

EFEITO DE COMPONENTES PROTEICOS E
DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Ricinus communis* CONTRA
Leishmania amazonensis, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma*
gondii e *Aedes aegypti*

FRANCIANNE GALOSSO DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

FEVEREIRO – 2018

EFEITO DE COMPONENTES PROTEICOS E
DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Ricinus communis* CONTRA
Leishmania amazonensis, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma*
gondii e *Aedes aegypti*

FRANCIANNE GALOSSO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

FEVEREIRO – 2018

EFEITO DE COMPONENTES PROTEICOS E
DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Ricinus communis* CONTRA
Leishmania amazonensis, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma*
gondii e *Aedes aegypti*

FRANCIANNE GALOSI DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2018.

Comissão examinadora:



Dr. José Roberto Silva – UFRJ Macaé

Dr. Renato Augusto DaMatta - UENF

Dr. Francisco José Alves Lemos - UENF

Dr^a. Olga Lima Tavares Machado – UENF (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A toda minha família, em especial aos meus pais Francismar e Adriana, meu irmão Alexandre e minha avó Sebastiana, por seu amor, compreensão, dedicação e por estarem sempre ao meu lado me dando forças para continuar.

À Dr^a Olga Lima Tavares Machado por todos os ensinamentos durante estes anos, que foram passados com solidez científica, mas com todo o carinho, amizade e tranquilidade. Obrigada por tudo, você é um exemplo de dedicação e força.

Aos membros da banca, professores Renato Augusto DaMatta, Francisco José Alves Lemos e José Roberto Silva pela atenção e profissionalismo ao aceitarem participar da banca examinadora.

Aos amigos do laboratório, a outros amigos da UENF, aos amigos que a vida me deu e a minha amiga de sempre Mila Sepúlvida, pelo companheirismo, pelas conversas e pela alegria de poder tê-los por perto.

A todos os funcionários do LQFPP e do LBCT pela disponibilidade.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	14
1.1. Mamona (<i>Ricinus communis</i>).....	15
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
.....	18
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.4. <i>Leishmania amazonensis</i>	20
1.5. <i>Aedes aegypti</i>	21
1.6. Resistência	24
2. Objetivo Geral	25
Objetivos Específicos	26
3. Material e Métodos.....	26
3.1. Obtenção do óleo	26
3.2. Obtenção das sementes.....	26
3.3. Extração de proteínas da semente de <i>Ricinus communis</i>	27
3.4. Cromatografia de exclusão molecular.....	27
3.5. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC)	28
3.6. Dosagem de proteínas	28
3.7. Seqüenciamento de N-terminal e composição de aminoácidos.....	29
3.8. Obtenção das células e parasitos	29
3.9. Células hospedeiras (LLCMK2)	30
3.10. Manutenção de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigota	30
3.10.1. Aquisição de tripomastigota e manutenção intracelular de <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	30
3.11. Manutenção de <i>Leishmania amazonensis</i>	31
3.12. Ensaio de toxicidade	31
3.13. Microscopia óptica	32
3.14. Criação dos insetos e manutenção da colônia.....	32
3.15. Ensaio de toxicidade com <i>Aedes aegypti</i>	31

