



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

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

BIOATIVIDADE DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE SEMENTES DE
***Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong SOBRE O DESENVOLVIMENTO**
DO MOSQUITO *Aedes aegypti* E SUA MICROBIOTA INTESTINAL.

FORTALEZA

2016

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

**BIOATIVIDADE DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE SEMENTES DE
Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* E SUA MICROBIOTA INTESTINAL.**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

Co-orientador: Ms. Luiz Carlos Almeida Filho.

FORTALEZA

2016

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)

- T117b Tabosa, Pedro Matheus Sousa.
Bioatividade de um inibidor de protease de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong sobre o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* e sua microbiota intestinal. / Pedro Matheus Sousa Tabosa. – 2016.
50 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
Coorientação: Profa. Ma. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.
1. Inseticida. 2. Inibidor de tripsina. 3. *Aedes aegypti*. I. Título.

CDD 570

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

BIOATIVIDADE DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE SEMENTES DE
Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO
MOSQUITO *Aedes aegypti* E SUA MICROBIOTA INTESTINAL.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da informação da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Aos meus pais *Ednaldo e Vanderlucia.*

Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ednaldo** e **Maria Vanderlucia**, por tudo que eles me proporcionaram. Por terem lutado acima de tudo para nos dar, para meu irmão e eu, tudo que precisávamos e que nunca nos faltasse nada. E principalmente, por toda educação. Ao meu irmão, **Pedro Arthur**, por todas as aventuras e piadas compartilhadas, eu agradeço do fundo do coração.

À professora **Ana de Fátima Fontenele U. Carvalho**, por ter me recebido no laboratório, por todos os ensinamentos, confiança, motivações, elogios e puxões de orelhas que foram necessários, e todas as histórias que me divertiram tanto. Eu sou muito grato por tê-la como orientadora.

Ao **Luiz Carlos Filho**, por ter sido meu co-orientador, por me ensinar tanta coisa ao longo desses anos, por cada discussão sobre qualquer assunto imposto, do científico aos desenhos animados. Obrigado por sua amizade. Você é uma pessoa muito doce.

Ao **Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTCH)**, em especial, à **Mirella Leite Pereira** que participou de perto, me auxiliou em todos os experimentos e pelos seus ensinamentos em microbiologia.

Aos amigos que fiz no Bioprospec, **Prof^a Erika Mota**, **Berenice**, **Davi Farias**, **Lady Clarissa**, **Nathanna Mateus**, **Terezinha Maria**, **Glauber Pacelli**, **Jackeline Medeiros**, **Martônio Viana**, **Gabrielle de Paula**, **Joaquim Lopes**, **Emanuel Francelino**, **Renata Maria**, **João Carlos** e **Claudio Dahne**, obrigado por todos os momentos dentro e fora do laboratório, e pelas inúmeras risadas na copa. Ao **Valdenor**, por ser mais um companheiro de batalha, histórias da periferia e por manter sempre o ambiente de trabalho sempre limpo e com alegria.

Aos meus amigos, **Thiago Almeida** e **Lucas Dias**, muito obrigado por cada encontro e cada “missa” onde nos divertimos, conversamos e choramos ao som das Coleguinhas, Louro Santos, Reginaldo Rossi, entre outros, nos momentos de “roedeiras”.

Aos meus amigos da Biologia, **Luna Vasconcelos**, **Marianny Kellen**, **Nayana Soares** e **Marcos Vieira**. E pelos mais que especiais, **Ênio Victor**, **Leonardo Vieira**, **Jorge Thé** e **Iago Oliveira**, por cada momento de apoio, loucura ao longo dessa graduação e cada brinde com vodca Natasha. Muito obrigado por cada momento ao lado de vocês. À **Thais Borges**, por uma das melhores amigadas que já tive e tenho, por me aturar todos os dias, pelos conselhos e ajuda sempre que precisava. Vocês são os melhores.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições, órgãos e unidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Insetos urbanos constituem diferentes entraves ao desenvolvimento humano agindo como pragas agrícolas e vetores de doenças. Muitas vezes, os produtos químicos utilizados no controle desses insetos causam danos ao meio ambiente e podem causar o surgimento de organismos resistentes. Desta forma, nas últimas décadas houve um aumento na busca por novas moléculas de origem vegetal, como os inibidores de proteases, que possuam atividades inseticidas e que não se acumulem no ambiente. Assim, o presente projeto avaliou as propriedades biológicas de um inibidor de protease de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, uma leguminosa nativa da Caatinga sobre o mosquito vetor de varias doenças humanas, *Aedes aegypti*. O extrato proteico bruto (EcEB) da farinha desengordurada de *E. contortisiliquum* foi submetido à precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) com uma concentração final de 5% (p/v) (F5). Posteriormente, a F5 foi aplicada em coluna de cromatografia de troca iônica para retirada do pico (P200) eluído com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com NaCl 200 mM. O P200 foi submetido à cromatografia de afinidade com tripsina acoplada para purificação do inibidor de tripsina (EcTI). Após a purificação, o EcEB e o EcTI foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre as proteases e as bactérias intestinais das larvas de *Ae. aegypti*, e seu desenvolvimento. EcEB e EcTI apresentaram atividade inibitória frente ao homogenato dos intestinos das larvas. A eletroforese mostrou que o processo de purificação foi eficaz. A concentração letal mínima para matar 50% dos indivíduos (CL₅₀) foi determinada para o EcEB (519,56 µg/mL) e para o EcTI (>1.000 µg/mL). Ademais, o EcTI mostrou-se capaz de retardar o desenvolvimento de larvas de *Ae. aegypti* em situação de ingestão crônica e ser bacteriostático frente às bactérias intestinais de larvas L4 do mosquito. Os resultados obtidos do efeito do EcTI sobre as larvas e as bactérias do *Ae. aegypti* sugerem que essa molécula possui um grande potencial para desenvolvimento de novos inseticidas.

Palavras Chave: Inseticida, Inibidor de Tripsina, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Urban insects are considered barriers to human development acting as agricultural pests and disease vectors. Usually the chemicals used in controlling insects cause damage to the environment and the rising of resistant organisms. Thus, in the last decades there has been an increase interest in searching new natural molecules origin, such as protease inhibitors with safe and environmentally-friendly insecticidal activity. Thus, the present study aimed to assess the biological properties of a protease inhibitor of seeds from *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, a native plant of Caatinga. The crude protein extract (EcEB) of the defatted *E. contortisiliquum* flour was subjected to precipitation with trichloroacetic acid (TCA) 20% to a final concentration of 5% (F5). Subsequently, F5 was applied to ion-exchange chromatography column to remove the peak P200 eluted with Tris-HCl 50mM pH 7.5 buffer with 200 mM NaCl. This peak was then loaded onto chromatography column containing trypsin-sepharose for purification of the inhibitor (EcTI). After purification, EcEB and ECTI were evaluated for their effects on proteases and intestinal bacteria of *Aedes aegypti*, and its development. EcEB and ECTI showed inhibitory activity against the intestinal homogenate of the larvae. SDS - PAGE showed the purification process was effective. The mean lethal concentration to kill 50% of subjects (LC₅₀) was determined for EcEB (519.56 µg/mL) and the ECTI (> 1.000 µg/ml). In addition, the EcTI proved to slow the development of *Ae. aegypti* in a situation of chronic ingestion and to be bacteriostatic against intestinal bacteria of mosquito larvae L4. The results of the effect of EcTI on larvae and midgut bacteria of *Ae. aegypti* suggest that this molecule has great potential for development of new insecticides.

Keywords: Insecticidal, Trypsin Inhibitor, *Aedes aegypti*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 - Países em áreas de risco de transmissão da dengue em 2016.....	18
Figura 2 – Distribuição do mosquito <i>Aedes aegypti</i> e a probabilidade de epidemias no Brasil em 2013.....	19
Figura 3 - Ciclo de vida dos insetos do gênero <i>Aedes</i>	21
Figura 4 – Imagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> . A: planta adulta; B: folhas e flores; C: frutos; D: sementes; E: tronco; F: madeira.....	27
Tabela 1 - Atividade inibitória percentual e específica de tripsina e das proteases dos intestinos de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 5 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%).....	36
Figura 6 - Concentração letal mínima (CL ₅₀) para matar 50% de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 7 - Aspectos morfológicos das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 5 dias de incubação em solução de BSA e EcTL.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> , tetrametiletlenodiamina
THAM	Tris (hidroximetil) aminometano
UI	Unidades de Inibição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Insetos vetores de doenças.....	14
1.2 Arboviroses	15
1.2.1 Considerações gerais	15
1.2.2 Vetores e o ciclo de vida	16
1.3 Controle dos insetos.....	22
1.3.1 Inseticidas químicos.....	22
1.3.2 Bioinseticidas.....	23
1.4 Proteínas vegetais com potencial inseticida	23
1.5 Leguminosas.....	26
1.5.1 <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong.....	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção do inibidor de proteases de sementes de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	28
3.2 Dosagem de proteínas.....	29
3.3 Eletroforese dos passos de obtenção	30
3.4 Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica	30
3.5 Atividades contra <i>Aedes aegypti</i>	30
3.5.1 Obtenção dos insetos	30
3.5.2 Atividade inibitória <i>in vitro</i> do inibidor de protease contra as proteases intestinais de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	31
3.5.3 Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀).....	31
3.5.4 Efeito dos inibidores de proteases sobre o desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	31
3.6 Atividade sobre as bactérias do intestino das larvas de <i>Ae. aegypti</i>	32
3.6.1 Obtenção das bactérias	32
3.6.2 Cultivo das bactérias	32
3.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima para bactérias do intestino de larvas de <i>Aedes aegypti</i> (CIM)	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5 CONCLUSÃO	42

REFERÊNCIAS	43
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insetos vetores de doenças

Desde o início da globalização de movimento e comércio do ser humano, os insetos tiveram sua introdução e estabelecimento facilitados (BALDACCHINO *et al.*, 2015). Os insetos urbanos são vetores de doenças, ou seja, os organismos intermediários no ciclo de vida de patógeno e os responsáveis 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). Assim, insetos urbanos têm sido considerados entraves ao desenvolvimento humano por serem vetores de doenças (KARUNGI *et al.*, 2000).

Consequentemente, doenças transmitidas por estes insetos como, a malária, filariose, encefalite japonesa, a febre amarela, dengue, chikungunya, zika, entre outras, tem impactos enormes em países tropicais e subtropicais (KODALINGAM, A.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M., 2013). Atualmente são 2,5 bilhões de pessoas em mais de 100 países que estão nas áreas de risco. Contabilizando, as doenças transmitidas por esses insetos são responsáveis por 17% das doenças infecciosas, causando a morte de mais de 1 milhão de pessoas todos os anos (WHO, 2016.)

