



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

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

**INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Enterolobium contortisiliquum* INTERFERE NO
DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* E POTENCIALIZA A AÇÃO
DAS PROTEÍNAS CRY ORIUNDAS do *Bacillus thuringiensis***

FORTALEZA

2019

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Enterolobium contortisiliquum* INTERFERE NO
DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* E POTENCIALIZA A AÇÃO
DAS PROTEÍNAS CRY ORIUNDAS do *Bacillus thuringiensis*

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.

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

FORTALEZA

2019

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)

- T117i Tabosa, Pedro Matheus Sousa.
Inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* interfere no desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* e potencializa a ação das proteínas Cry oriundas do *Bacillus thuringiensis* / Pedro Matheus Sousa
Tabosa. – 2019.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Ana Fontenele Urano Carvalho .
1. Inibidor de Protease. 2. Larvicida. 3. Protoxinas. 4. Inseticida. I. Título.

CDD 572

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Enterolobium contortisiliquum* INTERFERE NO
DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* E POTENCIALIZA A AÇÃO
DAS PROTEÍNAS CRY ORIUNDAS do *Bacillus thuringiensis*

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. Valdirene Moreira Gomes
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)

Aos meus pais *Ednaldo* e *Vanderlucia*.

Sempre por vocês.

Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Este estudo foi financiado pelo Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS. Decit / SCTIE / MS, pelo intermédio do CNPq, o apoio do Funcap e SESA. Número de concessão 3896340/2017.

Agradeço à Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências.

Agradeço ao Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, UFC, onde foram realizados a maioria dos experimentos. Agradeço também ao Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTCH), Departamento de Biologia, Centro de Ciências, UFC, e ao Laboratório de Toxinas Vegetais, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, UFC.

Mais uma vez me disponho a escrever os agradecimentos e não existe outras pessoas que eu não pense em primeiro lugar a não ser meus pais: **Ednaldo** e **Maria Vanderlucia**, eu agradeço tudo que vocês fizeram e ainda fazem pelo meu irmão, **Pedro Arthur**, e por mim. Vocês são as pessoas que mais amo nesse mundo e tento fazer meu máximo para que sintam orgulho de mim. Muito obrigado por serem esses pais maravilhosos.

À **Thais Borges**, minha nega, minha bebeia, minha namorada, meu amor, obrigado por tudo que você fez por nós e por mim. Muito obrigado por me aguentar (não é uma tarefa fácil) todos esses anos, por me apoiar, aconselhar e me consolar. Esses dois anos foram difíceis e você sabe melhor que ninguém de quantas vezes pensei em desistir. Entretanto, você acreditou em mim e não me deixou desistir. Eu amo você.

À professora **Ana de Fátima Fontenele U. Carvalho**, obrigado por acreditar naquele garoto que entrou acanhado no Bioprospec. Eu aprendi e aprendo muito todos os dias com a senhora. A senhora é um dos maiores exemplos de educadoras que conheço. E quando eu queria desistir, a senhora me deu palavras de força e confiança para continuar no mestrado. Além disso, é claro, obrigado por todos os contos, fábulas e histórias. A senhora é uma pessoa maravilhosa.

Ao **Luiz Carlos Filho**, meu co-orientador desde a graduação, você continua sendo uma “pessoa doce”, mas a cada fase nova da vida, como esta, me sinto um holometábolo. Sei

que tenho muito o que aprender e que posso aprender com você. Continuo agradecendo por sua amizade.

À **Mirella Leite Pereira, Lady Clarissa Brito da Rocha-Bezerra e Profª Ilka Maria Vasconcelos** por participar deste trabalho com enormes contribuições. Muito obrigado!

À **R U T E Xavier**, minha IC oficial nº 1, muito obrigado por toda ajuda durante esse mestrado. Sem você essa dissertação não teria saído. Você faz parte dela, assim como esse mérito também é seu. Muito obrigado por todas as risadas e canções da Disney.

Ao Bioprospec, mesmo que alguns estejam um pouco distantes, e em particular, à **Profª Erika Mota, Thiago Almeida, Mirella Pereira, Berenice, Davi Farias, Martônio Viana, Joaquim Lopes, Emanuel Francelino e Felipe de Castro**. Sou grato pela amizade de vocês dentro ou fora da copa, e a importante contribuição que vocês tiveram neste trabalho.

Pelos meus grandes amigos, **Ênio Victor, Leonardo Vieira, Jorge Thé e Iago Oliveira** que apesar do tempo, sempre damos um jeito de rir juntos, obrigado pelos ótimos momentos. Além deles, não podem ser esquecidos, **Luna Vasconcelos, Marianny Kellen, Marcos Vieira** e ao seu **Valdenor**, por serem batalhadores cheios de historias.