3.15.1 - Frações Proteicas	31
3.15.2 - Efeito do óleo de rícino e ácido ricinoleico	31
3.16. Espectrometria de massas	33
4. Resultados.....	34
4.1. Cromatografia de filtração em gel.....	34
4.2. Efeito antiparasitário e análises morfológicas de células hospedeiras não infectadas.....	35
4.3. Efeito antiparasitário em epimastigotas e tripomastigotas.....	36
4.4. Efeito antiparasitário em <i>Leishmania amazonensis</i>	36
4.5. Efeito antiparasitário em células infectadas com <i>T. gondii</i>	37
4.6. Cromatografia de fase reversa usando sistema de HPLC	38
4.7. Caracterização da Fração de Baixo Peso Molecular por seqüenciamento de N-terminal e composição de aminoácidos	39
4.8. Teste de toxicidade com <i>Aedes aegypti</i>	41
5. Discussão.....	46
6. Conclusões e Perspectivas.....	49
7. Referências	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mamona (*Ricinus communis*) (Disponível em: <https://www.embrapa.br/algodao/busca-de-imagens/-/midia/1801001/mamona> acesso em: 13/12/2017).....15
- Figura 2 - Sementes de *Ricinus communis* (mamona) (Disponível em: <https://acasatorta.wordpress.com/2008/08/06/ricina/> acesso em: 29/06/2016) 16
- Figura 3 - Formas do parasita durante a evolução (Disponível em: <http://resumao-e02.blogspot.com.br/2011/08/toxoplasnose.html> acesso em: 29/06/2016) 17
- Figura 4 - Barbeiro: inseto vetor da doença de Chagas (Disponível em: <http://www.insecta.ufv.br/Entomologia/ent/disciplina/ban%20160/Importancia%20medica/INSETOS%20E%20E7CAROS%20DE%20IMPO~de.htm> acesso em: 27/07/2016) 19
- Figura 5 - Formas do *Trypanosoma cruzi* encontradas no barbeiro (epimastigota) e nos hospedeiros vertebrados (amastigota e tripomastigota) (Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/363448/> acesso em: 27/07/2016)..... 19
- Figura 6 - Mosquito *flebótomo*, vetor da leishmaniose (Disponível em: <http://www.faperj.br/?id=816.2.2> acesso em: 27/07/2016)..... 20
- Figura 7- Estrutura da *Leishmania* parasito causador da doença leishmaniose (Disponível em: <https://pt.dreamstime.com/ilustrao-stock-estrutura-de-leishmania-image54254041> acesso em: 27/07/2016)..... 21

Figura 8 - Mosquito <i>Aedes aegypti</i> , responsável pela transmissão do vírus da dengue (Disponível em: http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/ acesso em: 29/06/2016).	22
Figura 9 - Perfil cromatográfico da filtração em gel - (Sephadex G-50) - (Coluna 50x1,0 cm) - (eluição de TFA 0,1%) - (Fração de 1,0 mL / tubo (fração de peso molecular baixo-FBPM)).	34
Figura 10 - Teste de citotoxicidade usando a FBPM em células hospedeiras LLCMK2. Número médio de células após incubações com 10, 15, 20, 40, 50 e 100 µg / mL de FBPM por 24 e 48 horas.	35
Figura 11 - Teste de citotoxicidade usando FBPM em tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Número médio de parasitas após incubações a 0,1; 1; 5 e 10 µg / mL durante 24 horas.	36
Figura 12- Teste de citotoxicidade usando FBPM sobre o crescimento de <i>L. amazonensis</i> . Número médio de parasitas após incubações a 0,1; 1; 5 e 10 µg / mL durante 24 horas e 48 horas.	37
Figura 13- Teste de citotoxicidade usando FBPM em células hospedeiras infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> . Número médio de células e parasitas após incubações a 5, 10 e 15 µg / mL às 24 horas. Repetimos a incubação com a maior concentração (15 µg / mL) por 48 horas.	38
Figura 14 - Perfil da fração de baixo peso molecular (FBPM) em cromatografia de fase reversa, sujeito a fracionamento em coluna C18. Eluente A 0,1% TFA e eluente B 80% ACN, 0,1% TFA. Absorbância: 220nm em preto e 295 nm em vermelho	39

Figura 15- Espectro do peptídeo majoritário do HPLC, após realização de um Maldi-TOF.....	41
Figure 16- Efeito da fração contendo Ricina em larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Número médio de larvas após incubação a 0,02, 0,7, 1,3, 2,3 e 83 μ M às 24 e 48 horas.	42
Figura 17– A: Controle – larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 5 mL de água destilada B: Larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 83 μ M da fração proteica contendo ricina	42
Figure 18- Efeito do óleo de rícino em larvas de <i>Aedes aegypti</i> (linhagem Rockfeller). Número médio de larvas após incubação com 100, 500 e 1000 μ L às 24 e 48 horas.....	43
Figure 19- Efeito do óleo de rícino em larvas de <i>Aedes aegypti</i> (cruzamento entre as linhagens Rockfeller e Campo). Número médio de larvas após incubação com 100, 500 e 1000 μ L às 24 e 48 horas.....	44
Figura 20- Efeito do ácido em larvas de <i>Aedes aegypti</i> incubadas por 24 e 48 horas. Número médio de larvas após incubação com 0,31, 0,62, 1,57 e 3,15 mM de ácido ricinoleico	45

