



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

**EMANUEL FRANCELINO SILVA**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DO TIPO KUNITZ DE SEMENTES DE *Albizia lebbek* (L.)  
BENTH. ATRASA E PREJUDICA O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti***

**FORTALEZA**

**2018**

EMANUEL FRANCELINO SILVA

INIBIDOR DE TRIPSINA DO TIPO KUNITZ DE SEMENTES DE *Albizia lebbbeck* (L.)  
BENTH. ATRASA E PREJUDICA O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

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

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

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S579i Silva, Emanuel Francelino.  
Inibidor de tripsina do tipo Kunitz de sementes de *Albizia lebbbeck* (L.) BENTH. atrasa e prejudica o desenvolvimento de *Aedes aegypti* / Emanuel Francelino Silva. – 2018.  
66 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
1. *Aedes aegypti*. 2. Inibidor de proteinase. 3. *Albizia lebbbeck*. I. Título.

CDD 572

---

EMANUEL FRANCELINO SILVA

INIBIDOR DE TRIPSINA DO TIPO KUNITZ DE SEMENTES DE *Albizia lebbbeck* (L.)  
BENTH. ATRASA E PREJUDICA O DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Selene Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, por ter aceitado me orientar e por todos os valiosos ensinamentos e conselhos. Obrigado pela confiança, paciência e motivação ao longo desses dois anos de mestrado.

Às professoras Dra. Daniele de Sousa e Dra. Selene Maia de Moraes, por terem aceitado participarem da banca de avaliação desta dissertação. Suas críticas e sugestões certamente ajudarão a enriquecer este trabalho.

Ao Dr. Luiz Pereira de Almeida Filho, co-orientador deste trabalho, pelos conhecimentos e experiência a mim transmitidos e que foram fundamentais para a realização desta dissertação.

A todos os membros do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, principalmente Joaquim Lopes, Pedro Matheus, Thaís Borges, Chayenne Sá, Thiago Almeida, Rute Xavier, Gabrielle de Paula, Fernando César, Jackeline Medeiros, Berenice Alves e Profa. Dra. Érika Mota. Os momentos de aprendizado e as amizades construídas tornaram esse mestrado mais prazeroso. Ao Sr. José Valdenor, pelo zelo com o qual cuida do laboratório.

Aos docentes e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo acompanhamento e dedicação.

Aos amigos que estiveram presentes em mais esta etapa.

À minha família, principalmente minha mãe, pelo suporte incondicional que sempre me foi dado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

As arboviroses como a dengue, a febre zika e a febre chikungunya têm causado preocupação nas autoridades em saúde devido as suas graves complicações e a ausência de vacinas eficazes e tratamentos específicos. O controle químico do vetor dessas doenças, *Aedes aegypti* (Diptera), apresenta desvantagens devido aos efeitos danosos à saúde humana, ao ambiente e também devido à resistência desenvolvida por parte dos insetos. Nesse sentido, os inibidores de proteinases podem ser uma alternativa aos inseticidas químicos, uma vez que inibem a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, como a tripsina, presente no intestino médio de *Ae. aegypti*. Purificamos e caracterizamos um inibidor de tripsina de sementes de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. (AITI) e avaliamos o seu efeito sobre a eclodibilidade dos ovos, desenvolvimento e atividade proteinásica de larvas de *Ae. aegypti*. A massa molecular de AITI foi determinada (21 kDa), caracterizando-o como do tipo Kunitz. A atividade inibitória do inibidor se manteve estável na faixa de temperatura de 37 à 60 °C. AITI inibiu especificamente tripsina (99.3%), mas não mostrou atividade inibitória contra quimotripsina e papaína. O inibidor (0.1 mg/mL) promoveu uma redução de 46.8% na atividade proteases do intestino de larvas de *Ae. aegypti*. AITI (1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) não teve efeito sobre a eclodibilidade dos ovos, mas atrasou do desenvolvimento das larvas em 5 dias (62,2%) em relação ao controle (água destilada), além de ter causado uma mortalidade de 53,3%. Os resultados obtidos sugerem que o inibidor de tripsina de *A. lebbbeck* pode ser uma estratégia alternativa para controlar o *Ae. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*. Proteinase inhibitor. *Albizia lebbbeck*.