Doenças transmitidas por insetos também têm se tornado uma grande preocupação de saúde para países mais desenvolvidos (HOTEZ, 2008), devido à expansão da área dos vetores pelas rotas comerciais, migração internacional, às mudanças climáticas e ao desmatamento, assim mosquitos que habitavam as florestas e adaptaram-se às grandes cidades (ALTIZER *et al.*, 2011; VONTAS *et al.*, 2012). Os gêneros *Anopheles* sp., *Aedes* sp. e *Culex* sp. são considerados os principais mosquitos vetores de doenças como a malária, zika vírus, chikungunya, dengue, filariose, febre amarela e encefalites (PAHO, 2014).

Um enorme avanço de estudos teóricos e práticos sobre as doenças infecciosas transmitidas pelos vetores tem contribuído para o entendimento ecológico e evolucionário dos insetos transmissores de doenças, dos patógenos e produção de estratégias para controle destes vetores, como mosquitos (*Anopheles*, *Aedes*, ou *Culex*), moscas (*Glossina* e flebotomíneos) ou triatomíneos (*Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*) (ALMEIDA FILHO, 2013). Em grandes áreas urbanas, o controle desses insetos através de produtos químicos ou o controle biológico, consiste em uma tática fundamental

para reduzir o impacto das doenças em seres humanos (PEDRINI *et al.*, 2011; VAN DEN BERG, 2011).

1.2 Arboviroses

1.2.1 Considerações gerais

Arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por insetos. Para que aconteça a instalação do vírus no hospedeiro, os arbovírus necessitam de hospedeiros de sangue quente, podendo ocorrer uma variação de temperatura de 10 a 40 °C, para que a replicação do vírus aconteça. E devido a grande diversidade de vírus, estes podem ser classificados em famílias, são elas: Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae e Mesoniviridae (METZ; PIJLMAN, 2011; VASILAKIS; TESH, 2015; OLSON; BLAIR, 2015).

Um dos vírus transmitido pelo gênero *Aedes* é a dengue. Esta é uma doença transmitida pela picada do mosquito infectado onde os sintomas surgem 3 a 14 dias após o contato. Considerada uma doença flaviviral da família *Flaviviridae*, a dengue apresenta quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e é transmitida, principalmente, pelo *Ae. aegypti*. Esse gênero tem grande ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. E ao transmitir o vírus, a dengue pode causar febres, vômitos, dor abdominal, sangramento, dificuldade de respirar, entre outros sintomas. (PAHO, 2016).

Vírus chikungunya pertencente à família *Togaviridae*, também é transmitido pelo gênero *Aedes*. A chikungunya pode causar febre maiores de 39 °C, fotofobia, dores nas articulações, erupções na pele, entre outros. Seu diagnóstico é feito por meio de reação de polimerização em cadeia (PCR) e tem causado grande preocupação a área da saúde médica (NYARI *et al.*, 2016; BRUNIER *et al.*, 2016; COUDERC; LECUIT, 2015).

O mais recente e com um alto risco de epidemia, o zika vírus é outra espécie pertencente à família *Flavoviridae* transmitida por insetos. O primeiro registro do zika vírus foi em 1947 em macacos na Uganda. Normalmente, os sintomas aparecem 2 a 12 dias após a picada com o mosquito infectado. Os sintomas incluem conjuntivites, febre, dores nas articulações, dor abdominal e na cabeça, ulcerações nas mucosas, diarreia. Somente em 2015, o zika vírus esteve presente em 26 países e com risco de transmissão nas Américas (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; CHEN; TANG, 2016; PIORKOWSKI *et al.*, 2016).

Além da interação com os vírus, o mosquito *Ae. aegypti* possui um grande potencial invasor, onde seus ovos são altamente resistentes à dessecação por vários meses, contribuindo para seu estabelecimento em momentos e em locais desfavoráveis. Nas últimas décadas, houve um aumento na taxa de incidência de doenças transmitidas pelo mosquito. Esse aumento ocorreu devido à intensa globalização comercial, ao turismo, às mudanças climáticas, medidas de baixa efetividade no combate ao vetor e às facilidades de estabelecimento de espécies de mosquitos invasores fora do seu ambiente natural (ERLANGER *et al.*, 2008; SCHAFFNER *et al.*, 2013; DEBLAUWE *et al.*, 2014; BALDACCHINO *et al.*, 2014).

1.2.2 Vetores e o ciclo de vida

Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais responsáveis pela transmissão das arboviroses, incluindo o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, mas principalmente o *Ae. aegypti* que é amplamente distribuído ao redor do mundo (WHO, 2009).

Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* são facilmente encontrados em ambientes humanos onde depositam seus ovos em recipientes com água parada no domicílio ou ao redor dele, tais como tanques, garrafas, pneus, plásticos, potes, barris, vasos de plantas, entre outros, contribuindo ainda mais para o aumento da densidade da população de mosquitos (FOSTER, 2002; VONTAS, *et al.*, 2012). Contudo, os mosquitos da espécie *Ae. albopictus* têm preferência por ambientes florestais, como folhas, buracos e poças ao redor de árvores, cascas de frutos, aparecendo com frequência em jardins ao redor das casas (BRAGA; VALE, 2007)

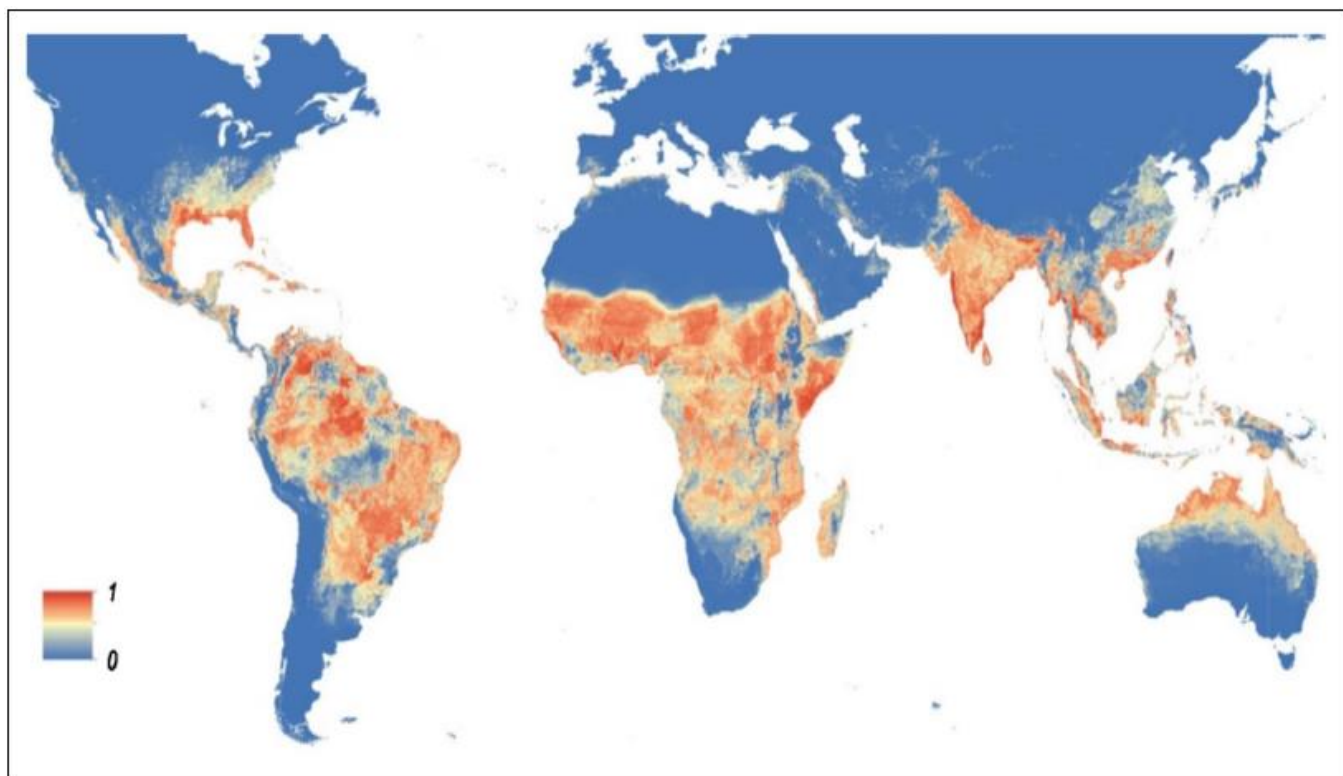
Originalmente, o *Ae. albopictus* é uma espécie endêmica da Ásia. E assim como outras espécies de mosquitos, esses vetores podem ter sido introduzidos nas Américas e outras regiões do planeta através de barcos comerciais vindos da Europa nas primeiras explorações que cruzaram o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao Novo Mundo. Hoje, o gênero *Aedes* pode ser encontrado do sul dos Estados Unidos da América a Argentina, na Europa, África, Ásia e Pacífico (BISSET, 2002) (Figura 1).

No Brasil, o mosquito *Ae. aegypti* pode ser encontrado em todo o território nacional (Figura 2) (BISSET, 2002; WHO, 2009; VONTAS, *et al.*, 2012). Segundo o Ministério da Saúde (2016), a região Sudeste registrou o maior número de casos possíveis

de dengue (841.286 casos; 59,0%), seguido das regiões Nordeste (310.161 casos; 21,8%), Centro-Oeste (163.501 casos; 11,5%), Sul (73.565 casos; 5,2%) e Norte (37.492 casos; 2,6%).

