entender as dificuldades que a vida nos traz e me assegurar de que as coisas mudariam para melhor. Por não desistir do meu projeto e nem de mim, e por fazer tudo isso com o sorriso mais brilhante de todos. Obrigado por tudo, Marina. Se a vida me levar para o caminho da educação, espero marcar pelo menos um coração como a senhora marcou o meu.

Ao meu co-orientador, **Luiz Carlos Pereira Almeida Filho**, por ter se tornado, também, um amigo. Pela paciência ao me ensinar os cálculos assustadores e as minúcias de pipetagem e organização de laboratório. Pelo entusiasmo ao conversar sobre plantas, animes, séries, filmes e músicas. Por todo o companheirismo, broncas e longas conversas, fica aqui o meu muito obrigado. Seus ensinamentos (científicos ou não) vão ficar comigo pra sempre!

Aos membros do **Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais**, obrigado pela companhia, cumplicidade, contribuições acadêmicas e inúmeras conversas que tivemos nas horas aparentemente infinitas de laboratório. Todo sucesso para vocês!

Ao Prof. Dr. **Carlos Eduardo Tolussi** e à Profa. Dra. **Erika Freitas Mota**, por sua contribuição valiosa de conhecimento e alegria nos dias de laboratório.

Aos membros da banca avaliadora da minha defesa, **Dr. Pedro Matheus Sousa Tabosa** e **Dra. Ticiano Monteiro Abreu**, por toda a sua disponibilidade e cordialidade durante o processo, sua contribuição foi fundamental para a minha formação.

Ao **Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC)**, pela contribuição indispensável para a realização dos ensaios de atividade bactericida e fungicida.

RESUMO

Doenças transmitidas por insetos vetores são um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. No Brasil, o mosquito *Aedes aegypti* causa a maior preocupação, sendo responsável por transmitir doenças como Dengue, Zika e Chikungunya. Os métodos de prevenção contra esse e outros insetos se concentram, principalmente, no uso de químicos sintéticos, que possuem um longo e preocupante histórico relacionado a riscos contra a saúde humana, desequilíbrio ambiental e surgimento de populações de vetores resistentes. Sendo assim, os bioinseticidas aparecem como uma solução sustentável e segura para o problema. Dentro dessa classe, alguns dos bioinseticidas mais explorados são os bioativos extraídos de plantas, a exemplo dos inibidores de protease, encontrados comumente em famílias como *Fabaceae*, *Cucurbitaceae* e *Solanaceae*. Desta forma, o objetivo do trabalho foi purificar e avaliar o potencial larvicida e antimicrobiano de um inibidor de protease oriundo de *Dioclea megacarpa*. Para determinação inicial de perfil proteico, o extrato bruto (EbDM), obtido a partir de extração contra Tampão Tris HCL 50mM pH 7.5, foi fracionado com ácido tricloroacético (TCA) 20% e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a determinação da melhor fração (DmF5), o isolamento do inibidor se deu através de cromatografia de afinidade à tripsina, apenas a amostra retida na coluna (RDmF5) foi selecionada para posteriores testes. Os testes de inibição de tripsina apresentaram valores muito promissores, chegando a alcançar uma medida de atividade inibitória específica de 25.569,80 UI/mg. Ademais, os testes de atividade inibitória sobre proteases intestinais de *Aedes aegypti* apresentaram 20% de inibição na menor concentração (0,234 ug/mL), e alcançaram até 53% em ensaios com 1,872 ug/mL. Nos ensaios de atividade antimicrobiana, diferentes concentrações de RDmF5 e NRDMF5 foram utilizadas contra cepas de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp., e não apresentaram concentração inibitória mínima satisfatória. Esses dados mostram a eficácia do inibidor de protease isolado de *Dioclea megacarpa* como agente larvicida, sugerindo seu potencial uso como bioinseticida, e demonstra sua ineficácia como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Arboviroses, *Aedes aegypti*, mucunã.

ABSTRACT

Vector-borne diseases are one of the major public health problems in the world. In Brazil, the *Aedes aegypti* mosquito causes great concern, being responsible for transmitting diseases such as Dengue, Zika, and Chikungunya. Prevention methods against this and other insects focus mainly on the use of synthetic chemicals, which have a long and worrying history related to risks against human health, environmental imbalance, and the emergence of resistant vector populations. Therefore, bioinsecticides appear as a sustainable and safe solution to the problem. Within this class, some of the most explored bioinsecticides are bioactive compounds extracted from plants, such as protease inhibitors, commonly found in families such as *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, and *Solanaceae*. Thus, the objectives of the present work focused on the purification and evaluation of the larvicidal and antimicrobial potential of a protease inhibitor derived from *Dioclea megacarpa*. For initial protein profile determination, the crude extract (EbDM), obtained through extraction with buffer Tris HCl 50 mM pH 7.5, was fractionated with 20% trichloroacetic acid (TCA) and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After determining the best fraction (DmF5), the isolation of the inhibitor was given through trypsin affinity chromatography, where only the sample retained in the column (RDmF5) was selected for subsequent tests. The trypsin inhibition tests showed very promising values, reaching a specific inhibitory activity measurement of 25,569.80 IU/mg. Furthermore, inhibitory activity tests on the midgut proteases of *Aedes aegypti* showed 20% inhibition at the lowest concentration (0,234 ug/mL), reaching up to 53% in assays with 1,872 ug/mL. As for antimicrobial activity essays, different concentrations of RDmF5 and NRDMF5 were used against *Candida spp.* and *Staphylococcus spp.* strains, and they did not show a satisfactory minimum inhibitory concentration. These data show the efficacy of the proteinase inhibitor isolated from *Dioclea megacarpa* as a larvicidal agent, suggesting its potential use as a bioinsecticide, and demonstrate its inefficiency as an antimicrobial agent.

Keywords: Arboviruses, *Aedes aegypti*, mucunã.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DmF5	Fração de <i>Dioclea megacarpa</i> com adição de 5% de TCA
EBDm	Extrato bruto de <i>Dioclea megacarpa</i>
NRDmF5	Fração não retida de DmF5
RDmF5	Fração retida de DmF5
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Atividade inibitória de tripsina dos passos de purificação a partir de 1,23 g de farinha de *D. megacarpa*.

Tabela 2: Avaliação do efeito antifúngico do RDMF5 e do NRDMF5 frente a isolados de *Candida* spp.

Tabela 3: Avaliação do efeito antibacteriano do RDMF5 e do NRDMF5 frente a isolados de *S. aureus*.

Figura 1 - Mapa das regiões mais suscetíveis a surtos endêmicos de Dengue

Figura 2 - Distribuição geográfica dos sorotipos da dengue na região das Américas

Figura 3 - Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

Figura 4 - Vagem de *Dioclea megacarpa*

Figura 5 - Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%.

Figura 6 - Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da fração proteica de sementes de *Dioclea megacarpa* fracionada em ácido tricloroacético (TCA) 5% (DmF5) solubilizada em tampão Tris-HCl.

Gráfico 2 - Correlação entre o perfil cromatográfico de DmF5 e a atividade residual de tripsina.