Figura 21– A: Controle – larvas de *Aedes aegypti* em 5 mL de água destilada B: Larvas de *Aedes aegypti* em 3,15mM de ácido ricinoleico45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição em ácidos graxos do óleo de rícino e óleo de soja.....	16
Tabela 2- Composição de aminoácidos da fração peptídica utilizando o analisador de aminoácidos	40
Tabela 3 – Teste de toxicidade com as frações proteicas I (ricina), 2 (albuminas 2S) e 3 (FBPM).....	41

LISTA DE ABREVIações

FBPM Fração de Baixo Peso Molecular

Resumo

As plantas têm sido estudadas para uso no combate aos causadores de diversas doenças, pois ao longo de milhões de anos foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas, por serem submetidas a diversos fatores de estresse em seu ambiente. Elas expressam uma variedade de proteínas tóxicas, que conferem resistência contra herbívoros e patógenos, e que vão atuar de maneiras variadas sobre esses predadores e patógenos. Nesse contexto surgiu o interesse do nosso grupo no estudo do uso das frações proteicas e óleo de mamona no combate a parasitos e vetor de diversas doenças. As sementes de mamona (*Ricinus communis*) foram trituradas e desengorduradas e as proteínas solubilizadas em água (1:1). O extrato proteico foi submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-50) e três frações proteicas foram isoladas. A ação antiparasitária de todas as frações foi testada e dados promissores foram obtidos para a fração de baixo peso molecular (FBPM). Para os ensaios de citotoxicidade, células LLCMK2 não infectadas ou infectadas por *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* foram empregadas. FBPM promoveu redução de 50% da população de *T. cruzi* na concentração de 10 µg / mL e diminuiu a infecção por *T. gondii* em 49% na concentração de 15 µg / mL. Já em *Leishmania amazonensis* não apresentou efeito na concentração de 10 µg / mL. FBPM foi submetida à cromatografia de fase reversa (C-18 –HPLC) e o pico majoritário foi isolado. A composição em aminoácidos deste pico foi determinada e a investigação da estrutura primária foi realizada por sequenciamento automático e por espectrometria de massas. O N- terminal da proteína estava bloqueado, impedindo o sequenciamento por essa extremidade. A proteína também não foi ionizada nas condições testadas, MALDI ou por Eletron spray, impedindo portanto o sequenciamento por massas. Os componentes proteicos e o óleo de mamona foram testados contra larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* (cruzamento entre as linhagens Rockefeller e Campo). Dos componentes proteicos, somente o de maior peso molecular, fração enriquecida em ricina, e em altas concentrações (83 µM), mostrou ação larvicida. O óleo de mamona e o seu principal componente, ácido ricinoleico, na concentração 3,15 mM impediu o desenvolvimento de larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Em conclusão, componentes proteicos e ácido ricinoleico, podem ser alternativas para o combate de parasitas e contra o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras Chaves: *Ricinus communis*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* e *Aedes aegypti*.

Abstract

The plants have been studied for use in combating the causes of various diseases, because over millions of years they have been developing their own chemical defenses once they are subjected to various stress factors in their environment. They express a variety of toxic proteins, which confer resistance against herbivores and pathogens, and which will act in many ways on these predators and parasites. In this context, the interest of our group arose in the study of the use of protein fractions and castor oil in to combat parasites and vectors that cause various diseases. Castor seeds (*Ricinus communis*) were ground and delipidated. The proteins were solubilized in water (1: 1 w/v). The protein extract was subjected to gel filtration chromatography (Sephadex G-50) and three protein fractions were isolated. The antiparasitic action of every fraction was tested and promising data were obtained for the low molecular weight fraction (FBPM). For cytotoxicity assays, uninfected and infected LLCMK2 with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* were employed. FBPM caused the reduction of 50% of *T. cruzi* at concentration of 10 µg / mL and reduced *T. gondii* infection in 49% at concentration of 15 µg / mL. In *Leishmania amazonensis*, there was no effect on the concentration of 10 µg / mL. FBPM was subjected to reverse phase chromatography (C-18-HPLC) and the major peak was isolated. The amino acid composition of this peak was determined and the investigation of the primary structure was performed by means of automated sequencing and by mass spectrometry. The N-terminus of the protein was blocked, what did not allow N-terminal endpoint sequencing. The protein was not ionized under the conditions tested, MALDI or by Electron spray, thus impairing mass sequencing. Protein and castor oil fractions were tested against the third stage larvae of *Aedes aegypti* (crossing between Rockefeller and field-caught strains). From total proteins, only the one of higher molecular weight, the fraction enriched with ricin and at high concentrations (83 µM) showed larvicidal action. Castor oil and its main component, ricinoleic acid, at 3.15 mM negatively affected the development of larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. In conclusion, protein components and ricinoleic acid may be alternatives for the control of parasites and *Aedes aegypti* larvae.