## ABSTRACT

Arboviruses such as dengue fever, zika fever and chikungunya fever and their severe complications have caused concern in health authorities due to the absence of an effective vaccine or a specific treatment. The chemical control of the vector of these diseases, *Aedes aegypti* (Diptera), presents disadvantages due to the adverse effects on human health, environment and also due to the resistance developed by the insects. In this sense, proteinase inhibitors can be an alternative to chemical insecticides because they inhibit the catalytic activity of proteolytic enzymes, such as trypsin, present in the midgut of *Ae. aegypti*. We purified and characterized a trypsin inhibitor from *A. lebbeck* seeds (AITI) and investigated its effect upon *Ae. aegypti* egg hatching, larval development and digestive proteases. The molecular mass of the inhibitor was determined (21 kDa), characterizing it as kunitz type. The inhibitor was stable over a range of temperature (30–70 °C). AITI specifically inhibited bovine trypsin (99.3%) but showed not inhibitory activity against chymotrypsin and papain. AITI (0.1 mg/mL) promoted 46.8% activity reduction of *Ae. aegypti* larvae midgut proteases. The AITI (1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) have no effect on egg hatching but delayed the development of the larvae in 5 days (62.2%) compared to the control (distilled water), in addition caused 53.3% of larvae mortality. Our results suggest the *A. lebbeck* trypsin inhibitor can be an alternative strategy to control the *Ae. aegypti*.

**Keywords:** *Aedes aegypti*. Proteinase inhibitor. *Albizia lebbeck*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global de três arboviroses: países com transmissão autóctone dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV .....	14
Figura 2 – Distribuição global da espécie <i>Aedes aegypti</i> , de azul (presença fraca) para vermelho (presença intensa) .....	19
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	20
Figura 4 – Aspectos gerais da planta <i>Albizia lebbbeck</i> (L.) Benth e suas estruturas.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
AIF5	Fração proteica de <i>Albizia lebbek</i>
AITI	Inibidor de tripsina de <i>Albizia lebbek</i>
BANA	N-benzoil-arginina-naftilamida
BApNA	Benzoil-arginina-nitroanilida
BTpNA	Benzoil-tirosina -paranitroanilida
BCA	Ácido bicinchonínico
BSA	Albumina sérica bovina
CPE	Extrato bruto proteico
Cys	Cisteína
DMACA	Diclorodifeniltricloroetano
DSS	Dengue hemorrágica
DDT	p-dimetilaminocinamaldeído
DHF	Síndrome do choque da dengue
DTT	Ditiotreitol
HCl	Ácido clorídrico
IP	Inibidor de proteinase
kDa	Quilodalton
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Arboviroses transmitidas por mosquitos .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Dengue</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Febre chikungunya</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3</b>	<b><i>Febre Zika</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>O mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Estratégias de combate ao mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1</b>	<b><i>Inseticidas químicos</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.2</b>	<b><i>Bioinseticidas e proteínas de origem vegetal</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2.1</b>	<b><i>Inibidores de proteinases</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>A planta <i>Albizia lebeck</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>KUNITZ TRYPSIN INHIBITOR FROM <i>Albizia lebeck</i> (L.) BENTH. SEEDS DELAYS AND IMPAIRS THE DEVELOPMENT OF <i>Aedes</i> <i>aegypti</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICE A – PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE <i>Albizia lebeck</i> (L.) Benth.....</b>	<b>62</b>
	<b>APÊNDICE B – PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA DE FRAÇÃO PROTEICA (AIF5) DE SEMENTES DE <i>Albizia lebeck</i> (L.) Benth.....</b>	<b>66</b>