Gráfico 3: Atividade inibitória percentual das diferentes concentrações de RDmF5 (5, 10, 20 e 40 uL) utilizadas em ensaio de inibição das proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Insetos vetores de doenças.....	13
1.2 Arboviroses.....	14
1.2.1 Considerações gerais.....	14
1.2.2 Vetores e ciclo de vida.....	16
1.3 Controle de insetos.....	18
1.3.1 Inseticidas químicos.....	18
1.3.2 Resistência a inseticidas químicos.....	19
1.4 Moléculas de interesse.....	20
1.4.1 Inibidores de proteases.....	20
1.4.2 Moléculas antimicrobianas.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Obtenção do extrato proteico de <i>Dioclea megacarpa</i>	24
3.2 Fracionamento de extrato bruto de <i>Dioclea megacarpa</i>	24
3.3 Dosagem de proteínas.....	24
3.4 Cromatografia em coluna de tripsina.....	25
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
3.6 Testes de atividade inibitória de tripsina.....	25
3.7 Bioensaios.....	26
3.7.1 Avaliação da atividade inibitória in vitro das frações de <i>Dioclea megacarpa</i> sobre as proteases intestinais de <i>Aedes aegypti</i>	26
3.7.2 Ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1 Purificação de DmF5.....	28
4.2 Tabela de Purificação.....	30
4.3 Bioensaios.....	32
4.3.1 Atividade inibitória in vitro sobre proteases intestinais de <i>Aedes aegypti</i>	32
4.3.2 Atividade bactericida e fungicida.....	33
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos vetores de doenças

Doenças transmitidas por vetores são infecções causadas por patógenos, cuja transmissão ocorre por artrópodes tais como mosquitos, pulgas, carrapatos, triatomíneos, entre outros (Wilson *et al.*, 2020). Estes animais podem ser classificados como vetores biológicos, que carregam os patógenos dentro de seus corpos e os transmitem a outros organismos através de mordidas ou picadas, a exemplo dos mosquitos, ou como vetores mecânicos, como as moscas, que carregam os patógenos na superfície de seu corpo e os transmitem através do contato com os hospedeiros (Sarwar, 2015).

Muitos dos insetos vetores responsáveis pela transmissão de doenças têm seu ciclo de vida fortemente ligado ao ambiente urbano. O avanço da globalização nos últimos anos tem grande impacto nisso, visto que a gestão de lixo nas cidades não conseguiu acompanhar a escalada vertiginosa da produção de descartes sólidos como latas, garrafas plásticas e outros materiais de longa duração como pneus. O descarte incorreto destes produtos leva ao aumento do número de esconderijos e locais de reprodução para insetos como os mosquitos do gênero *Aedes*, conhecidos por sua preferência em se estabelecerem em áreas com acúmulo de lixo humano (Krystosik *et al.*, 2019). No Brasil, o histórico de *Ae. aegypti* revela uma grande dificuldade no que tange ao seu controle, visto que a espécie apresenta hábitos antropofílicos e uma alta capacidade de adaptação aos ambientes urbanos (Terra *et al.*, 2017).

O controle de insetos vetores se sustenta, principalmente, em três estratégias principais, focadas nos controles biológico, mecânico e químico. Este último, visto como um dos mais eficazes inicialmente, vem apresentando uma perda de eficácia devido ao aumento alarmante da resistência a inseticidas em algumas populações de insetos (Shaw; Catteruccia, 2019). Para além disso, casos de sintomas adversos em humanos como vômitos, tremores e até convulsões podem ser atribuídos ao uso reiterado e indiscriminado de substâncias químicas ao longo dos anos. Desta forma, pesquisadores vêm buscando alternativas aos componentes tradicionais como forma de reduzir os riscos aos organismos não-alvo sem perder a eficácia no combate aos insetos vetores de doenças (Hillary; Ceasar; Ignacimuthu, 2024).

1.2 Arboviroses

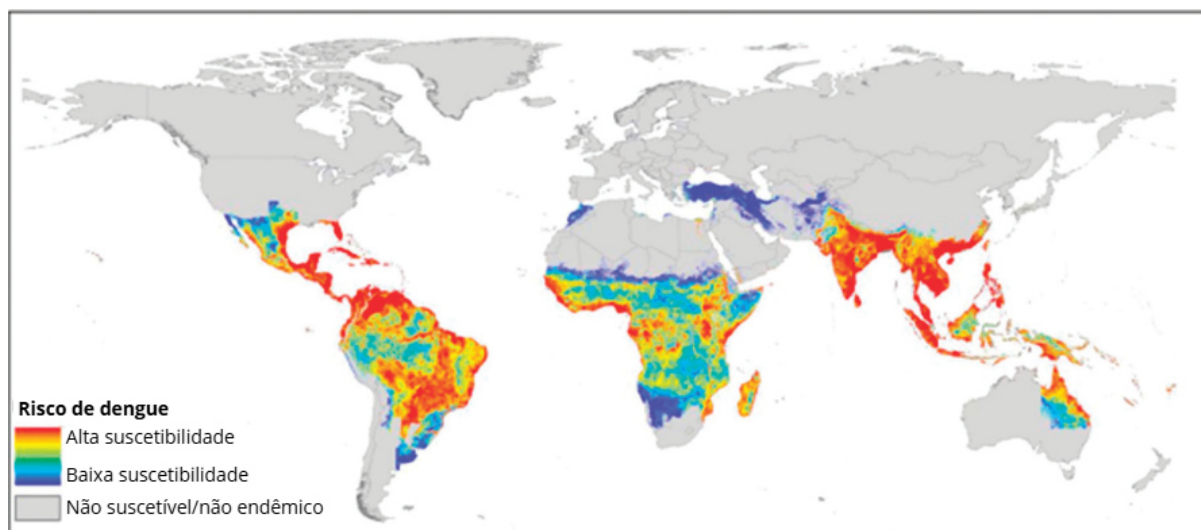
1.2.1 Considerações gerais

Doenças infecciosas representam um sério problema de saúde pública, não somente nas Américas, como no resto do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças transmitidas por vetores artrópodes, denominadas arboviroses, representam mais de 17% das doenças infecciosas ao redor do mundo, somando mais de 700.000 mortes anualmente. Algumas destas doenças se encaixam no conceito de doenças tropicais negligenciadas, que são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas, e consideradas endêmicas em populações de baixa renda (Hotez *et al.*, 2007). Até o ano de 2025, surtos de dengue vêm afetando populações, causando mortes e sobrecarregando o sistema de saúde de regiões como o Brasil, que registrou mais de 1 milhão de casos da doença no ano referido, de acordo com a OMS.

Arbovírus são vírus transmitidos por vetores artrópodes, como os mosquitos, que pertencem à família *Culicidae*, a qual abriga cerca de 3.500 espécies, distribuídas em 41 gêneros (Xia *et al.*, 2018). Os arbovírus patogênicos para seres humanos podem ser classificados em famílias, sendo elas: *Togaviridae*, *Bunyaviridae* e *Flaviviridae*, e podem causar diversas doenças, algumas delas amplamente conhecidas, como a dengue, a zika, a chikungunya e a febre amarela. (Braack *et al.*, 2018).

A dengue é transmitida pelas espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* em mais de 100 países ao redor do mundo, com predominância em países próximos à linha do Equador (Figura 1). Esse vírus possui 4 sorotipos, e os seres humanos desenvolvem imunidade somente contra o tipo pelo qual foram infectados (Figura 2). Seus sintomas incluem febre, manchas avermelhadas pelo corpo e sintomas gastrointestinais nos casos mais brandos. Em casos graves, pode causar hemorragia, falha de órgãos e até a morte (Lee *et al.*, 2018).

Figura 1 - Mapa das regiões mais suscetíveis a surtos endêmicos de Dengue.



Fonte: Adaptado de Das *et al.*, 2021

Figura 2 - Distribuição geográfica dos sorotipos do vírus da dengue na região das Américas.