Keywords: *Ricinus communis*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Aedes aegypti*.

1. Introdução

As plantas competem por espaço e se defendem do ataque de herbívoros e patógenos, para sobreviver e evoluir. Ao longo de milhões de anos, elas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas (Simas et al., 2004). Por essa, entre outras razões, a constituição química das plantas é tão complexa, e é o porquê de muitas plantas sintetizarem substâncias que vão atuar de maneiras variadas sobre seus predadores. Essas substâncias podem ser extraídas da casca, do caule, das folhas e dos frutos de diversas plantas (Barreto, 2005).

O sistema imune inato da planta constitui o primeiro mecanismo para a luta contra os agentes patogênicos que a invadem (Ferreira & Pinto et al., 2010). Compostos como metabólitos secundários, peptídeos antimicrobianos (AMPs), entre outros desempenham um papel-chave na defesa contra microrganismos, utilizando diversos modos de ação (Broekaert et al., 1995; Garcia-Olmedo et al., 1995; Ng, 2004; Portieles et al., 2006).

Alguns estudos já foram realizados utilizando plantas variadas com o objetivo de se analisarem os efeitos antiparasitários, inseticida e fungicida de proteínas e peptídeos. Nascimento (2004) relatou que o peptídeo Rc-Knotin, extraído de sementes de *Ricinus communis* (mamona), inibe a atividade enzimática da α -amilase salivar e da α -amilase de insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*. Já Lelis (2012) mostra os efeitos dos extratos obtidos de *Ottonia frutescens* e *Trigynaea oblongifolia* que inibiram a ovoposição de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*. Em 2015, Silva et al. relataram o uso da torta de *Ricinus communis* como inibidor de tripsina (RcTI) agindo no controle da germinação do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Em 2011, Rondon et al. testaram frações de *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* e *Ricinus communis* em etil acetato, clorofórmio e metanol contra *Leishmania*. A fração de acetato de etila de *R. communis* apresentou os melhores resultados. Esta fração foi altamente eficaz contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*.

1.1. Mamona (*Ricinus communis*)

A mamona é uma oleaginosa da família das Euforbiáceas (Figura 1) (Barros Junior et al., 2008), que se originou possivelmente na Etiópia, mas isso não é bem definido, sendo assim relatada ora como asiática, ora africana ou até americana (Silva et al., 2007). Ela é uma planta de clima tropical, necessitando de pelo menos 600 mm/ciclo de pluviosidade, e altitude de pelo menos 300 m, e seu ótimo ecológico é de 650 m de altitude (Amorim Neto et al., 2001; Távora, 1982). Sua disseminação pelo mundo é favorecida por ser uma planta rústica, assim em lugares de baixa precipitação pluvial (Barros Junior et al., 2008) ela consegue alcançar elevada produção de biomassa (Coscione & Berton, 2009). No Brasil, a mamona foi introduzida pelos portugueses, e hoje se encontra em todo território nacional por sua tolerância à seca (Beltrão & Cardoso, 2004).