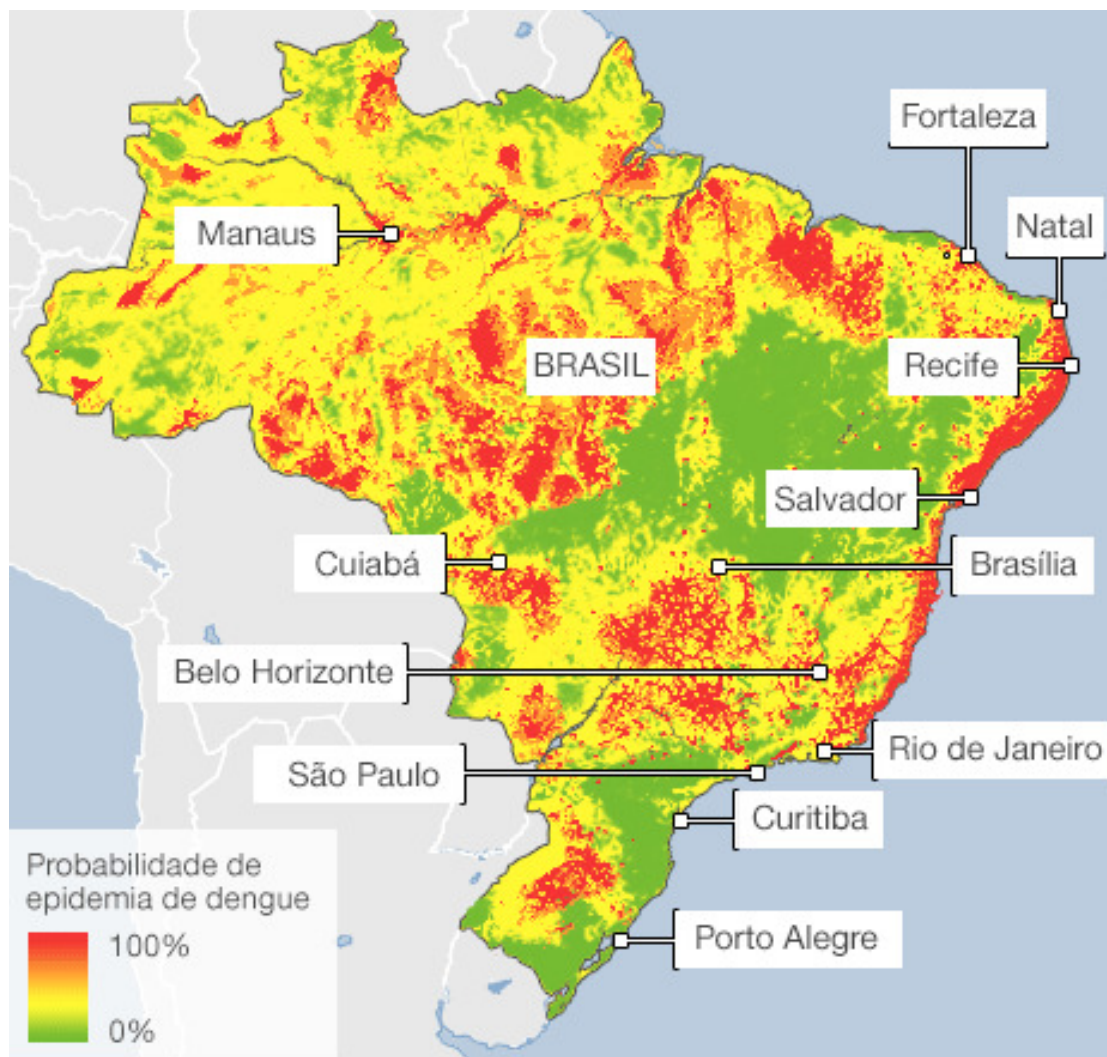
Por possuir as fases de desenvolvimento ovo, larva, pupa e mosquito, o *Ae. aegypti* é considerado um inseto holometábolo com um ciclo de vida de 2 a 4 semanas. Contudo, somente as fêmeas sugam sangue e têm a capacidade de transmitir as doenças (Figura 3) (MARICOPA, 2006; WHO, 2011; PONTUAL *et al.*, 2014).

Figura 1 - Países em áreas de risco de transmissão da dengue em 2016.



Fonte: Tilak *et al.*, 2016.

Figura 2 – Distribuição do mosquito *Aedes aegypti* e a probabilidade de epidemias no Brasil em 2013.

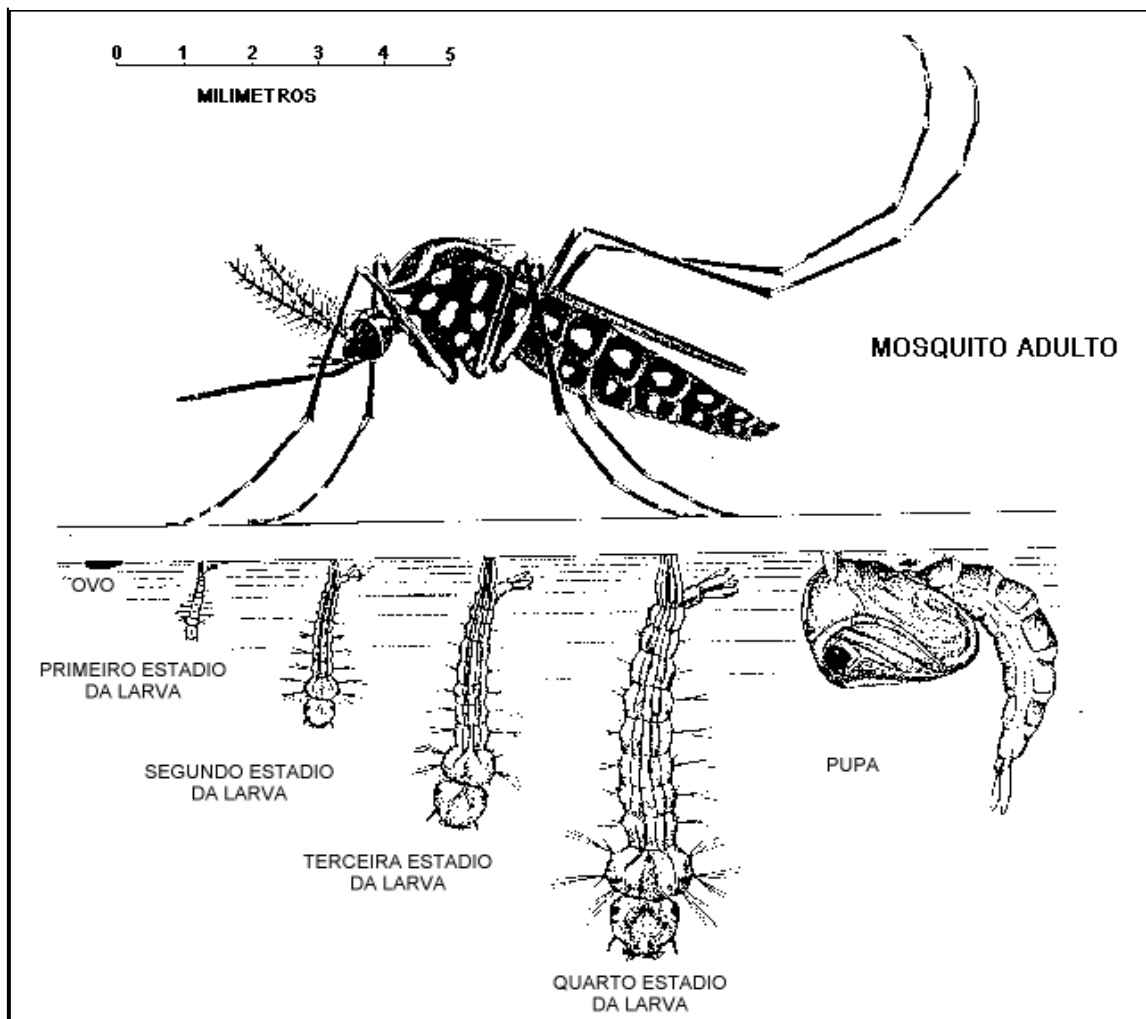


Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Ao contrário dos machos que se alimentam apenas de seiva de árvores, as fêmeas se alimentam de sangue dos vertebrados, de preferência pelo sangue do ser humano. A ingestão de sangue estimula uma série de alterações na fêmea induzindo a ovoposição. O sangue é necessário devido à presença de diversas substâncias como, aminoácidos e serino proteínas, para produção do vitelo dos ovos. Para a digestão dos nutrientes, o inseto dispõe de um arsenal de enzimas proteolíticas em todo seu ciclo de vida. São encontradas, principalmente, proteases serínicas, sendo estas, tripsinas e quimotripsina (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001; BRACKNEY *et al.*, 2010).

Após a digestão e absorção dos nutrientes para a ovoposição, o mosquito procura principalmente locais com acúmulo de água, como vasilhas, pneus, vasos, entre outros. As larvas passam por quatro estádios (L1 – L4). Durante esse estágio de aproximadamente 7 dias, elas são filtradoras e não fazem seleção de seu alimento até virar pupa, onde permanecem nessa fase por 2 dias até sofrer metamorfose para o mosquito adulto (; FOSTER; WALKER, 2002;).

A dengue pode ser contraída através da picada do mosquito fêmea, quando esta previamente alimentou-se de sangue humano infectado (WHO, 2016). É descrito na literatura que os vírus mantêm uma relação direta e indireta com a microbiota intestinal do inseto. A microbiota é de extrema importância para o inseto estando relacionada com nutrição, crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto. Além disso, a microbiota é altamente variável, apesar de haver uma diversidade limitada. Isso tem uma grande influência no fenótipo do vírus e funciona como um potente modulador para a competência do vetor em transmitir o patógeno. Assim, a microbiota é capaz de intervir na capacidade populacional vetorial com efeitos diretos na transmissão dos patógenos (PONTUAL *et al.*, 2014; HEGDE; RASGON; HUGHES, 2015).

Figura 3 - Ciclo de vida dos insetos do gênero *Aedes*.

Fonte: Unicamp (2010).

1.3 Controle dos insetos

1.3.1 Inseticidas químicos

Os grupos dos organoclorados, organofosforados e os piretroides, são os compostos mais utilizados nas últimas décadas no combate contra os vetores de doenças com ação sobre o sistema nervoso central (MARCOMBE *et al.*, 2011; BALDACCHINO, 2014; REILER *et al.*, 2015).

Os inseticidas à base de organoclorados foram os primeiros a serem usados no controle de insetos pragas, como, por exemplo, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). São formados por hidrocarbonetos clorados que têm ação sobre os canais de sódio, desestabilizando o equilíbrio iônico entre o sódio e o potássio, assim prejudicando as conexões nervosas. Entretanto, ao serem utilizadas como controle de insetos nos momentos de epidemia, em diversos países o seu uso passou a ser cada vez menor devido ao grande acúmulo no ambiente e efeitos colaterais nos seres humanos e em diversos animais (BRAGA; VALLE, 2007; VENIER; HITES, 2014; TSAI, 2014).

Já os inseticidas organofosforados apresentam fósforo na sua composição e vêm sendo utilizados desde 1950 em questões de saúde pública, apresentando vantagens em comparação aos organoclorados, pois são mais biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos dos seres vivos. Contudo, os organofosforados são muito tóxicos em vertebrados mesmo quando expostos a pequenas doses, podendo ser absorvidos e encontrados na placenta de mulheres grávidas (REILER *et al.*, 2015; ESPINOZA *et al.*, 2016).

Os inseticidas como os organofosforados atuam com a fosforilação e inibição da acetilcolinesterase. Esta enzima tem papel de quebra do neurotransmissor acetilcolina e sua inibição desestabiliza o sistema nervoso central, causando paralisia dos músculos e levando o inseto à morte (PAILAN *et al.*, 2015). Dentre os organofosforados, o temefós é um pesticida utilizado na agricultura e para o combate de mosquitos mundialmente. Entretanto, os surgimentos de populações resistentes já foram e estão sendo detectados devido ao uso desses compostos sintéticos (JIRAKANJANAKIT *et al.*, 2007; BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011; OCAMPO *et al.*, 2011; MAESTRE-SERRANO *et al.*, 2014).