Sorotipo	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
Países				
Argentina	●	●	●	
Bolivia	●	●		
Brazil	●	●	●	●
Costa Rica	●	●	●	●
Cuba			●	●
El Salvador	●	●	●	●
Guiana Francesa		●	●	
Guadalupe			●	
Guatemala	●	●	●	
Honduras	●		●	
Mexico	●	●	●	●
Panama	●	●	●	●
Paraguay	●	●	●	
Peru	●	●	●	
Porto Rico	●	●	●	●

Fonte: Adaptado de PAHO, 2025

A zika e a chikungunya, arboviroses em alta no Brasil, não são comumente fatais, entretanto, são responsáveis por diversas complicações. A zika, por exemplo, apresenta uma taxa de 10 a 15% de alterações congênitas em neonatos, principal razão pela qual seu

combate é visado pelos órgãos responsáveis (Ministério da Saúde, 2019). Quanto à chikungunya, a maior preocupação está atribuída ao número expressivo de infectados que desenvolvem artralgia debilitante após o período de infecção, que pode chegar a 90% (Lee *et al.*, 2018).

Os dados referentes à febre amarela sofrem com severa subnotificação, o que dificulta o entendimento sobre a doença e sua disseminação, de acordo com a OMS (Monath; Vasconcelos, 2015). Entretanto, sabe-se que a taxa de mortalidade dos infectados que desenvolvem a fase grave da doença pode variar entre 40 e 60% (Lee *et al.*, 2018).

O risco do surgimento e ressurgimento de arbovírus com potencial pandêmico cresceu, e tende a continuar crescendo nos anos seguintes, visto que o alcance geográfico destes vírus continuará aumentando graças a fatores como a migração, a urbanização, a adaptação dos mosquitos vetores devido às mudanças climáticas e o crescimento descontrolado de suas populações (OMS, 2024).

1.2.2 Vetores e ciclo de vida

Os mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são vetores de interesse médico em todo o mundo, responsáveis pela transmissão de doenças como dengue, zika e chikungunya, que tem um impacto significativo no número de mortes anuais por infecções transmitidas por vetores (Leta *et al.*, 2017). O mosquito *Ae. aegypti* apresenta alta capacidade de adaptação ao meio urbano, tanto dentro das residências, em ralos e caixas d'água, como também nos arredores, utilizando-se de recipientes como copos e garrafas plásticas, tampas, sacolas, e outros como pneus, vasos, tanques e poços, que promovem o acúmulo de água parada, o que é ideal para a oviposição destes insetos (Terra *et al.*, 2017). Já a espécie *Ae. albopictus* apresenta, ainda, preferência por resíduos sólidos, cocos abertos e pequenos recipientes plásticos, além dos supracitados, criando uma sobreposição de habitats para essas duas espécies (Krystosik *et al.*, 2019).

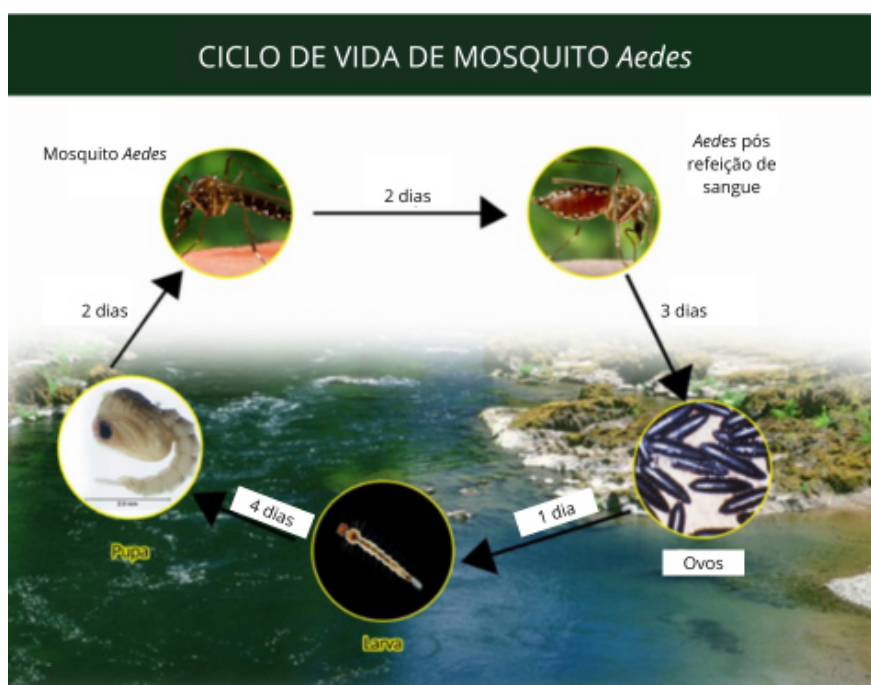
Sabe-se que, apesar de muitas semelhanças observadas no que diz respeito aos hábitos de vida, as espécies têm origens diferentes. *Ae. albopictus* é, conhecidamente, originária das florestas tropicais do Sudeste da Ásia (Benelli *et al.*, 2020), enquanto o *Ae. aegypti* se originou — e ainda tem seus ancestrais — na região da África subsaariana (Powell *et al.*, 2013).

Especula-se que essas espécies, assim como muitas outras, espalharam-se pelo mundo

durante o período das Grandes Navegações, em navios onde as condições para sua permanência eram abundantes (Powell *et al.*, 2013). Com o passar do tempo, essas espécies se distribuíram ao redor do mundo, sendo encontradas principalmente nos trópicos, com presença limitada apenas em regiões da Europa, Norte da América e da Ásia, devido a fatores como o clima que são determinantes para sua sobrevivência e reprodução (Leta *et al.*, 2018).

Os indivíduos da espécie *Ae. aegypti* são considerados holometábolos, pois passam pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto, completando seu ciclo de vida num período entre 10 a 15 dias (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado de Anoopkumar *et al.*, 2017

Na fase adulta, diferente dos machos que se alimentam apenas da seiva de plantas, as fêmeas se alimentam também de sangue e, conseqüentemente, transmitem as doenças (Silva *et al.*, 2025). Para sustentar essa dieta, os mosquitos contam com um arsenal responsável pela digestão dos componentes sanguíneos, principalmente no intestino médio, a exemplo de enzimas serínicas como a tripsina e a quimotripsina (Noriega *et al.*, 2002), alvos principais dos bioinseticidas que vêm sendo desenvolvidos.

Após a cópula, as fêmeas produzem entre 100 e 200 ovos por ciclo reprodutivo, dependendo da quantidade de sangue ingerido. Os ovos são depositados em superfícies

úmidas, geralmente em locais inundáveis, como buracos de árvores e recipientes artificiais, como copos, garrafas, tampinhas e demais resíduos sólidos. Os ovos são postos individualmente e espalhados em diferentes locais. As larvas se desenvolvem em 4 estádios (L1-L4), sendo o último o mais longo, cerca de 3 dias, e caracterizado por intensa alimentação (Das *et al.*, 2018). Esta é, geralmente, a fase escolhida como alvo para as estratégias de controle, visto que seu deslocamento é limitado ao recipiente em que se encontra e seu hábito filtrador impossibilita a seletividade alimentar, tornando-a suscetível a componentes químicos depositados na água (Nawarathne; Dharmarathne, 2024).

1.3 Controle de insetos

1.3.1 Inseticidas químicos

Em vista dos problemas de saúde ocasionados por espécies vetoras, do aumento em nível global de sua distribuição — principalmente de *Ae. aegypti* — e também da escalada da atividade do vírus da dengue (Manjarres-Suarez; Olivero-Verbel, 2013), estratégias de controle vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas visando reduzir suas populações e, conseqüentemente, diminuir os casos de doenças e mortes. No Brasil, o histórico de *Ae. aegypti* revela uma grande dificuldade no que tange ao seu controle, visto que a espécie apresenta hábitos antropofílicos e uma alta capacidade de adaptação aos ambientes urbanos (Terra *et al.*, 2017).