Figura 1- Mamona (*Ricinus communis*) (Disponível em: <https://www.embrapa.br/algodao/busca-de-imagens/-/midia/1801001/mamona> acesso em: 13/12/2017)

No processamento das sementes (Figura 2) da mamona é extraído o óleo, cujo teor varia de 45% a 50%, sua composição se baseia em 98% de triacilgliceróis, onde o majoritário é o composto por ácido ricinoleico, os outros 2% são compostos insaponificáveis ou minoritários onde se encontram esteróis e tocoferóis (Berman, 2011; Freitas, 2011). A tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos do óleo de rícino e óleo de soja, para a comparação. Através de cromatografia gás-líquido em óleo de rícino (mamona) podem ser observados em três picos sendo 1,7% de ácido palmítico, 15,9% de ácidos C18 (esteárico, ácidos oleico e linoleico) e 82,4% de ácido

ricinoleico (Kato & Yamaura, 1970). Como descrito acima, o triacilglicerol do ácido ricinoleico (12-OH 9-C18:1) é o mais abundante nesse óleo, apresenta 18 carbonos, com uma instauração *cis* no C₉ e uma hidroxila no C₁₂ (Achaya et al. 1964). Baseado nesse fator, nosso estudo focou no óleo com todos os constituintes e também no ácido ricinoleico individualmente, pois queríamos averiguar se e a ação tóxica desse óleo sobre insetos, está diretamente relacionada a presença deste ácido graxo.



Figura 2- Sementes de *Ricinus communis* (mamona) (Disponível em: <https://acasatorta.wordpress.com/2008/08/06/ricina/> acesso em: 29/06/2016).

Tabela 1- Composição em ácidos graxos do óleo de rícino e óleo de soja

Ácidos graxos	Óleo de rícino	Óleo de soja
Ricinoleico	89,5	-
Linolênico	0,3	4,52
Linoleico	4,2	55,26
Oleico	3,0	23,61
Estearico	1,0	3,96
Palmítico	1,0	12,66
Diidroxiestearico	0,7	-

Nesse mesmo processamento das sementes um co-produto é gerado, a torta. Este co-produto é rico em proteínas com propriedades alergênicas e tóxicas em sua estrutura, o que torna esta planta resistente a pragas (Lima, 2011). Nas sementes e no pólen encontra-se um grupo de glicoproteínas denominado complexo CB-1A - Castor-bean allergen, uma mistura de proteínas de peso molecular de 10 e 18 kDa que apresentam propriedades alergênicas, sendo pertencentes à família das albuminas 2S. Já nas folhas e frutos encontramos o alcalóide volátil ricinina, enquanto as sementes contêm também a proteína ricina com peso molecular acima de 35 kDa,

que é altamente tóxica (Lorenzi et al., 2011; Godoy, 2009; Felix et al., 2008). Além destes compostos, peptídeos (< 10 kDa) também já foram identificados (Nascimento, 2002). E com relação à porção proteica da torta, nossos estudos focaram nesses peptídeos.

Como descrito anteriormente, as propriedades de *Ricinus communis* tem sido exploradas em estudos contra agentes causadores de doenças ou vetores de agentes causadores de doenças.

1.2. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita (Figura 3) intracelular obrigatório, pertencente à família Sarcocystidae, que infecta humanos e outros animais. *T. gondii* é causador da doença infecciosa chamada toxoplasmose, uma zoonose altamente disseminada, com taxas de prevalência variáveis entre 20 a 90%, na população humana, nas diversas partes do mundo (Amendoeira & Camillo-Couro, 2010).



Figura 3- Formas do parasito durante a evolução (Disponível em: <http://resumao-e02.blogspot.com.br/2011/08/toxoplasmose.html> acesso em 29/06/2016).

O homem pode adquirir a infecção por três vias: ingestão de oocistos provenientes do solo ou líquidos bebíveis contaminados com fezes de gatos infectados; ingestão de carne crua e mal cozida infectada com cistos, especialmente carne de porco, carneiro e por intermédio de infecção transplacentária. Esta última pode ocorrer em 40% dos fetos de mães que adquiriam a infecção durante a gravidez (Dubey & Jones, 2008).

A toxoplasmose apresenta um quadro clínico variado, desde infecção assintomática a manifestações sistêmicas extremamente graves, podendo causar encefalite, retinite, miocardite e a toxoplasmose disseminada (Cantos et al., 2000),

podendo levar a morte.