Após o intenso uso de organofosforados, os piretroides sintéticos surgiram com o objetivo de substituí-los, pois são considerados mais estáveis e são produzidos a partir do piretro, extraído de crisântemos. São biodegradáveis, não acumulativos e possuem baixa

toxicidade para aves e mamíferos, quando comparados aos organofosforados. Entretanto, mesmo em dosagens baixas, a ação crônica dos piretroides pode causar grandes danos nos seres humanos e outros vertebrados. Atuando sobre os canais de sódio das membranas dos neurônios, como o DDT, eles afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto fazendo com que as células nervosas produzam descargas repetitivas e, eventualmente, causando paralisia. (BRAGA; VALLE, 2007; IMAI *et al.*, 2014; JAN *et al.*, 2015; VIEL *et al.*, 2015).

Devido ao aparecimento de grande quantidade de populações resistentes aos produtos químicos sintéticos, houve um crescimento na busca por novas alternativas de inseticidas naturais, com maior biodegradabilidade, que não poluam o meio ambiente e que causem o mesmo efeito tóxico para os insetos vetores. Alguns extratos de plantas podem ser considerados fitoinseticidas ou bioinseticidas, podendo servir como alternativas para realizar o controle dos mosquitos (FARIAS *et al.*, 2009; PONTUAL *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 2015).

1.3.2 Bioinseticidas

Como alternativa para o uso em excesso dos compostos químicos inseticidas durante décadas, o uso de fitoinseticidas tem surgido como promessa. Os bioinseticidas apresentam baixa ou moderada toxicidade para vertebrados, ação e biodegradação rápidas (COSIMI *et al.*, 2009; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014).

Os bioinseticidas ou fitoinseticidas são compostos resultantes do metabolismo primário ou secundário das plantas, como proteínas inativadoras de ribossomas (RIPs), óleos essenciais, lectinas, inibidores de enzimas proteolíticas, entre outros. Podem apresentar diferentes vias de ação para causar a morte do inseto, seja por atuar dificultando o crescimento, sobre o sistema nervoso central e/ou interferindo no metabolismo celular (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; WAHYUNI, 2014; PONTUAL *et al.*, 2014).

1.4 Proteínas vegetais com potencial inseticida

Durante a evolução, as plantas e insetos são seres vivos que estão continuamente interagindo. As plantas, por serem sésseis e predadas por insetos, desenvolveram diferentes meios químicos para combater os ataques dos insetos. Compostos esses com

um grande potencial para o combate de insetos pragas e vetores de doenças (QIN *et al.*, 2010; DANG; VAN DAMME, 2015).

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), como por exemplo, ricina, saporina S-6, são um grupo de proteínas que são capazes de inativar os ribossomos dos eucariotos. Embora o papel das RIPs não esteja completamente elucidado, essas proteínas apresentam um grande potencial para serem utilizadas como imunotoxinas para tumores, desenvolvimento de fitoinseticidas e desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a pragas. Elas atuam inativando os ribossomos e assim, comprometendo a síntese de proteína do organismo, causando falha no seu desenvolvimento e/ou a morte (YOULE; HUANG, 1973; FERRERAS *et al.*, 1993; TAMBURINO *et al.*, 2010; PIZZO *et al.*, 2015).

Assim como as RIPs, as lectinas pertencem a classe de proteínas produzidas por plantas que podem combater as ameaças predatórias dos insetos. Por definição, lectinas são proteínas com pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar, reversivelmente, a um mono ou oligossacarídeo específico. As lectinas podem ter função de reconhecimento, proteínas de reservas, entre outros. Sua ação em insetos predadores de plantas inclui a ligação de glicoconjugados que estão nas células do epitélio do trato digestório. Portanto, são inúmeros os trabalhos que relatam, a desregulação no metabolismo, perda de peso, atraso do desenvolvimento, redução da fecundidade e levando-os a morte (SADEGHI *et al.*, 2006; SA *et al.*, 2009; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011; PAIVA *et al.*, 2011)

Outra classe de proteína bastante citada na literatura são os inibidores de proteases. Estes são proteínas ou peptídeos capazes de interagir e inibir a ação catalítica de enzimas proteolíticas. Podem ser encontrados nas plantas da família Fabaceae, Poacea e Solanaceae, principalmente em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva das famílias. Nas plantas, os inibidores de proteases atuam inibindo proteases endógenas, proteínas de reservas e defesa vegetal. E podem ser classificadas de acordo com as classes enzimáticas que inibem, quais sejam: inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas ou metaloproteases (MOLINA; ZAMORA; BLANCO-LABRA, 2010; CHEVREUIL *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2016). Podem ainda ser agrupados em famílias. As famílias mais estudadas e sobre as quais se tem mais conhecimento, são as famílias de Bowman-Birk e de Kunitz, entretanto são conhecidas as famílias Batata I e II, Abóbora, Cevada, Thaumatin-like e Ragi A1 (CHAN; ZHANG; NG, 2013).

1.4.1 Inibidores de proteases serínicas

Inibidores de proteases serínicas são amplamente distribuídos no reino vegetal e já foram descritos em muitas espécies de plantas, cereais, leguminosas e outras. Nas plantas, os inibidores estão relacionados com a defesa do vegetal, podem ter papel na germinação da semente, morte celular programada, entre outras. As famílias mais estudadas entre os inibidores de proteinases serínicas são as do tipo Bowman-Birk e Kunitz. Alguns exemplos são os inibidores BBI (*Bowman-Birk inhibitor*) e SBTI (*Soy bean trypsin inhibitor*), respectivamente, encontrados na soja (KUNITZ, 1946; BIRK, 1985; FRANCO *et al.*, 1999; SCARAFONI *et al.*, 2008; EL-LATIF, 2014).

Os inibidores pertencentes à família Bowman-Birk normalmente apresentam baixa massa molecular, variando de 6 a 9 kDa, sete pontes de dissulfeto intracadeia, têm dois domínios inibitórios reativos por molécula para enzimas similares à tripsina, quimotripsina, e elastase, podendo apresentar atividade simultaneamente ou não (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002; CARLI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014).

Já os inibidores do tipo Kunitz, em geral, apresentam uma massa molecular entre 18 e 24 kDa, formados por uma ou duas cadeias polipeptídicas com duas pontes dissulfeto, contendo baixa quantidade de resíduos de cisteína, um único sítio reativo, com atividade inibitória principalmente para tripsina, mas podem apresentar baixa atividade contra quimotripsina e, geralmente, apresentam resíduos de aminoácidos de arginina. Os inibidores deste grupo podem ser encontrados em diversas famílias de plantas como, Caricaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae e, particularmente, nas sementes de Fabaceae (OLIVEIRA *et al.*, 2012; RUFINO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014).

Ao se tratar de defesa vegetal, os inibidores de protease são capazes de interagir e se complexar com enzimas proteolíticas dos insetos, inibindo sua atividade catalítica, constituindo-se moléculas inseticidas com efeito crônico. A inibição das enzimas causa deficiência da digestão de proteínas promovendo, assim, um déficit nos aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento. Para contornar essa situação, os insetos promovem um aumento na produção de proteases para conseguir normalizar a digestão. Dessa forma, os inibidores de protease causam uma redução dos aminoácidos que seriam usados para crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos, podendo levá-los a morte. E já são relatados inibidores de proteases que interagem, inibem e retardam o desenvolvimento do *Ae. aegypti*, como RcTI, purificado de *Ricinus communis* e o LTI de

sementes de *Leucena leucocephala* (ANDERSON *et al.*, 2012; DANTZGER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; ALMEIDA FILHO *et al.*, 2016).

1.5 Leguminosas

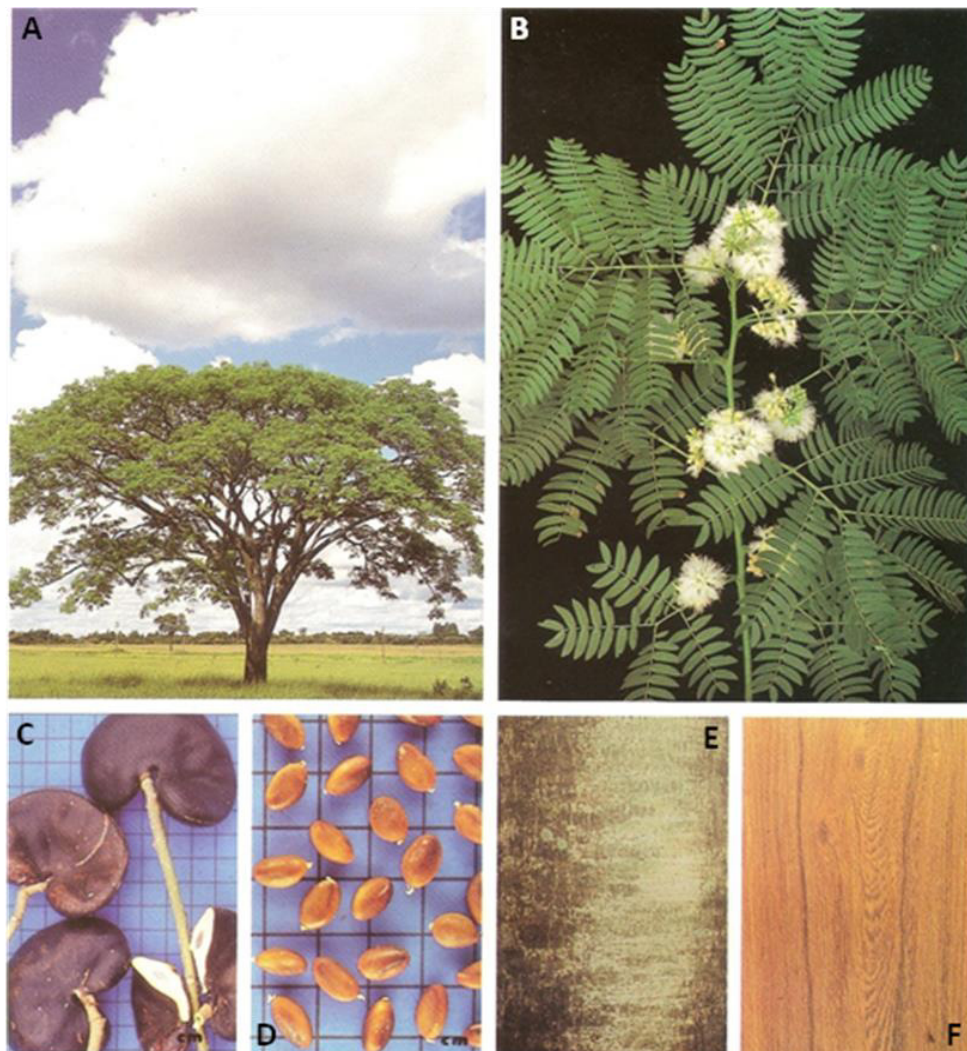
1.5.1 *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong. é uma planta popularmente conhecida como orelha-de-negro, orelha-de-macaco, tamboril, timbaúba, timboúva, dentre outros. Essa espécie apresenta duas sinonímias botânicas: *Mimosa contortisiliqua* Vell. e *Enterolobium timbouva* Mart e é pertencente à família Fabaceae (LORENZI, 1998).