O controle de insetos vetores se sustenta, principalmente, em três estratégias principais, focadas em controle biológico, mecânico e químico. Este último, visto como um dos mais eficazes inicialmente, vem apresentando uma perda de eficácia devido ao aumento alarmante da resistência a inseticidas em algumas populações de vetores (Shaw; Catteruccia, 2019). Para além disso, casos de sintomas adversos em humanos como vômitos, tremores e até convulsões podem ser atribuídos ao uso reiterado e indiscriminado de substâncias químicas ao longo dos anos.

Um dos principais métodos utilizados no contexto do combate a insetos vetores é o controle químico. Este pode ser aplicado de três formas: com foco nas larvas, utilizado principalmente no ambiente doméstico por ser relativamente seguro; tratamento perifocal, que afeta ambos adultos e larvas; e por fim, um método emergencial conhecido como fumacê, que consiste na pulverização em larga escala (Manjarres-Suarez; Olivero-Verbel, 2013).

As classes de químicos utilizadas ao longo do tempo, como carbamatos e organofosforados, se mostraram altamente nocivas para a saúde humana devido a

características como baixa taxa de degradação, mecanismos de ação com influência no sistema nervoso, que acarretavam em sintomas leves como sudorese e dores de cabeça, até outros mais graves como paralisia e até a morte. Ao longo dos anos e das tentativas, a classe dos piretróides foi popularizada no combate a insetos vetores como uma alternativa segura e de fácil obtenção. Esses compostos eram, inicialmente, retirados de plantas da família *Fabaceae*, mas mais comumente das flores do crisântemo (*Chrysanthemum sp.*). Os extratos obtidos eram comercializados na forma de aerossol e spray, e costumavam ser formulados com a adição de um sinergista, a exemplo do butóxido de piperonila (PBO), visando o aumento da ação inseticida e retardar o processo de degradação dos compostos piretróides (Williams *et al.*, 2000).

1.3.2 Resistência a inseticidas químicos

No contexto do controle de espécies transmissoras, os inseticidas químicos são uma das táticas utilizadas mundialmente em conjunto com outras, como controle biológico e integrado, e campanhas de educação popular. Embora estes métodos tenham sido — e continuem sendo, em parte — importantes no combate aos insetos, o aumento no número de casos de dengue e outras arboviroses registrados nos últimos anos no Brasil e no mundo acende um alerta (PAHO, 2025). Esse aumento se dá por muitos fatores, e entre eles, o desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos compostos inseticidas como malathion, deltametrina e similares. O uso contínuo destes compostos induziu uma pressão em populações de *Ae. aegypti*, o que levou ao fenômeno (Manjarres-Suarez; Olivero-Verbel, 2013).

Dois mecanismos principais foram apontados como causa para o escape encontrado pelas espécies: um deles se resume no aumento da atividade de enzimas detoxificantes, como as esterases, oxidases como a citocromo P450 e a enzima glutathione s-transferase (GSTs) (Lima *et al.*, 2011). Já o outro envolve alterações estruturais no local de ação dos inseticidas no sistema nervoso central dos insetos, como receptores de GABA (ácido gama-aminobutírico) e acetilcolinesterase, e os canais de sódio dependentes de voltagem (Manjarres-Suarez; Olivero-Verbel, 2013).

Dadas essas observações, fica clara a importância do desenvolvimento e reconhecimento de estratégias alternativas eficazes e seguras que possam agregar no controle de insetos vetores. Nesse cenário, podem ser citadas diversas tecnologias que revolucionaram

a maneira como se aborda a questão, passando por opções como modificação genética, utilização de bactérias nocivas aos vetores e armadilhas para capturar os insetos adultos (Wilson *et al.*, 2020). Para além disso, estudos vêm sendo desenvolvidos acerca do uso de componentes bioativos retirados de espécies vegetais no contexto do combate aos vetores em diferentes fases de vida e através de mecanismos diversos (Senthil-Nathan, 2020).

1.4 Moléculas de interesse

Em vista das circunstâncias que levam ao aumento desenfreado dos números de casos de arboviroses, como o aquecimento global e o aparecimento de linhagens resistentes aos métodos convencionais de controle, pesquisas vêm sendo feitas com foco no desenvolvimento de inseticidas com menor potencial nocivo à saúde humana e maior eficácia contra os vetores (Hillary; Ceasar; Ignacimuthu, 2024).

Ao longo da evolução, as plantas estiveram submetidas a diversos estímulos, como influências ambientais e interações com insetos. Por isso, se fez necessário que elas desenvolvessem mecanismos de defesa para evitar as interações de natureza prejudicial, como parasitismo e predação. Nesse contexto, os chamados metabólitos secundários se fizeram essenciais, além de atuarem em outras finalidades como a proteção contra radicais livres e a atração de polinizadores. Como exemplos dessa classe, podem ser citados os alcalóides, os compostos fenólicos, os terpenóides e os flavonóides (Bernhoft, 2010).

Uma classe de moléculas amplamente explorada como tática alternativa aos inseticidas químicos são as proteínas, produtos essenciais para a manutenção da sobrevivência das plantas que também se mostraram importantes bioativos (Bernhoft, 2010). Elas agem no organismo das plantas de forma independente ou conjunta, e suas ações podem variar desde estruturação, defesa contra predadores e resistência contra fatores abióticos (Shobade; Nilsen-Hamilton; Zabolina, 2025).

1.4.1 Inibidores de proteases

Dentro do grupo das proteínas produzidas por vegetais, estão presentes os inibidores de protease. Estas enzimas são classificadas entre aspárticas, serínicas, cisteínicas e metaloproteases, com base no envolvimento de moléculas de aspartato, serina, cisteína e de íons metálicos, respectivamente, no mecanismo catalítico (Polya, 2003). Em plantas, a classificação também se concentra em função e propriedades bioquímicas, com pequenas

variações, como os inibidores de proteases serínicas de Bowman-Birk e inibidores de tripsina da soja (Kunitz) (Clemente *et al.*, 2019).

São, geralmente, moléculas pequenas (≥ 15 kDa) expressas em resposta à danos ou ataques de insetos ou patógenos, responsáveis por interferir no processo digestivo (Cid-Gallegos *et al.*, 2022). Existem dois mecanismos principais de ação dos inibidores de protease: no primeiro, utilizado pela maior parte dos inibidores serínicos de plantas, o inibidor interage com o sítio ativo da protease, similar ao mecanismo enzima-substrato. Já no segundo, a interação inibidor-protease gera uma mudança de conformação irreversível do inibidor, e por isso estes são conhecidos como inibidores suicidas (Clemente *et al.*, 2019).

Na literatura, essas moléculas são relatadas em diversas famílias de plantas, em especial *Fabaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae*. Dentro da família *Fabaceae*, alguns trabalhos já foram desenvolvidos com espécies do gênero *Dioclea* explorando o potencial de proteínas, em especial inibidores, no que tange a ação inseticida contra *Ae. aegypti* (Batista, 2009; Bueno, 1999; Napoleão *et al.*, 2019).