Os mais acometidos por essa doença são pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, transplantados ou com neoplasias (Trovão et al., 2013) e fetos (Figueiró-Filho et al., 2005).

Os medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose são espiramicina, pirimetamina, sulfadiazina, porém estes apresentam graves efeitos colaterais. A sulfadiazina acarreta risco de icterícia que pode levar a lesão cerebral e morte devido ao acúmulo de bilirrubina no cérebro do neonato, assim não deve ser usada no terceiro trimestre da gravidez. Sulfadiazina e pirimetamina produzem bloqueio em sequência do metabolismo do ácido fólico, e em altas doses, pirimetamina causa depleção do ácido fólico e supressão medular que pode se manifestar como anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia e pancitopenia (Amendoeira & Camillo-Couro, 2010; Tuon, 2012).

1.3. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas a qual atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, em sua maioria na América Latina (World Health Organization (WHO, 2017). *T. cruzi* é transmitido ao hospedeiro vertebrado através das fezes de triatomíneos (barbeiro) durante o repasto sanguíneo (Figura 4), quando as formas infectivas penetram no orifício da picada ou nas ranhuras causadas pela coceira após a picada do inseto (Coura, 2010). Outra forma de infecção é por via oral através do consumo de açaí e cado-de-cana, que tem sido mais estudada nos últimos 14 anos por conta da crescente ocorrência de surtos em diversos estados brasileiros (Ferreira et. al. 2014; Sousa et. al. 2015)



Figura 4 – Barbeiro: inseto vetor da doença de Chagas (Disponível em: <http://www.insecta.ufv.br/Entomologia/ent/disciplina/ban%20160/Importancia%20medica/INSETOS%20E%20E7CAROS%20DE%20IMPO~de.htm> acesso em: 27/07/2016).

No hospedeiro vertebrado, *T. cruzi* circula pelo sangue como tripomastigota e invade diferentes células, dentro das quais pode se converter na forma amastigota e se multiplicar, principalmente nos tecidos cardíaco e digestivo (Coura, 2010). Já sua forma epimastigota está presente no intestino do seu vetor, o barbeiro. Na Figura 5 podem ser observadas as três principais formas desse agente etiológico.

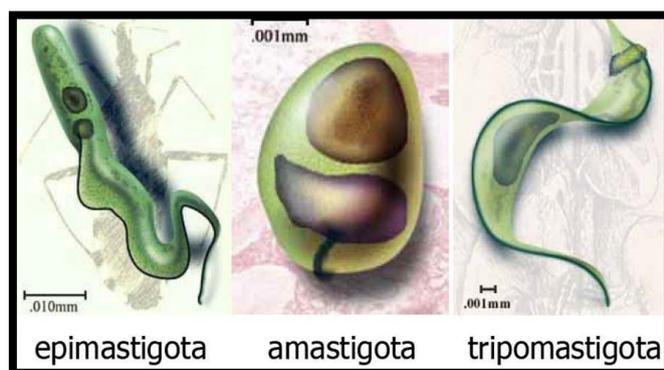


Figura 5 - Formas do *Trypanosoma cruzi* encontradas no barbeiro (epimastigota) e nos hospedeiros vertebrados (amastigota e tripomastigota) (Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/363448/> acesso em 27/07/2016).

Nifurtimox e benznidazol são os fármacos mais usados no tratamento da doença, utilizados principalmente no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, possuindo baixa eficácia na fase crônica da infecção. O Benznidazol por exemplo, possui efeitos colaterais como reações na pele; náusea; formigamento ou sintomas

de inflamações nos nervos; dor de cabeça; vertigem; fadiga; alterações no sangue, sendo algumas vezes necessária à sua suspensão. Além disso, não pode ser usado no primeiro trimestre de gravidez; mulheres em fase de lactação; pessoas com afecção neurológica; problemas no sangue; insuficiência do fígado; insuficiência dos rins (Jackson *et al.*, 2010; APT, 2010).