E. contortisiliquum é uma planta de porte arbóreo (Figura 4), apresenta uma altura média de 20 a 25 metros, com o tronco variando de 80 a 160 centímetros, com folhas compostas, bipinadas. A madeira é muito usada para construção de barcos, brinquedos, caixotes, entre outras. A copa é frondosa, as flores possuem capítulos globosos esbranquiçados e reúnem-se em cachos terminais ou axiliares e possui uma vagem dura, lenhosa, indeiscente, preta, reniforme similar a uma orelha. As sementes são dormentes, isto é, não germinam mesmo quando os fatores abióticos necessários ao processo de germinação (água, luz, oxigênio etc.) são favoráveis. Esta é uma árvore nativa do Brasil com ampla distribuição geográfica. No Nordeste brasileiro, ocorre em área de Caatinga e, particularmente no Ceará, distribui-se desde o litoral até o sertão (BRAGA, 1982; LORENZI, 1998; SOWEMIMO *et al.*, 2015).

Para *E. contortisiliquum*, são inúmeros os trabalhos relatando moléculas biotivas presentes nas suas sementes e/ou com potencial para aplicação biotecnológica. As sementes de *E. contortisiliquum* apresentam um inibidor de tripsina do tipo Kunitz (EcTI) com atividade biológica contra fungos e insetos (BATISTA *et al.*, 1996). Além disso, o mesmo inibidor mostrou-se capaz de inibir o crescimento *in vitro* de diversas linhagens de células tumorais (NAKAHATA *et al.*, 2011; ROCHA-BEZERRA, 2014). Segundo Carvalho e colaboradores (2011), a orelha-de-macaco também possui um grande potencial nutricional das sementes, com uma alta quantidade de fibra alimentar e um alto percentual de proteína total com bom perfil de aminoácidos essenciais.

Figura 4 – Imagens de *Enterolobium contortisiliquum*. A: planta adulta; B: folhas e flores; C: frutos; D: sementes; E: tronco; F: madeira



Fonte: Lorenzi (2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de um inibidor de tripsina presente nas sementes de *Enterolobium contortisiliquum* quanto às suas ações inseticidas e bactericidas.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar o inibidor de tripsina das sementes de *E. contortisiliquum*;
- Avaliar o efeito do inibidor de tripsina de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* sobre o desenvolvimento do mosquito vetor da dengue;
- Determinar a concentração letal média (CL₅₀) do inibidor para as larvas do mosquito *Ae.aegypti*;
- Avaliar a atividade inibitória *in vitro* das proteases oriundas do homogenato dos intestinos de larvas L4 do *Ae. aegypti*;
- Obter a cultura de bactérias oriundas do intestino das larvas L4 do *Ae.aegypti*;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para bactérias dos intestinos de larvas L4 de *Ae.aegypti*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do inibidor de proteases de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*

A coleta das sementes de *E. contortisiliquum* foram feitas na fazenda “Não me Deixes” em Quixadá-CE. Para identificação, um ramo de folhas, flores e frutos, foram depositados no Herbário Prisco Bezerra (EAC) da Universidade Federal do Ceará com o código de EAC 38.115.

A obtenção dos inibidores de *E. contortisiliquum* foi realizada seguindo a metodologia descrita por Rocha-Bezerra (2014), com modificações. Para tanto, as sementes foram retiradas de suas vagens e moídas em moinho industrial. Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm² e colocada em estufa a 45 °C por 72 h para obtenção de um material mais homogêneo e livre de umidade. Os procedimentos descritos a seguir foram realizados com a farinha desengordurada, a qual foi obtida através de extração com n-hexano, na proporção de 1:3 (m/v). A farinha foi deixada em contato com o solvente *overnight* e este substituído por um novo, totalizando quatro trocas de solvente.

O solvente foi desprendido da farinha por evaporação em capela de exaustão à temperatura ambiente. ONDE FORAM OBTIDAS AS SEMENTES.

A farinha desengordurada das sementes de *E. contortisiliquum* foi submetida à extração em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, na proporção 1:10 (m/v) sob agitação constante por 3 h, à temperatura ambiente. O material foi filtrado em tecido de nylon e, em seguida, submetido à centrifugação a 10.000 x g, por 30 min, a 4 °C. O material precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado EcEB, utilizado para a realização dos procedimentos descritos adiante.

Ao extrato bruto (EcEB) foi adicionada solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% até atingir concentração final de 5% (F5). A fração foi dialisada contra água destilada por 72h com trocas a cada 4h e, posteriormente, liofilizada. A fração liofilizada foi solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e aplicada em uma coluna cromatográfica de troca iônica dietilaminoetanol (DEAE) ligado à Sepharose, equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas não retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio enquanto que a proteínas adsorvidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo NaCl 200 mM.

O pico obtido da cromatografia de troca iônica foi aplicado em uma coluna de afinidade contendo tripsina acoplada à Sepharose 4B, onde as proteínas não retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) e o material retido (EcTI) foi eluído com ácido clorídrico (HCl) 50 mM. Todos os procedimentos cromatográficos foram acompanhados por leitura a 280 nm em espectrofotômetro.

3.2 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas solúveis foi feita pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Assim, 100 µL das amostras foram adicionados a 2,5 mL do reagente de Bradford. Em seguida, a solução foi agitada levemente e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência na curva padrão.

3.3 Eletroforese dos passos de obtenção

Os géis de eletroforese de poliacrilamida contendo SDS foram realizados de acordo com Laemmli (1970), adaptadas para o uso de géis de separação em placas. As proteínas dos extratos proteicos brutos, frações proteicas obtidas por precipitações com TCA, pico não adsorvido a matriz de afinidade com tripsina acoplada e o inibidor, EcTI foram dissolvidos em tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1 % e azul de bromofenol (0,02 %). O sistema descontínuo foi composto por géis de concentrações contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1%, e géis de separação contendo 15% de poliacrilamida em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1 %.

3.4 Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica

Para os ensaios de inibição enzimática foi utilizada a metodologia proposta por Erlanger et al. (1961), com modificações. As soluções enzimáticas de tripsina e quimotripsina foram incubadas com o extrato bruto e suas frações por 15 min, e então a reação foi iniciada com adição de azocaseína 1%. Decorridos 30 min, a reação foi interrompida ao se adicionar 300 µL TCA 20%. O ensaio foi monitorado pela formação de produtos derivados da clivagem da azocaseína após alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, através de leitura das absorbâncias a 440 nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (%) e atividade específica (UI/mg de proteína).

3.5 Atividades contra *Aedes aegypti*

3.5.1 Obtenção dos insetos

As larvas *Ae. aegypti*, foram obtidas da colônia de mosquitos mantida no Insetário de Culicídeos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec). As larvas utilizadas nas atividades biológicas foram mantidas em bandejas de plástico (30 cm x 45 cm) contendo água declorinada, sendo alimentadas em dias alternados com ração para tartaruga (Reptolife, Alcon®, Camboriú, Brasil), com umidade do ambiente de 70 - 80%, temperatura 27 – 30 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro.

3.5.2 Atividade inibitória *in vitro* do inibidor de protease contra as proteases intestinais de larvas de *Ae. aegypti*

A inibição das enzimas digestivas de larvas de *Ae. aegypti* foi feita a partir do homogenato dos intestinos de larvas de 4º estágio, fonte das proteases. Os sistemas digestórios de cerca de 250 larvas foram dissecados em banho de gelo e transferidos para microtubos contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Em seguida, os intestinos foram macerados e centrifugados a 10.000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20 °C para futuro uso. Para o ensaio, uma alíquota de 100 µL (solução enzimática) do homogenato foi incubada, por 15 min a 37 °C, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20 mM, e 50 µL do EcEB e EcTI. A reação foi iniciada adicionando-se 200 µL de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Após 30 min, a reação foi parada adicionando-se 300 µL de solução de ácido tricloroacético 20% (TCA). Ao final, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 min e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 M na proporção 1:1 (v/v) e realizada a leitura das absorvâncias a 440 nm.

3.5.3 Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀)

O ensaio de atividade larvicida contra *Ae. aegypti* foi realizado como descrito em Farias e colaboradores (2009). Dez larvas em 3º estágio foram coletadas com pipetas Pasteur, colocadas em papel filtro para remover o excesso de água e então transferidas com um pincel para tubos de ensaio de 10 mL contendo, cada um, 5 mL das soluções aquosas dos inibidores a serem testados, a maior concentração utilizada será 1.000 µg/mL, seguida de diluições seriadas até a concentração de 62 µg/mL. Os testes foram realizados em condições ideais, temperatura 27 °C ± 2, umidade 70% ± 15 e fotoperíodo 12h de luz. Como controle negativo foi utilizada apenas água destilada. Para o cálculo da CL₅₀ os dados de mortalidade obtidos foram utilizados.

3.5.4 Efeito dos inibidores de proteases sobre o desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*

A avaliação do efeito do inibidor de tripsina de *E. contortisiliquum* sobre a eclosão de ovos de *Ae. aegypti* foi realizada de acordo com Almeida Filho (2013). Dez ovos foram

inseridos em tubos de ensaio de 10 mL contendo solução dos inibidores em concentração de 710 µg/mL em água destilada. Foram utilizados como controles albumina sérica bovina (BSA) e água destilada, sendo o primeiro na concentração de 1.000 µg/mL. Foram realizadas 10 repetições para os grupos experimentais. Às soluções foi acrescido 1% de etanol para evitar a proliferação de microrganismos.

Foi realizada, também, a contagem diferencial das larvas diariamente e depois de 3 dias ocorreu a renovação da solução e adição de 5 mg de ração pulverizada aos tubos. Ao fim de 2 dias, foi contabilizada a taxa de eclosão e ao fim de 5 dias calculadas as taxas de mortalidade e desenvolvimento larval dos grupos.