A espécie escolhida para o estudo, *Dioclea megacarpa* Rolfe aparece como basônimo para *Macropsychanthus megacarpus* Rolfe em alguns trabalhos (Queiroz; Snak, 2020). São plantas arbustivas decíduas trepadeiras, com caules lenhosos que podem alcançar grandes altitudes. Pode ser encontrada em vários países da América do Sul, e no Brasil, é comum na região da caatinga e cerrado. É popularmente conhecida como mucunã ou olho-de-boi, graças ao aspecto de suas sementes, que são arredondadas de coloração marrom-escuro e crescem em vagens de 15 a 20 cm de comprimento e cerca de 4 cm de espessura (Figura 4) (Queiroz, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os potenciais larvicida, bactericida, fungicida e inibitório de protease de um inibidor de protease isolado a partir de sementes de *Dioclea megacarpa*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato proteico de sementes de *Dioclea megacarpa*;
- Purificar um inibidor de protease de *D. megacarpa*;
- Verificar a atividade inibitória da proteína isolada sobre proteases oriundas de homogenato intestinal de larvas de *Aedes aegypti*;
- Verificar atividade antifúngica e antibacteriana do inibidor de protease purificado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato proteico de *Dioclea megacarpa*

As sementes utilizadas na etapa inicial foram do acervo do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec). Elas foram quebradas com auxílio de um martelo e somente seu endocarpo foi moído em moinho de café, sendo descartada a testa. Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm e armazenada sob temperatura de 20 a 25°C para uso posterior.

Seguindo a metodologia de Almeida Filho, 2018 com alterações, a farinha armazenada foi submetida à extração em tampão Tris HCl 50mM, pH 7,5 na proporção de 1:10 (p/v) e mantida sob agitação constante por 2 h, sob temperatura ambiente similar a de armazenamento. O material foi filtrado em tecido de nylon e submetido à centrifugação a 10.000 x g, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto de *D. megacarpa* (EBDm), e foi utilizado posteriormente para os ensaios, além de passar por processos de purificação.

3.2 Fracionamento de extrato bruto de *Dioclea megacarpa*

A fim de obter uma solução com maior carga proteica para a utilização nos ensaios, foi adotada a metodologia aplicada por Almeida Filho *et al.* (2013), que consiste na lenta adição de ácido tricloroacético (TCA) 20%, sob agitação constante para as concentrações finais de 1 a 5%, seguido de repouso por 20 min e centrifugação a 15.000 x g, por 10 min, à 4°C. O sobrenadante da amostra foi recolhido e dialisado contra água destilada.

3.3 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas solúveis foi feita pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Assim, todos os ensaios seguiram a proporção de 10 µL de amostra para 250 uL do reagente de Bradford. Após 10 minutos, foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência na curva padrão.

3.4 Cromatografia em coluna de tripsina

As cromatografias foram realizadas em uma coluna cromatográfica de Sepharose 4B com tripsina acoplada. Para tanto, foi determinado o volume de 5 mL da amostra DmF5 (fração de *Dioclea megacarpa* com adição de 5% de TCA) por aplicação. As frações cromatográficas das proteínas não retidas (denominadas NRDmF5) foram eluídas com o tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e coletadas em alíquotas de 2 mL, e as frações proteicas retidas (denominadas RDmF5) foram eluídas com a aplicação de solução de ácido clorídrico (HCl) 50 mM à coluna e igualmente coletadas em alíquotas de 2 mL. O processo cromatográfico foi acompanhado pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico das amostras em estudo foi analisado em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, e foi conduzido 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, frações obtidas por precipitação com TCA, picos não adsorvidos às matrizes de afinidade e os picos adsorvidos foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1% e Coomassie Brilliant Blue G-250 (para a marcação da frente de corrida eletroforética, a 0,02%). Em todas as eletroforeses foram utilizados géis de aplicação contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 50 mM, 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%.

3.6 Testes de atividade inibitória de tripsina

Para verificar a capacidade de inibição de tripsina, amostras de EBDm, DmF5 e da fração retida (RDmF5) obtida após cromatografia em coluna de tripsina acoplada foram dialisadas contra água destilada e, em seguida, incubadas a 37°C, por 10 min, com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, contendo CaCl₂ 0,02 M e 50 µL de tripsina 0,02 mg/mL. A reação foi iniciada com a adição de 125 µL de solução de BApNA (Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) 1,25 mM em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5,

seguida de incubação por 30 min a 37°C. As amostras foram dispostas em triplicata em microplaca de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 410 nm.

3.7 Bioensaios

3.7.1 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* das frações de *Dioclea megacarpa* sobre as proteases intestinais de *Aedes aegypti*

A capacidade inibitória sobre as proteases intestinais de *Aedes aegypti* foi avaliada usando intestinos de larvas, fonte abundante de proteases. Para tanto, os intestinos de cerca de 300 larvas foram retirados com o uso de pinças e transferidos imediatamente para microtubos resfriados contendo uma solução tampão de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Os intestinos foram homogeneizados com o auxílio de um porter e centrifugados a 10.000 x g por 3 min, os sobrenadantes obtidos foram colocados em eppendorfs que foram identificados e armazenados em freezer a -20°C para posterior utilização, seguindo a metodologia de Almeida Filho *et al.* (2017).

Para o ensaio, alíquotas de 30 µL (solução enzimática) do homogenato foram incubadas, por 5 min a 37 °C, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e volumes de 5, 10, 20 e 40 µL de DmF5 e RDmF5. A reação foi iniciada adicionando 80 µL de BApNA 1,25 mM em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Após 30 min, a reação foi parada com a adição de 30 µL de solução de ácido acético 30%. Ao final, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 5 min e o sobrenadante foi utilizado para a realização da leitura das absorbâncias a 410 nm.

3.7.2 Ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana

Alíquotas das amostras RDmF5 e NRDMF5 foram utilizadas em ensaios de atividade fungicida e bactericida. Para isso, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA).

A partir de um cultivo de 24 h de quatro cepas de *Candida* spp: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. auris* 01256P derivada do CDC B11903 e uma cepa clínica de *C. albicans* resistente ao fluconazol, pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC), foi preparada uma

suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). As leituras foram realizadas visualmente.

As amostras foram testadas no intervalo de concentração de 500 - 0,976 $\mu\text{g/mL}$. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da molécula capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o controle contendo o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

Para o ensaio de atividade bactericida, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita segundo o protocolo M7-A10 (CLSI, 2015). A partir de um cultivo de 24 h de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC), realizado em ágar Mueller Hinton, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições em meio caldo Mueller Hinton cátion ajustado para obtenção do inóculo contendo 10^5 UFC/mL.

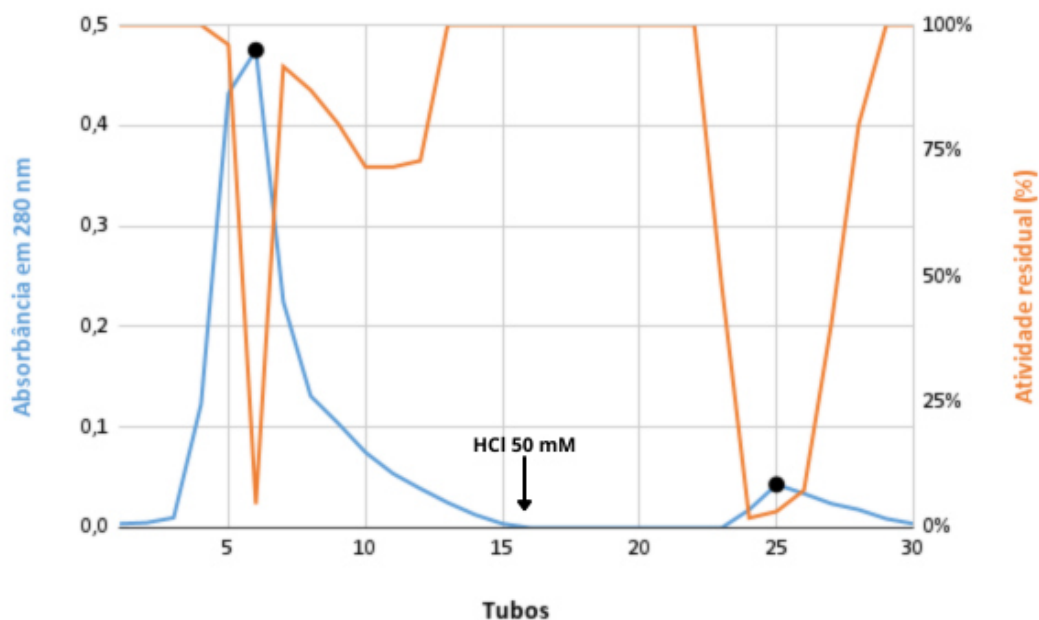
As microplacas foram incubadas a 35°C por 20h. As leituras foram realizadas visualmente. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2015). Os testes foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Purificação de DmF5