1.4. *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis é um dos protozoários responsáveis pela leishmaniose, causando de infecções cutâneas autolimitadas à leishmaniose cutânea difusa, mucocutânea e visceral, dependendo da espécie. Ela é transmitida por insetos vetores hematófagos infectados, flebotomíneos (Figura 6) e atinge de 700.000 a 1 milhão de pessoas no mundo e ocorrem de 20.000 a 30.000 mortes anualmente (Chang *et. al.* 1985; WHO, 2018).



Figura 6 – *Flebotomíneo*, vetor da leishmaniose (Disponível em: <http://www.faperj.br/?id=816.2.2> acesso em: 27/07/2016).

As formas infectivas dos protozoários de *amazonensis* são os promastigotas metacíclicos. Elas são fagocitadas pelo macrófago, onde se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas, então, proliferam por divisão celular binária até romperem o macrófago e poderem infectar novas células (Chang *et. al.* 1985). Na Figura 7 podem ser observadas as formas desse agente etiológico.

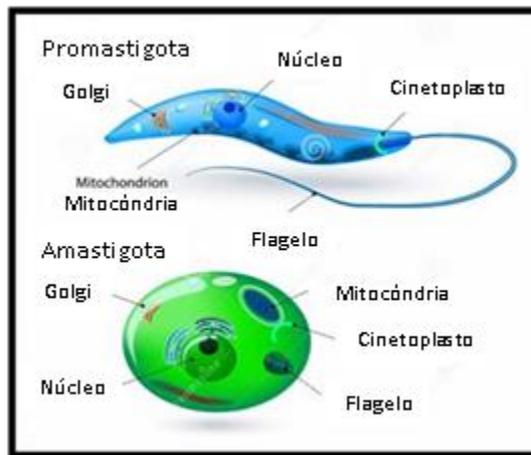


Figura 7- Estrutura da *Leishmania*, parasito causador da doença leishmaniose (Disponível em: <https://pt.dreamstime.com/ilustrao-stock-estrutura-de-leishmania-image54254041> acesso em 27/07/2016).

O controle dessa doença tem sido dificultado pela ausência de vacina, além das limitações relacionadas ao principal tratamento farmacológico, com antimoniais, que são tóxicos e podem apresentar eventos adversos como indução de arritmias cardíacas. A dose de antimônio e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos. É contra-indicado o uso por mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres, doentes com insuficiência hepática, renal e naqueles em uso de drogas anti-arrítmicas (Croft et. al. 2006).

1.5. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é o mosquito (Figura 8) transmissor da dengue, febre amarela, zika (essas três do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) e chikungunya (família *Togaviridae*), sendo o principal vetor em todo mundo (Câmara et al. 2007; Al-Abdely, 2016). Esse mosquito tem seus hábitos de vida (alimentação hematofágica, habitat) associados a hábitos humanos (Christophers, 1960). Sua eficácia está ligada a seu comportamento e capacidade de sobrevivência, incluindo a colocação de ovos em uma grande variedade de recipientes e a resistência desses ovos à dessecação

(Otero et al., 2006). Devido às condições climáticas, as áreas tropicais e subtropicais, favorecem o desenvolvimento desse inseto (Villar et al., 2015).



Figura 8 - Mosquito *Aedes aegypti*, responsável pela transmissão do vírus da dengue (Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/> acesso em: 29/06/2016).

Sobre as doenças transmitidas por esse vetor:

Dengue

Compreende quatro sorotipos de vírus (DENV 1-4) (Guzman & Harris, 2015), sendo uma doença que causa mais de meio milhão de hospitalizações por ano, com taxas de mortalidade entre 1% e 5% (Wilder-Smith et al., 2010), além de atribuir uma carga econômica grande para os sistemas de saúde dos países endêmicos (Suaya et al., 2009). A dengue é considerada endêmica em mais de 100 países com uma estimativa de que quase 3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco. Sendo assim há uma necessidade de testes de diagnóstico de dengue eficientes e baratos (Peeling et al., 2010).

As formas clínicas principais da dengue são: Dengue Clássica (DC), Dengue com complicações (DCC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), podendo evoluir para a forma mais grave que é a Síndrome do Choque da Dengue (SCD), podendo levar a morte (Dias et al., 2010). Entretanto, a maioria das infecções por dengue são assintomáticas ou causam sintomas leves, que se caracterizam por febre indiferenciada com ou sem erupção cutânea. A infecção por um sorotipo induz imunidade duradoura contra a reinfecção pelo mesmo sorotipo, mas proteção

transitória e parcial contra infecção com outro sorotipo (Peeling et al., 2010).