RESUMO

Insetos urbanos são barreiras para o desenvolvimento humano como pragas na agricultura e vetores de doenças. O uso de produtos químicos sintéticos para o controle desses insetos tem causado danos ao ambiente e contribuído para o surgimento de insetos resistentes. Assim, nos últimos anos, cresceu a busca por novas moléculas de origem vegetal com atividade inseticida, como os inibidores de proteases e, paralelamente, seus efeitos sinérgicos com substâncias que apresentam esse efeito reconhecido. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade inseticida de um inibidor de protease de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (EcTI) e sua ação potencializadora da atividade inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti* das protoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Após os passos de purificação, o SDS-PAGE mostrou uma banda de massa molecular aparente de 20 kDa. O EcTI apresentou atividade inibitória *in vitro* sobre a tripsina e sobre proteases e bactérias do intestino médio das larvas. EcTI não apresentou toxicidade aguda às larvas do mosquito, mesmo à concentração máxima (1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), porém causou um atraso no desenvolvimento larval quando submetidas à exposição crônica (710 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O zimograma mostrou que as larvas incubadas com pequenas concentrações de EcTI (50 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentaram aumento da atividade das proteases do intestino médio, e estas enzimas diminuíram as concentrações letais (CL_{50} e CL_{20}) das protoxinas, com o aumento de sua ativação. No entanto, essa toxicidade não foi observada em náuplios de *Artemia* quando testados nas concentrações máximas utilizadas com as larvas. Os resultados sugerem que EcTI é promissor para o desenvolvimento de novos inseticidas para o controle desse importante vetor.

Palavras-chave: Inibidor de protease. Larvicida. Protoxinas. Inseticida.

ABSTRACT

Urban insects are barriers to human development such as agricultural pests and vectors of disease. The use of synthetic chemicals to control these insects has caused damage to the environment and contributed to the emergence of resistant insects. Thus, in recent years, the search for new molecules of plant origin with insecticidal activity, such as protease inhibitors and, in parallel, its synergistic effects with substances that have this recognized effect has increased. Thus, the objective of this work is to evaluate the insecticidal activity of a protease inhibitor of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong seeds. (EcTI) and its potentiating action of insecticidal activity on *Aedes aegypti* larvae of *Bacillus thuringiensis* protoxins. After the purification steps, SDS-PAGE showed a band of apparent molecular weight of 20 kDa. The EcTI showed in vitro inhibitory activity on trypsin and on larval intestinal proteases and bacteria. EcTI showed no acute toxicity to mosquito larvae, even at maximum concentration ($1,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), but presented a delay in larval development when submitted to chronic exposure ($710 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The zymogram showed that the larvae incubated at small concentrations of EcTI (50 to $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) promoted increased activity of the intestinal proteases, and these enzymes decreased the lethal concentrations (LC_{50} and CL_{20}) of the protoxins, with the increase of their activation. However, this toxicity was not observed in *Artemia* nauplii when tested at the maximum concentrations used with larvae. The results suggest that EcTI is promising for the development of new insecticides to control this important vector.

Keywords: Protease inhibitor. Larvicidal. Protoxins. Insecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do gênero <i>Aedes</i>	15
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i>	17
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação das proteínas Cry em larvas de inseto.....	20
Figura 4 - Esquema de potencialização do efeito das proteínas Cry dos <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> pelos inibidores de protease.....	24
Figura 5 - Imagens da planta <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDT	Diclorodifeniltricloroetano
RIP	Proteína inactivadora de ribosomo
IP	Inibidor de protease
BSA	Albumina sérica bovina
BApNA	Benzoil-arginina-p-nitroanilina
TCA	Ácido tricloacético
DEAE	Dietilaminoetil
BCA	Ácido bichinonínico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
NB	Caldo Nutriente (<i>Nutrient broth</i>)

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
1.1	Insetos vetores de doenças.....	13
1.2	<i>Aedes aegypti</i>.....	13
1.2.1	<i>Doenças transmitidas por Ae. aegypti</i>.....	13
1.2.2	<i>O mosquito Aedes aegypti e seu ciclo de vida</i>.....	14
1.3	Controle do <i>Ae. aegypti</i>.....	18
1.3.1	<i>Inseticidas químicos sintéticos</i>.....	18
1.3.2	<i>Proteínas Cry oriundas de Bacillus thuringiensis</i>.....	19
1.3.3	<i>Inibidores de proteases</i>.....	21
1.4	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>.....	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	TRYPSIN INHIBITOR FROM <i>Enterolobium contortisiliquum</i> SEEDS INTERFERES WITH THE DEVELOPMENT OF <i>Aedes aegypti</i> AND POTENTIATES CRY PROTEINS ACTION.....	28
4	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60