Para a purificação do inibidor de protease na amostra em estudo, a DmF5 foi aplicada em coluna de tripsina acoplada de Sepharose 4B. Observando o gráfico 1, podemos evidenciar dois picos sinalizados por um círculo preto: o primeiro, entre os tubos 4 e 8, e o segundo, visivelmente menor, entre os tubos 24 e 26. Esses picos são característicos de colunas de afinidade, e representam a concentração de moléculas em cada etapa do processo cromatográfico. No contexto do presente estudo, o primeiro pico foi denominado NRDMF5 (não-retido), e o segundo, que concentrava as moléculas de interesse, RDmF5 (retido).

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da fração proteica de sementes de *Dioclea megacarpa* fracionada em ácido tricloroacético (TCA) 5% (DmF5) solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5.



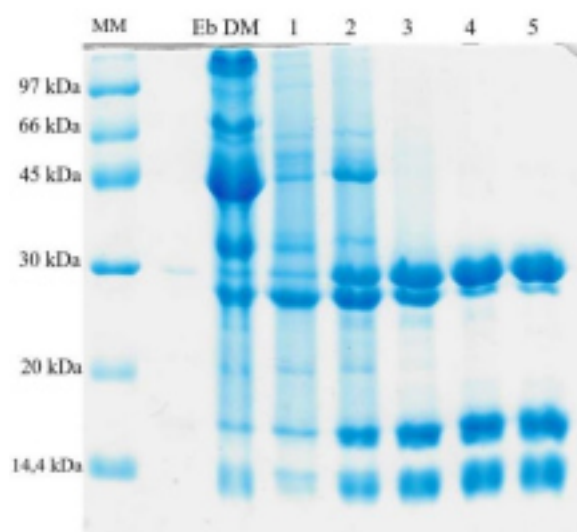
Fonte: autoria própria

Adicionalmente, pode-se apontar a relação dos picos das frações obtidas (NRDmF5 e RDmF5) com a variação da atividade residual de tripsina, o que permite obter uma visualização ideal do potencial inibitório das moléculas presentes em cada fração.

Este gráfico permite visualizar, claramente, a queda da atividade proteolítica da tripsina à medida em que há um aumento na absorvância das amostras, como pode ser observado nos picos indicados por círculos pretos. Essa observação indica a presença de moléculas inibidoras de tripsina em ambas as porções (não retido e retido), entretanto, pode-se inferir que essas moléculas estão concentradas no pico retido, obtido em torno do tubo nº 25, uma vez que foi observada elevada atividade inibitória, ainda que obtida baixa absorvância.

A análise eletroforética apresenta resultados que demonstram, igualmente, a purificação obtida através dos processos realizados. A figura 5 evidencia a diminuição da carga proteica na amostra após a primeira estratégia de purificação, que consistiu na adição de ácido tricloroacético (TCA), configurando a amostra com adição de 5% de TCA (denominada DmF5) como a ideal para obtenção da fração desejada.

Figura 5 - Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%. MM - Marcadores de massa molecular; EbDM - Extrato bruto proteico extraído de sementes de *Dioclea megacarpa*; 1 a 5 - Frações proteicas obtidas com adição de ácido tricloroacético nas concentrações de 1% a 5%, respectivamente.



Fonte: autoria própria

Legenda: MM - Marcadores de massa molecular; EbDM - Extrato bruto proteico extraído de sementes de *Dioclea megacarpa*; 1 a 5 - Frações proteicas obtidas com adição de ácido tricloroacético nas concentrações de 1% a 5%, respectivamente.

Na literatura, podem ser encontrados diversos trabalhos que atestam a presença de inibidores de proteases em espécies da família *Fabaceae*. Dentre eles, pode-se citar Batista (2009) onde algumas proteínas de *Dioclea megacarpa* são exploradas profundamente quanto ao seu potencial inseticida, dentre elas, um inibidor de protease.

4.2 Tabela de Purificação

Os resultados obtidos pelo teste de atividade inibitória de tripsina foram utilizados para montar uma tabela de purificação (Tabela 1). Para tanto, foram escolhidas as amostras de EBDm (extrato bruto proteico extraído de sementes de *Dioclea megacarpa*), DmF5 (Fração proteica extraída em TCA 5%) e RDmF5 (Fração retida em coluna cromatográfica de tripsina).

Tabela 1: Atividade inibitória de tripsina dos passos de purificação a partir de 1,23 g de farinha de *D. megacarpa*.

Amostra	Proteína total (mg)	Atividade inibitória total (UI)	Atividade inibitória específica (UI/mg)	Índice de purificação ³	Recuperação de proteína (%) ⁴	Recuperação de atividade (%) ⁵
EBDm ²	70,31	109,760	1561,08	1	100	100
DmF5	6,97	46198,71	6621,95	4,24	9,92	42,09
RDmF5	0,65	16782,32	25569,80	16,37	0,93	15,29

Fonte: autoria própria.

Legenda: ² O Extrato Bruto (EBDm) obtido na primeira etapa de purificação serviu como referência para as demais amostras;

³ Índice de Purificação 1 foi atribuído a EBDm. O Índice de Purificação nos passos subsequentes foi calculado como sendo a razão entre a sua Atividade Inibitória Específica e aquela do EBLs;

⁴ Rendimento de 100% foi atribuído a EBDm. O Rendimento foi calculado como sendo a razão entre a quantidade de Proteína Total em cada etapa e aquela do EBDm, multiplicada por 100;

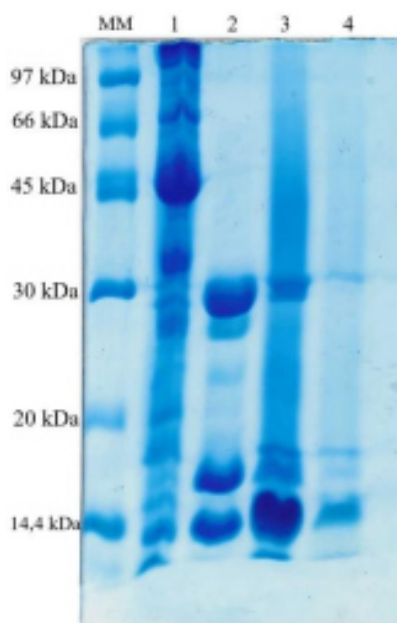
⁵ Rendimento de 100% foi atribuído a EBDm. O Rendimento foi calculado como sendo a razão entre a Atividade Inibitória Total em cada etapa e aquela do EBDm, multiplicada por 100.

É possível observar o aumento expressivo do valor de atividade inibitória total alcançado por RDmF5 em relação a EBDm, o que aponta o sucesso do processo de purificação, confirmada com base no índice de purificação de 16,37% da última etapa, e pelos altos valores de inibição apesar do rendimento relativamente baixo (15,29%).