3.6 Atividade sobre as bactérias do intestino das larvas de *Ae. aegypti*

3.6.1 Obtenção das bactérias

As bactérias foram obtidas de intestinos médios de larvas de *Ae. aegypti* de 4º estágio, oriundas do insetário do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais e a cultura bacteriana mantida no Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, ambos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

3.6.2 Cultivo das bactérias

A cultura de bactérias foi obtida dos intestinos médios de larvas de 4º estágio de *Ae. aegypti* de acordo com o método descrito por Apte-Deshpande e colaboradores (2012). As larvas foram superficialmente descontaminadas com uma rápida imersão (5 segundos) em etanol 70% e seus intestinos foram assepticamente dissecados. Grupos de 10 intestinos foram reunidos e homogeneizados manualmente em 0,1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, o homogenato foi adicionado em um Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo nutritivo (CN) e incubado sob agitação constante a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. Após a incubação, a concentração da colônia foi ajustada turbimetricamente para $10^5 - 10^6$ unidades formadoras de colônia utilizando a leitura em comprimento de onda de 600 nm como referência.

3.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima para bactérias do intestino de larvas de *Aedes aegypti* (CIM)

Para determinar a CIM, foi utilizada a metodologia de Pontual (2014). A suspensão de bactérias contendo $10^5 - 10^6$ UFC foi diluída (1:1.000) em caldo nutritivo. A 100 μ L das soluções do EcEB e do EcTI, com concentrações variando de 6.900 – 54 e 970 – 7,21 μ g/mL, respectivamente, foram diluídos em CN e foram adicionados 20 μ L da suspensão de bactérias do intestino médio das larvas. Em seguida, foi feita uma incubação a 37 °C por 24 horas, a densidade óptica foi mensurada ao comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro de microplaca. Os grupos controles correspondem à suspensão bacteriana na ausência dos inibidores. A concentração inibitória mínima (CIM) foi aquela capaz de reduzir $\geq 50\%$ das bactérias em comparação ao grupo controle. Dois ensaios independentes foram feitos em triplicata (AMSTERDAM, 1996).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A obtenção dos inibidores de *E. contortisiliquum* foi realizada seguindo a metodologia descrita por Rocha-Bezerra (2014). A presença de atividade inibitória de tripsina e quimotripsina foi confirmada para o EcEB, F5, P200 e EcTI oriundos de *E. contortisiliquum* (Tabela 1).

O EcEB, F5, P200 e EcTI foram utilizados para as atividades inibitória de tripsina. Entretanto, apenas o extrato bruto e o inibidor purificado foram utilizados para os ensaios referentes ao desenvolvimento das larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Além disso, EcTI apresentou uma baixa atividade inibitória de quimotripsina de cerca de 30% (1984,12 UI/mg). Existem diversos relatos da existência de inibidores de proteases em sementes da família Fabaceae e de sua ação sobre enzimas proteolíticas, a exemplo os inibidores de tripsina BmPI oriundo de *Butea monosperma* (JAMAL *et al.*, 2015) e o ApTI de *Adenanthera pavonina* (SASAKI, 2015).

Sabe-se que alguns sistemas digestivos de insetos das ordens Diptera e Lepidoptera são baseados em proteases serínicas (tripsina e quimotripsina). As amostras oriundas das sementes contendo os inibidores demonstram atividade inibitória de tripsina, quimotripsina e sobre o homogenato intestinal das larvas de *Ae. aegypti* quando avaliado *in vitro* (Tabela 1). Tal resultado possibilita sugerir novas abordagens quanto ao uso biotecnológico dessas moléculas. 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 (MACEDO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Ao analisar o perfil eletroforético das amostras oriundas das sementes, foi notada a predominância de uma grande diversidade de bandas proteicas para o extrato bruto, bandas predominantes de massas em torno de 20 kDa para a fração 5% e P200. Foi observada uma banda também na faixa de 20 kDa que representa o inibidor de tripsina (EcTI). Essas bandas com massas próximas a 20 kDa, sugerem que esses inibidores sejam do tipo Kunitz, os inibidores dessa família apresentam afinidade por estas enzimas, principalmente tripsina, e massa molecular aparente de 20 kDa. Outros autores já relataram a presença de inibidores como o PdKI-4 de *Pithecellobium dumosum* com massa de 21 kDa (RUFINO *et al.*, 2013), EATI isolado de *Entada acaciifolia* com massa de 20 kDa (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e IVTI com massa de 20 kDa isolado de sementes de *Inga vera* (BEZERRA *et al.* 2016).

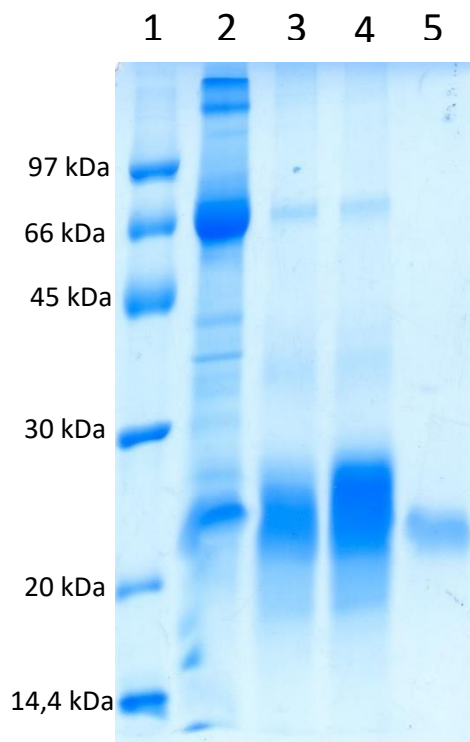
O processo de purificação se mostrou eficiente, uma vez que o fracionamento com TCA e a cromatografia em coluna matriz DEAE reduziram a variabilidade e concentraram as proteínas de baixa massa, próximas a 20 kDa. A raia 5 que contém o material proteico oriundo da cromatografia em coluna de afinidade, garante a pureza do material desejado, o inibidor EcTI, para os ensaios posteriores (Figura 5).

Tabela 1 - Atividade inibitória percentual e específica de tripsina e das proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti* do extrato proteico bruto (EB), Fração 5%, P200 e EcTI de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*.

Amostra	Atividade inibitória sobre tripsina		Atividade inibitória sobre as proteases intestinais das larvas	
	%	UI/mg de proteína	%	UI/mg de proteína
EB	40	5058,15	61	1410,33
F5	60,5	8692,72	ND*	ND
P200	42,9	7333,33	ND	ND
EcTI	58,2	14418,6	51,3	7738,09

ND* Não determinado.

Figura 5 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%). Da esquerda para direita, 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 kDa) alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2- Extrato bruto proteico de *Enterolobium contortisiliquum*; 3 – Fração 5% (F5); 4 – Pico Retido da troca iônica (P200); 5 – Inibidor de tripsina de *E. contortisiliquum*. Foram aplicados 12,5 µg de proteínas em cada poço e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R – 250.



A determinação da concentração letal média (CL_{50}) para as larvas de *A. aegypti* foi realizada através da diluição do EcEB e do EcTI de *E. contortisiliquum*. Foi encontrado um valor de CL_{50} de 519,56 $\mu\text{g/mL}$ para EcEB. Para EcTI, o valor deve ser superior à máxima concentração testada que correspondia a 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado não invalida seu potencial contra insetos, mas já é um indicativo de que o EcTI não possui efeito tóxico agudo sobre as larvas de *Ae aegypti*. O valor encontrado para o extrato bruto foi maior do que para o inibidor ApTI (200 $\mu\text{g/mL}$) de sementes de *Adenantha pavonina* (SASAKI *et al.*, 2015). Segundo Farias e colaboradores (2009), uma possível explicação para o extrato bruto apresentar uma CL_{50} menor do que EcTI pode ser que além de inibidores de proteases, EcEB pode contar com a presença de outras proteínas e metabólitos secundários que juntos garantiram uma concentração letal menor do que a do EcTI. Outros trabalhos relatam a presença de atividade larvicida de óleos essenciais e extratos de plantas (KABIR *et al.*, 2013; KOODALINGAM, MULLAINADHAN, ARUMUGAM, 2013). Contudo, são poucos os que apresentam atividade larvicida relacionada a proteínas.

Apesar do EcTI não ter demonstrado toxicidade aguda, as atividades inibitórias de proteases do homogenato dos intestinos das larvas sugeriram que o EcTI fosse avaliado quanto à eclosão dos ovos e o desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti* eclodidas em solução contendo o inibidor com concentração de 710 $\mu\text{g/mL}$ durante 5 dias. Foram utilizados como controles água destilada e uma solução de albumina sérica bovina (BSA) com concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. O inibidor de tripsina não foi capaz de impedir a eclosão das larvas. Assim, as larvas que eclodiram no 1º dia permaneceram incubadas nas respectivas soluções e alimentadas com ração. Até o 5º dia, as larvas incubadas com EcTI permaneceram em 2º estágio (Figura 7), enquanto que os controles negativos (água e BSA) apresentaram larvas de 4º estágio.

As enzimas dos insetos são consideradas clones semelhantes aos dos vertebrados. Vários inibidores de proteases possuem a capacidade de diminuir o desenvolvimento e a sobrevivência de vários insetos, como o PFTI de *Plathymenia foliolosa* e BmPI de *Butea monosperma* interferindo no desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* e *Helicoverpa armigera*, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2009; JAMAL *et al.*, 2015). Apesar do inibidor de tripsina (EcTI) possuir um valor de CL_{50} acima da concentração máxima testada, este foi capaz de retardar o desenvolvimento das larvas a partir da eclosão.

Embora inibidores de tripsina, em geral, não causem toxicidade aguda a insetos, têm sido relatados efeitos deletérios relacionados à ingestão crônica dessas moléculas

(PONTUAL *et al.*, 2012). A mortalidade dos insetos pode ser causada por um dos mecanismos de ação dos inibidores de proteases. Os insetos aumentam a expressão de enzimas proteolíticas, como tripsina, para tentar manter a homeostase enzimática do seu trato digestivo. Contudo enzimas são ricas em aminoácidos essenciais para a síntese proteica, tais como os aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), logo esse aumento na expressão de proteases leva a uma limitação da disponibilidade desses aminoácidos comprometendo a síntese de outras proteínas, podendo causar retardo no desenvolvimento, afetar funções vitais e possivelmente levar o inseto a morte (RAMOS *et al.*, 2009). Almeida Filho e colaboradores (2016), purificaram um inibidor de protease (LTI) oriundo de sementes de *Leucena leucocephala* que causou o retardo e mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*. Bioatividades como estas podem sugerir alternativas no combate de insetos de vetores de doenças.

Figura 6 – Concentração letal mínima (CL₅₀) para matar 50% de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do extrato bruto (EcEB) extraído em água de farinha desengordurada de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*.