No que diz respeito ao perfil eletroforético das amostras utilizadas, é possível apontar, na raia 1 (EBDm), um perfil que indica uma alta carga proteica, com bandas de diversas massas moleculares e intensa coloração, justificado pela natureza inicial da amostra no processo de purificação parcial. Durante este processo, a amostra de NRDMF5 (raia 3) também demonstrou alta carga proteica, levantando a possibilidade da presença de outras moléculas que não as de interesse do presente estudo.

Ademais, observa-se que as raias 2 e 4, contendo as amostras DmF5 e RDmF5, respectivamente, apresentam bandas proteicas com peso molecular em torno de 15 kDa, similar ao de inibidores de protease já conhecidos, como o ASPI de *Allium sativum* (Shamsi *et al.*, 2016), e o OsBBPI de *Oryza sativa japonica* (Yan *et al.*, 2009).

Figura 6 - Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%.



Fonte: autoria própria

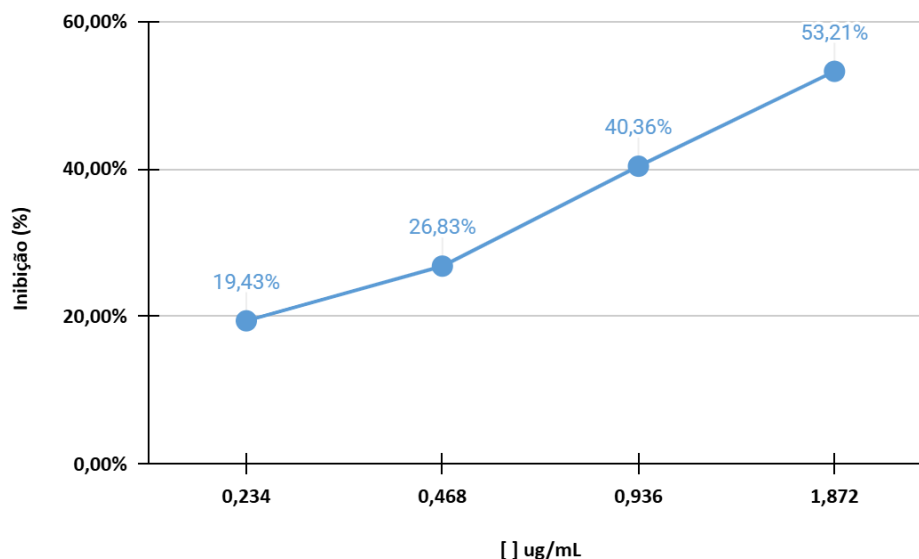
Legenda: MM - Marcadores de massa molecular; 1 - Extrato bruto proteico (EBDm) extraído de sementes de *Dioclea megacarpa*; 2 - Fração proteica (DmF5) extraída em ácido tricloroacético (TCA) 5%; 3 - Fração não retida (NRDmF5) em coluna cromatográfica de tripsina eluída em tampão Tris HCl; 4 - Fração retida (RDmF5) em coluna cromatográfica de tripsina eluída em HCl.

4.3 Bioensaios

4.3.1 Atividade inibitória *in vitro* sobre proteases intestinais de *Aedes aegypti*

Tendo em vista os resultados previamente obtidos até esta etapa do trabalho, somente RDmF5 foi utilizado para a avaliação da atividade inibitória sobre proteases intestinais. Os volumes de RDmF5 apresentaram resultados promissores quanto a inibição das proteases intestinais de *Ae. aegypti in vitro*, como pode ser observado no Gráfico 3.

Gráfico 3: Atividade inibitória percentual das diferentes concentrações de RDmF5 utilizadas em ensaio de inibição das proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: autoria própria.

Dentre os resultados obtidos, o ensaio com 1,8 $\mu\text{g/mL}$ é o que se mostra mais satisfatório, com inibição de até 53% da atividade enzimática total do homogenato larval. Apesar do valor obtido se encontrar abaixo de outros relatados na literatura, como Almeida Filho (2013) e Sasaki *et al.* (2015), com os inibidores de *Leucaena leucocephala* (sLITI) e de *Adenantha pavonina* (ApTI) alcançando valores de inibição em torno de 70% e 80%, respectivamente, é importante ressaltar a capacidade inibitória mesmo com quantidades tão baixas utilizadas. Ademais, também seria válido estudar a aplicação de métodos alternativos encontrados na literatura a exemplo do sinergismo com outros compostos ou organismos como *Bacillus thuringiensis* (Ma *et al.*, 2013).

Esse resultado mostra a eficácia da purificação do inibidor de protease de *Dioclea megacarpa* e sugere a importância de uma maior atenção aos inibidores de proteases da espécie, reafirmando a possibilidade e a necessidade de uma caracterização completa dessa molécula, visando a expansão do conhecimento acerca dessa classe de moléculas e dos potenciais diversos do gênero de plantas *Dioclea*.

4.3.2 Atividade bactericida e fungicida

Os testes realizados com as amostras RDmF5 e NRDMF5 apontam que ambas não apresentam atividade antifúngica e antibacteriana nas condições testadas, como observado pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM) apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Avaliação do efeito antifúngico do RDmF5 e do NRDMF5 frente a isolados de *Candida* spp.

CIM 50 ^b		
Substâncias ^b	RDmF5	NRDMF5
Cepas ^a		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL
<i>C. auris</i> 01256P CDC	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL
<i>C. albicans</i> 1	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL

^a Cepas de leveduras isoladas de coleção. ^b CIM foi definido como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas após 24h de incubação.

Tabela 3: Avaliação do efeito antibacteriano do RDmF5 e do NRDMF5 frente a isolados de *S. aureus*.

CIM 1000 ^b		
Substâncias ^b	RDmF5	NRDMF5
Cepas ^a		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL
SARM 1	> 500 µg/mL	> 500 µg/mL

^a Cepas de bactérias isoladas de coleção. ^b CIM foi definido como a mais baixa concentração que produziu 100% de redução do crescimento das células bacterianas após 20h de incubação.

5. CONCLUSÃO

Os inibidores de proteases isolados de *Dioclea megacarpa* figuram como uma boa opção de agente larvicida, mas não possuem atividade antimicrobiana satisfatória. A inibição sobre proteases intestinais de *Aedes aegypti* pela fração obtida por meio de processo cromatográfico foi muito promissora mesmo com volumes baixos, evidenciando que esta molécula possui um grande potencial biotecnológico e pode vir a ser uma forte aliada no combate aos insetos vetores e no consequente controle das doenças transmitidas por eles. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados visando a caracterização desse inibidor de protease, além de ensaios para determinar seus mecanismos de ação, efeito em organismos não-alvo e possíveis outros potenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA FILHO, L.C.P. *et al.* **Efeito de inibidores de tripsina obtidos de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam) R. de Witt sobre o desenvolvimento de *Aedes aegypti*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 94, 2013.
- ALMEIDA FILHO, L.C.P. *et al.* First insights into insecticidal activity against *Aedes aegypti* and partial biochemical characterization of a novel low molecular mass chymotrypsin-trypsin inhibitor purified from *Lonchocarpus sericeus* seeds. **Pest Management Science**, v. 1, n. 74, p. 1362-1373, 8 fev. 2018.
- ANOOPKUMAR, A. N. *et al.* Life Cycle, Bio-ecology and DNA Barcoding of mosquitoes *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse). **Journal of Communicable Diseases**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 32-41, 2017.
- BATISTA, Adelina Braga. **Potenciais Fungicida e Inseticida de Proteínas Presentes em Sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BENELLI, Giovanni; WILKE, André B. B.; BEIER, John C. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 11, p. 942–943, nov. 2020.
- BERNHOF, Aksel. Bioactive compounds in plants: benefits and risks for man and animals : proceedings from a symposium held in Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13-14 November 2008. **Oslo: Novus Forlag**, 2010.
- BRAACK, Leo *et al.* Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 29, 9 jan. 2018.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. **Saúde Brasil 2019: uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 486 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2019_analise_situacao.pdf. Acesso em: 07 nov. 2025.
- BUENO, Norlene R. *et al.* Primary Structure of *Dioclea glabra* Trypsin Inhibitor, DgTI, a Bowman-Birk Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 261, n. 3, p. 838-843, ago. 1999. Acesso em: 18 dez. 2025.
- CID-GALLEGOS, María S. *et al.* Protease Inhibitors from Plants as Therapeutic Agents - A Review. **Plant Foods Hum Nutr** 77, 20–29 (2022).

CLEMENTE, Marina *et al.* Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 6, p. 1345, 2019.

Clinical and Laboratory Standards Institute; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; **Approved Standard M27-A3**, 3rd ed., Wayne, PA. 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute; Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard M07-A10**, 10th ed., Wayne, PA. 2015.

DAS, Biswadeep; GHOSAL, Sayam; MOHANTY, Swabhiman. Aedes: What Do We Know about Them and What Can They Transmit? *In: Aedes: What Do We Know about Them and What Can They Transmit?* [S. l.]: IntechOpen, [2021?]. cap. 1. Acesso em: 03 nov. 2025.

DAVIS, Charles C.; CHOISY, Patrick. Medicinal plants meet modern biodiversity science. **Current Biology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. R158-R173, 26 fev. 2024.

DE QUEIROZ, Luciano Paganucci; SNAK, Cristiane. Revisiting the taxonomy of *Dioclea* and related genera (Leguminosae, Papilionoideae), with new generic circumscriptions. **PhytoKeys**, v. 164, p. 67–114, 21 out. 2020.

HILLARY, V. Edwin; CEASAR, S. Antony; IGNACIMUTHU, S. Efficacy of plant products in controlling disease vector mosquitoes, a review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 172, n. 3, p. 195–214, 2024.

HOTEZ, Peter J. *et al.* Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 6 set. 2007.

JANGIR, Pradeep Kumar; PRASAD, Arti. Spatial distribution of insecticide resistance and susceptibility in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in India. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 2, p. 1019–1044, 1 abr. 2022.

KÅRLUND, Anna; PAUKKONEN, Isa; GÓMEZ-GALLEGO, Carlos; KOLEHMAINEN, Marjukka. Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: digestion physiology- and gut health-related effects. **Healthcare**, Basel, v. 9, n. 8, p. 1-17, ago. 2021.

KIHAMPA, C. Tanzanian Botanical Derivatives in the Control of Malaria Vectors: Opportunities and Challenges. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 1, 2011.

KRYSTOSIK, Amy *et al.* Solid Wastes Provide Breeding Sites, Burrows, and Food for Biological Disease Vectors, and Urban Zoonotic Reservoirs: A Call to Action for Solutions-Based Research. **Frontiers in Public Health**, v. 7, 17 jan. 2020.

LEE, Hobart; HALVERSON, Sara; EZINWA, Ngozi. Mosquito-Borne Diseases. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 393–407, 1 set. 2018.

LETA, Samson *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, fev. 2018.

LIMA, Estelita Pereira *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 5, dez. 2011.

MA, Yan *et al.* Combined effects of three crystalline toxins from *Bacillus thuringiensis* with seven proteinase inhibitors on beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 169-176, mar. 2013

MANJARRES-SUAREZ, Alejandra; OLIVERO-VERBEL, Jesus. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. **Revista Costarricense de Salud Pública**, v. 22, n. 1, p. 68-75, ene./jun. 2013.

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 1 mar. 2015.

NAPOLEÃO, Thiago Henrique *et al.* Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 1212-1233, 2019.

NAWARATHNE, Madhawa Pradeepa; DHARMARATHNE, Chathuranga. Control of dengue larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using the larvicidal bioactive compounds in different plant extracts and plant extract-mediated nanoparticles. **Tropical Medicine and Health**, [S. l.], v. 52, n. 95, p. 1-21, 2024.

NORIEGA, F. G. *et al.* Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 2, p. 205–212, 1 fev. 2002.

OGUNDARE, A. O.; OLORUNFEMI, O. B. Antimicrobial Efficacy of the Leaves of *Dioclea reflexa*, *Mucuna pruriens*, *Ficus asperifolia* and *Tragia spathulata*. **Research Journal of Microbiology**, Dubai, v. 2, n. 4, p. 392-396, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Arbovirus Initiative**: preparing for the next pandemic by tackling mosquito-borne viruses with epidemic and pandemic potential. Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240088948>. Acesso em: 30 out. 2025.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Plan of Action on Entomology and Vector Control 2018-2023**: Final Report. Washington, D.C.: PAHO, 2024. (Document CE162/17, Rev. 1). Disponível em: <https://www.paho.org>. Acesso em: 08 nov. 2025.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Report on the epidemiological situation of dengue in the Americas**: as of epidemiological week 40, 2025. [S. l.]: PAHO, 27 out. 2025. Disponível em: <https://www.paho.org/plisa>. Acesso em: 06 nov. 2025.

POLYA, Gideon M. Protein and Non-Protein Protease Inhibitors from Plants. In: ATTA-UR-RAHMAN (ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2003. v. 29, cap. 12, p. 567-641.

POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11–17, 2013.

SARMAH, P. *et al.* A review on common pathogenic microorganisms and their impact on human health. **Electronic Journal of Biology**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2018.

SARWAR, Muhammad. Insect Vectors Involving in Mechanical Transmission of Human Pathogens for Serious Diseases. **International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 300-306, 2015.

SASAKI, Daniele Yumi *et al.* Effects of proteinase inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds on short- and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, v. 112, p. 172-186, maio 2015.

SENTHIL-NATHAN, Sengottayan. A Review of Resistance Mechanisms of Synthetic Insecticides and Botanicals, Phytochemicals, and Essential Oils as Alternative Larvicidal Agents Against Mosquitoes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 25 fev. 2020.

SHAMSI, Tooba Naz *et al.* *Allium sativum* Protease Inhibitor: A Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Garlic Is a New Comrade of the Serpin Family. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165572, 15 nov. 2016.

SHAW, W. Robert; CATTERUCCIA, Flaminia. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. **Nature microbiology**, v. 4, n. 1, p. 20–34, jan. 2019.

SHOBADE, Samuel O. *et al.* Plant Defense Proteins: Recent Discoveries and Applications. **Plants**, v. 14, n. 13, 5 jul. 2025.

SILVA, Luiz Lúcio Soares da *et al.* AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., *Fabaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

SILVA, Tainá Maria Santos da *et al.* DETERMINANT ASPECTS OF THE REPRODUCTIVE SUCCESS OF *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762): A REVIEW. **Journal of Media Critiques**, v. 11, n. 28, p. e363–e363, 12 set. 2025.

TERRA, Márcia Regina *et al.* *Aedes aegypti* E AS ARBOVIROSES EMERGENTES NO BRASIL. **Uningá Review**, [S. l.], v. 30, n. 3, 2017. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/2028>. Acesso em: 13 nov. 2025.

WILLIAMS, Phillip L.; JAMES, Robert C.; ROBERTS, Stephen M. (ORGS.). **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2000.

WILSON, Anne L. *et al.* The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007831, 16 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Geneva: WHO, 2024.
Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.

XIA, Han *et al.* Mosquito-Associated Viruses in China. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 1, p. 5–20, 1 fev. 2018.

YAN, Ker-Ming *et al.* Purification and Characterization of Bowman-Birk Protease Inhibitor from Rice Coleoptiles. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 56, n. 5, p. 949–960, 2009.