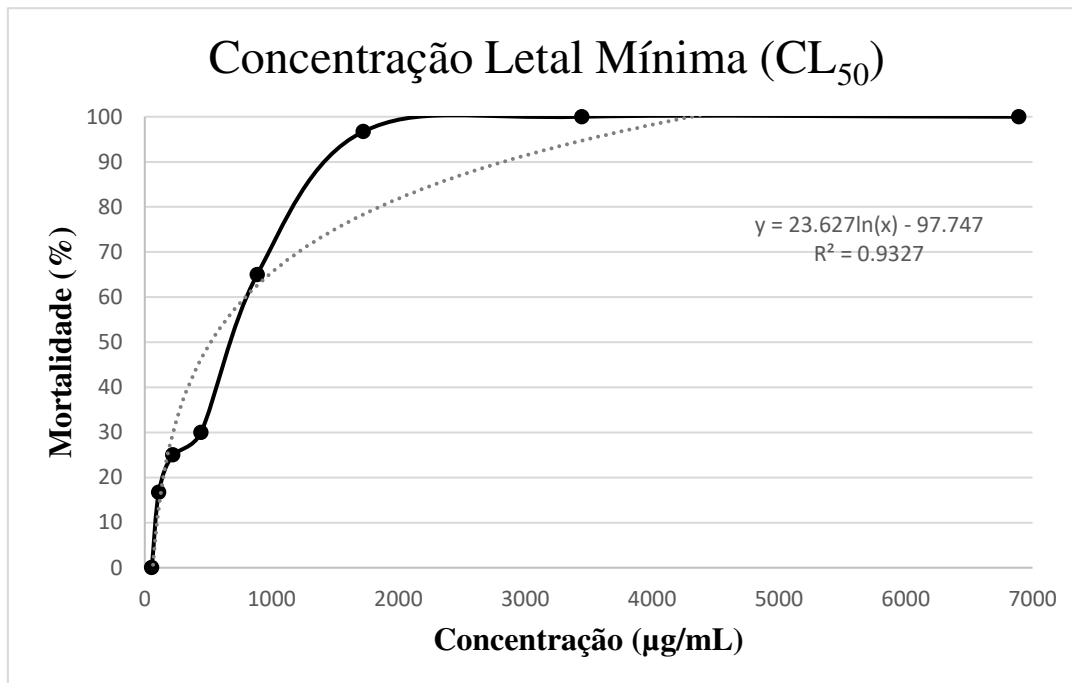


Figura 7 – Aspectos morfológicos das larvas de *Aedes aegypti* após 5 dias de incubação incubadas em solução de BSA e EcTI. Em (A) as larvas em 4^o estágio em solução de BSA com concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ e (B) as larvas em 2^o estágio presentes na solução de EcTI na concentração de 710 $\mu\text{g/mL}$. A barra corresponde a 1 mm.



A determinação da concentração inibitória mínima para bactérias do intestino de larvas de *Aedes aegypti* (CIM) foi realizada de acordo com Pontual (2014) com algumas modificações, onde as densidades das bactérias foram mensuradas em um comprimento de onda de 600 nm. Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) com um $P < 0,01$. O extrato bruto e o EcTI foram solubilizados em caldo NB (*Nutritive Broth*) para verificar a capacidade de inibição de crescimento das bactérias. As concentrações do EcEB variaram entre 6900 – 54 $\mu\text{g/mL}$, enquanto para EcTI variaram entre 970 – 7,21 $\mu\text{g/mL}$. Ambos, o EcEB e o EcTI, não apresentaram uma atividade bactericida. Entretanto, o inibidor de tripsina de *E. contortisiliquum* mostrou atividade bacteriostática, com capacidade de inibir o crescimento das bactérias a partir da concentração de 242 $\mu\text{g/mL}$.

Já é relatado na literatura que as bactérias do intestino das larvas de *Ae. aegypti* estão diretamente relacionadas à susceptibilidade para o vírus da dengue, da zika, da chikungunya e outros patógenos. Um efeito deletério na microbiota das larvas pode afetar negativamente a susceptibilidade e transmissão do vírus pelos insetos. O EcTI mostrou atividade bacteriostática em concentrações a partir de 242 $\mu\text{g/mL}$. Assim como o inibidor de tripsina de *E. contortisiliquun*, o inibidor MoFTI oriundo de *Moringa oleífera* também mostrou capacidade bacteriostática na concentração de 31 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, o MoFTI teve uma atividade bactericida na concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Essas atividades dos inibidores de proteases de inibirem o crescimento e causar mortalidade das bactérias podem estar relacionadas ao fato de inibirem as proteases microbianas e/ou interações com as proteínas de membranas do citoplasma que danificam a permeabilidade destas bactérias. Assim, estes podem ser utilizados para diminuição da susceptibilidade e na transmissão do vírus pelo inseto (MOURYA *et al.*, 2002; PONTUAL *et al.*, 2014).

5 CONCLUSÃO

O inibidor de tripsina, EcTI, se mostrou eficaz em inibir proteases intestinais das larvas de *Aedes aegypti*, sendo capaz de retardar seu desenvolvimento. Além disso, EcTI foi considerado bacteriostático em relação às bactérias dos intestinos das larvas. Portanto, EcTI possui um grande potencial de utilização como inseticida alternativo no combate do vetor *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO, L. C. P. **Efeito de inibidores de tripsina obtidos de sementes de *Leucaena leucocephala* (lam) r. de witt sobre o desenvolvimento de *Aedes aegypti*.** 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ALMEIDA FILHO, L.C.; DE SOUZA, T.M.; TABOSA, P.; SOARES, N.G.; ROCHA-BEZERRA, L.C.; VASCONCELOS, I.M.; CARVALHO, A.F. Trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegypti*, a multiple-disease vector. **Pest Management Science**, 2016.

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

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 4, pp.61-143, 1996.

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.

APTE-DESHPANDE, A.; PAINGANKAR, M.; GOKHALE, M.D.; DEOBAGKAR, D.N. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. **PLoS One**, 7(7), p.e40401, 2012.

BALDACCHINO, F., CAPUTO, B., CHANDRE, F., DRAGO, A., DELLA TORRE, A., MONTARSI, F. AND RIZZOLI, A. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, 71(11), pp.1471-1485, 2015.

BA-OMAR, T. A., AL-JARDANI, S., VICTOR, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). **Tissue and Cell**, 43(1), 29-38, 2011.

BATISTA, I. F. C.; OLIVA, M. L. V.; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, U. M.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. M. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1017-1022, 1996.

BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin-and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 25(2), pp.113-131, 1985.

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

BRACKNEY, D.E.; ISOE, J.; BLACK, W.C.; ZAMORA, J.; FOY, B.D.; MIESFELD, R.L.; OLSON, K.E. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, 56(7), pp.736-744, 2010.

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.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3º edição comemorativa ao II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. v. XLII, 3ª.ed. Mossoró: Coleção Morossoense, 1982.

BRUNIER, L., POLOMAT, K., DELIGNY, C., DEHLINGER, V., NUMÉRIC, P., JEANBAPTISTE, G., ARFI, S. AND DE BANDT, M. Chikungunya virus infection in patients on biotherapies. **Joint Bone Spine**, 2016.

CARLI, A. P.; VIEIRA, P.M.A.; SILVA, K.T.S.; COTA, R.G.S.; CARNEIRO, C.M.; CASTRO-BORGES, W.; ANDRADE, M.H.G. Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectal pre neoplasias induced by 1, 2-dimethylhydrazine in Swiss mice. **Food and Chemical Toxicology**, 50(5), pp.1405-1412, 2012.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40(11), 1515-1539, 2002.

CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SOUSA, N. M.; CAVALHEIRO, M. G.; FERNANDES, G. S.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M.; GOUVEIA, S. T.; MACHADO, O. L. T. Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 487-493, 2011.

CHAN, Y.S.; ZHANG, Y.; NG, T.B. Brown kidney bean Bowman–Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 169(4), pp.1306-1314, 2013.

CHEN, H. L., TANG, R. B. Why Zika virus infection has become a public health concern? **Journal of the Chinese Medical Association**, 79(4), 174-178, 2016.

CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. **Food chemistry**, 154, pp.108-116, 2014.

CHEVREUIL, L.R.; GONÇALVES, J.F.D.C.; CALDERON, L.D.A.; SOUZA, L.A.G.D.; PANDO, S.C. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (Fabaceae). **Hoehnea**, 41(2), pp.181-186, 2014.

COSIMI, S., ROSSI, E., CIONI, P. L., CANALE, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). **Journal of Stored Products Research**, 45(2), 125-132, 2009.

COUDERC, T., LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antiviral Research**, 121, 120-131, 2015.

DANG, L., VAN DAMME, E. J. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, 117, 51-64, 2015.

DANTZGER, M.; VASCONCELOS, I.M.; SCORSATO, V.; APARICIO, R.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, 118, pp.224-235, 2015.

BEZERRA, C. S.; DE OLIVEIRA, C.F.R.; MACHADO, O.L.T.; DE MELLO, G.S.V.; DA ROCHA PITTA, M.G.; DE MELO RÊGO, M.J.B.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; RIBEIRO, S.D.F.F.; GOMES, V.M.; SILVA, O.N. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, 51(6), pp.792-803, 2016.

SOUZA, D.D.; BRANDÃO-COSTA, R.M.P.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; PORTO, A.L.F. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds. **South African Journal of Botany**, 104, pp.30-34, 2016.

DEBLAUWE, I., SOHIER, C., SCHAFFNER, F., RAKOTOARIVONY, L. M., COOSEMANS, M. Implementation of surveillance of invasive mosquitoes in Belgium according to the ECDC guidelines. **Parasites & Vectors**, 7, 201, 2014.

DICK, G. W. A., KITCHEN, S. F., HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 46(5), 509-520, 1952.

EL-LATIF, A.O.A. In vivo and in vitro inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 116, pp.40-48, 2014.

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, 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, p. 203–221. ago. 2008.

ESPINOZA, M.; OSIMANI, V.R.; SÁNCHEZ, V.; ROSENBAUM, E.; GUIÑAZÚ, N. B-esterase determination and organophosphate insecticide inhibitory effects in JEG-3 trophoblasts. **Toxicology in Vitro**, 32, pp.190-197, 2016.

FARIAS, D.F., CAVALHEIRO, M.G., VIANA, M.P., QUEIROZ, V.A., ROCHA-BEZERRA, L.C., VASCONCELOS, I.M., MORAIS, S.M., CARVALHO, A.F. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 82(3), pp.585-594, 2009.

FERRERAS, J., BARBIERI, L., GIRBÉS, T., BATTELLI, M.G., ROJO, M.A., ARIAS, F.J., ROCHER, M.A., SORIANO, F., MENDÉZ, E., STIRPE, F. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L.(Caryophyllaceae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, 1216(1), pp.31-42, 1993.

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

FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., MELO, F.R., BLOCH JR., C., SILVA, C.P; GROSSI DE SÁ, M.F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **Plant Molecular Biology**, 1999.

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.

HEGDE, S.; RASGON, J.L.; HUGHES, G.L. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. **Current Opinion in Virology**, 15, pp.97-102, 2015.

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

IMAI, K., YOSHINAGA, J., YOSHIKANE, M., SHIRAISHI, H., MIENO, M.N., YOSHIKE, M., NOZAWA, S., IWAMOTO, T. Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men. **Reproductive Toxicology**, 43, pp.38-44, 2014.

JAMAL, F.; PANDEY, P.K.; SINGH, D.; AHMED, W. A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. **Process Biochemistry**, 50(2), pp.311-316, 2015.

JAN, M. T., ABBAS, N., SHAD, S. A., SALEEM, M. A. Resistance to organophosphate, pyrethroid and biorational insecticides in populations of spotted

- bollworm, *Earias vittella* (Fabricius)(Lepidoptera: Noctuidae), in Pakistan. **Crop Protection**, 78, 247-252, 2015.
- JIRAKANJANAKIT, N., SAENGTHARATIP, S., RONGNOPARUT, P., DUCHON, S., BELLEC, C., YOKSAN, S. Trend of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes in Thailand during 2003–2005. **Environmental Entomology**, 36(3), 506-511, 2007.
- KABIR, K.E.; CHOUDHARY, M.I.; AHMED, S.; TARIQ, R.M. Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 90, pp.52-60, 2013.
- KARUNGI, J.; ADIPALA, E.; OGENGA-LATIGO, M. W.; KYAMANYAWA, S.; OYOBO, N.; JACKAI, L.E.N. Pest management in cowpea. Part 2. Integrating planting time, plant density & insecticide application for the control of cowpea field pests in eastern Uganda. **Crop Protection**, v.19, p. 237-245, 2000.
- KOODALINGAM, A.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Immuno-suppressive effects of aqueous extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on the larvae and pupae of vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Acta tropica**, 126(3), pp.249-255, 2013.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**, 29(3), pp.149-154, 1946.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, ago. 1970.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 2, 2ª ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.
- MACEDO, M.L.R.; DURIGAN, R.A.; DA SILVA, D.S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M.D.G.M.; PARRA, J.R.P. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 73(4), pp.213-231, 2010
- MAESTRE-SERRANO, R.; GOMEZ-CAMARGO, D.; PONCE-GARCIA, G.; FLORES, A. E. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 116, 63-73, 2014.
- MARCOMBE, S., DARRIET, F., AGNEW, P., ETIENNE, M., YP-TCHA, M. M., YÉBAKIMA, A., CORBEL, V. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, 84(1), 118-126, 2011.
- 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 17 de agosto de 2016.

METZ, S. W., PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, 107, S16-S30, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Secretária de Vigilância em Saúde**. Vol 47. No. 33, 2106.

MOLINA, D.; ZAMORA, H.; BLANCO-LABRA, A. An inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds effective against aspartic proteases from *Hypothenemus hampei*. **Phytochemistry**, 71(8), pp.923-929, 2010.

MOURYA, D.T.; PIDDIYAR, V.; PATOLE, M.S.; GOKHALE, M.D.; SHOUCHE, Y.S. Effect of midgut bacterial flora of *Aedes aegypti* on the susceptibility of mosquitoes to dengue viruses. **Dengue Bull**, 26, pp.190-194, 2002.

NAKAHATA, A.M.; MAYER, B.; RIES, C.; DE PAULA, C.A.A.; KAROW, M.; NETH, P.; SAMPAIO, M.U.; JOCHUM, M.; OLIVA, M.L.V. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Biological Chemistry**, 392(4), pp.327-336, 2011.

NYARI, N., MANN, H. S., SHARMA, S., PANDEY, S. N., DHOLE, T. N. Identification and genetic characterization of chikungunya virus from *Aedes* mosquito vector collected in the Lucknow district, North India. **Acta Tropica**, 158, 117-124, 2016.

OCAMPO, C. B., SALAZAR-TERREROS, M. J., MINA, N. J., MCALLISTER, J., BROGDON, W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. **Acta tropica**, 118(1), 37-44, 2011.

OLIVEIRA, C.F.R.; VASCONCELOS, I.M.; APARICIO, R.; FREIRE, M.D.G.M.; BALDASSO, P.A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, 47(6), pp.929-935, 2012.

OLSON, K. E., BLAIR, C. D. Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. **Current Opinion in Virology**, 15, 119-126, 2015.

PAILAN, S., GUPTA, D., APTE, S., KRISHNAMURTHI, S., SAHA, P. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 103, 191-195, 2015.

PAIVA, P.M., SANTANA, G.M., SOUZA, I.F., ALBUQUERQUE, L.P., AGRANETO, A.C., ALBUQUERQUE, A.C., LUZ, L.A., NAPOLEÃO, T.H. AND COELHO, L.C. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on

survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65(7), pp.982-989, 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Malaria key facts**. Washington DC, 2014. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9441%3A2014-small-bites-can-be-big-threats-experts-warn-on-world-health-day&catid=740%3Apress-releases&Itemid=1926&lang=en>. Acessado em: 22 março de 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Malaria key facts**. Washington DC, 2014. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493&Itemid=40232&lang=en>. Acessado em: 31 de março de 2016.

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, abr. 2011.

PIORKOWSKI, G., RICHARD, P., BARONTI, C., GALLIAN, P., CHARREL, R., LEPARC-GOFFART, I., DE LAMBALLERIE, X. Complete coding sequence of Zika virus from Martinique outbreak in 2015. **New Microbes and New Infections**, 11, 52-53, 2016.

PIZZO, E., ZANFARDINO, A., DI GIUSEPPE, A., BOSSO, A., LANDI, N., RAGUCCI, S., VARCAMONTI, M., NOTOMISTA, E., DI MARO, A. A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating protein of *Phytolacca dioica* L.: A new function of RIPs for plant defence? **FEBS Letters**, 589(19PartB), pp.2812-2818, 2015.

PONTUAL, E. V., DE LIMA SANTOS, N. D., DE MOURA, M. C., COELHO, L. C. B. B., NAVARRO, D. M. D. A. F., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P. M. G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**, 113(2), 727-733, 2014.

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. mar. 2012.

QIN, W., HUANG, S., LI, C., CHEN, S., PENG, Z. Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb.(Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro)(Coleoptera: Hispididae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 96(3), 132-139, 2010.

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

ROCHA BEZERRA, L. C. B. **Purificação, caracterização bioquímica e potencial quimiopreventivo de um novo inibidor de quimotripsina de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (vell.) morong.** 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

REILER, E., JØRS, E., BÆLUM, J., HUICI, O., CAERO, M. M. A., CEDERGREEN, N. The influence of tomato processing on residues of organochlorine and organophosphate insecticides and their associated dietary risk. **Science of the Total Environment**, 527, 262-269, 2015.

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

RUFINO, F.P.; PEDROSO, V.M.; ARAUJO, J.N.; FRANÇA, A.F.; RABÊLO, L.M.; MIGLILOLO, L.; KIYOTA, S.; SANTOS, E.A.; FRANCO, O.L.; OLIVEIRA, A.S. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. **Plant Physiology and Biochemistry**, 63, pp.70-76, 2013.

SÁ, R.A.; DE LIMA SANTOS, N.D.; DA SILVA, C.S.B.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; CAVADA, B.S.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.D.A.F.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 149(3), pp.300-306, 2009.

SADEGHI, A., VAN DAMME, E. J., PEUMANS, W. J., SMAGGHE, G. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, 67(18), 2078-2084, 2006.

SASAKI, D. Y., JACOBOWSKI, A. C., DE SOUZA, A. P., CARDOSO, M. H., FRANCO, O. L., MACEDO, M. L. R. Effects of proteinase inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds on short-and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, 112, 172-186, 2015.

SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Identification and characterization of a Bowman–Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. **Phytochemistry**, 69(9), pp.1820-1825, 2008.

SCHAFFNER, F., MEDLOCK, J. M., BORTEL, W. V. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, 19(8), 685-692, 2013.

SILVA, W.; FREIRE, M.D.G.M.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry**, 47(2), pp.257-263, 2012.

SILVA, R.G.; VASCONCELOS, I.M.; ACRÍSIO FILHO, J.U.B.; CARVALHO, A.F.; SOUZA, T.M.; GONDIM, D.M.; VARELA, A.L.; OLIVEIRA, J.T. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, 70, pp.48-55, 2015.

SOUZA, D.D.; BRANDÃO-COSTA, R.M.P.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; PORTO, A.L.F. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds. **South African Journal of Botany**, 104, pp.30-34, 2016.

SOWEMIMO, A.; VENABLES, L.; ODEDEJI, M.; KOEKEMOER, T.; VAN DE VENTER, M.; HONGBING, L. Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.(Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 159, pp.257-261, 2015.

TILAK, R.; RAY, S. C. S.; TILAK, M. G. V. W.; MUKHERJI, A. C. S. Dengue, chikungunya ... and the missing entity – Zika fever: A new emerging threat. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, p. 157-163, 2016.

TAMBURINO, R., PIZZO, E., DI MARO, A., TEDESCHI, F., FICCA, A. G., POERIO, E. High cytotoxic activity of a bifunctional chimeric protein containing a ribosome inactivating protein (RIP) and a serine protease inhibitor (WSCD). **Journal of Biotechnology**, 150, 498, 2010.

TSAI, W. T. Organochlorine insecticides. **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**, vol 3, pp 301–302, 2014.

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

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, 72(13), 1538-1550, 2011.

VASILAKIS, N., TESH, R. B. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. **Current Opinion in Virology**, 15, 69-74, 2015.

VENIER, M.; HITES, R.A. DDT and HCH, two discontinued organochlorine insecticides in the Great Lakes region: isomer trends and sources. **Environment International**, 69, pp.159-165, 2014.

VIEL, J.F., WAREMBOURG, C., LE MANER-IDRISSI, G., LACROIX, A., LIMON, G., ROUGET, F., MONFORT, C., DURAND, G., CORDIER, S., CHEVRIER, C.

Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother–child cohort. **Environment International**, 82, pp.69-75, 2015.

VONTAS, J., KIOULOS, E., PAVLIDI, N., MOROU, E., DELLA TORRE, A., RANSON, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 104(2), 126-131, 2012.

WAHYUNI, D. New Bioinsecticide Granules Toxin from Ectract of Papaya (*Carica papaya*) Seed and leaf Modified Against *Aedes aegypti* larvae. **Procedia Environmental Sciences**, 23, 323-328, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition**. p. 160, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Washington DC, 2011. World malaria report. Geneva, Switzerland: World Health Organisation. Disponível <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/> acessado em: 17 de Agosto de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Washington DC, 2016. Dengue media centre: Dengue and Haemorrhagic Fever. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>> em 22 de março de 2016.

YOULE, R. J., HUANG, A. H. Protein Bodies from the Endosperm of Castor Bean Subfractionation, Protein Components, Lectins, and Changes during Germination. **Plant Physiology**, 58(6), 703-709, 1976.

ZOUBIRI, S., BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, 18(6), 925-938, 2014.