Foi produzida e licenciada uma vacina, CYD-TDV, contra dengue no México, nas Filipinas e no Brasil (Harapan et. al. 2016). Essa vacina está ligada diretamente ao risco de adquirir a doença da dengue grave, que leve a hospitalização em crianças, portanto não é recomendada para uso em menores de 9 anos de idade. Mesmo que CYD-TDV possa ser utilizada durante um surto, como uma forma estratégica de controle da dengue, ela não foi estudada para atuar nesse momento em específico. Portanto não é esperado que a vacinação tenha um impacto de grande significado durante o surto (WHO, Immunization, Vaccines and Biologicals, 2016).

Febre amarela

Endêmica na África e América do Sul, pode causar infecções que levam a quadros clínicos de síndrome severa com hemorragia e índices de mortalidade entre 20%-50%. (Monath, 2012; Barrett & Higgs, 2007). Estima-se 200.000 casos clínicos de febre amarelas por ano, 30.000 deles levando a óbito. Não existe uma droga antiviral para essa doença e ter a vacina disponível é importante (WHO, 2013).

Os Estados Unidos, França, China e Rússia fabricam a vacina viva atenuada 17D-204. Já no Brasil a vacina é fabricada usando a sub-cepa 17DD (Ferguson et. al. 2009; Marchetti, 2016).

Zika

Esse vírus foi descoberto há 69 anos na África transmitido através de vetores artrópodes, mosquitos do gênero *Aedes* de múltiplas espécies, mais comumente *Aedes aegypti*, que é amplamente distribuído em vários continentes (Petersen et al. 2016). O vírus também pode ser transmitido sexualmente (Foy et al. 2011). Os sintomas de uma infecção leve são erupção cutânea, febre, artralgia, conjuntivite e sem mortalidade (Duffy et al. 2009)

No Brasil o aumento da taxa de microcefalia tem sido associado ao surto do vírus Zika (Zanluca et al. 2015). Esse vírus tem estado descrito na placenta de mulheres grávidas, no líquido amniótico, no sangue e também dentro do cérebro de fetos microcefálicos. Esse vírus também é capaz de infectar e causar a morte de células-tronco neurais (Sarno et al. 2016; Calvet et al. 2016; Oliveira Melo et al. 2016; Martines et al. 2016; Mlakar et al. 2016; Tang et al. 2016).

Os medicamentos usados contra o vírus Zika não são específicos, mas são receitados mediante os sintomas que a pessoa infectada apresenta. Estudos têm sido desenvolvidos com uma variedade de candidatos à vacina contra esse vírus (Al-Abdely, 2016).

Chikungunya

É uma doença causada por um alfavírus da família dos arbovírus que foi relatado pela primeira vez durante um surto na Tânzania em 1952-1953 (Robinson, 1955; Ross, 1956). Os sintomas dessa doença geralmente são febre, erupção cutânea e artralgia. A sua forma mais grave está associada à encefalopatia, encefalite, miocardite, hepatite, falência multiorgânica e morte. Os recém-nascidos, crianças pequenas, idosos e pessoas com histórico de doenças pré-existente (doenças cardiovasculares, neurológicas, distúrbios respiratórios ou diabetes) correm maior risco de manifestar esse estágio mais grave (Schwartz & Albert, 2010; Weaver et al. 2012). A vacina contra o vírus da chikungunya ainda não é licenciada. Estudos para melhorar os candidatos à vacina têm sido realizados (Smalleya, et al. 2016).

No momento a forma mais usada no combate às doenças citadas acima, tem sido o controle do vetor. Ele é feito através da eliminação dos potenciais criadouros dos mosquitos vetores com aplicação de larvicidas (diflubenzuron, novaluron, pyriproxyfen) em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas (lambdacialotrina, malathion) para as formas adultas. Porém os problemas do uso desses larvicidas e inseticidas incluem o surgimento de populações de mosquitos resistentes a esses produtos, fazendo com que percam sua finalidade (Barreto, 2005).

1.6. Resistência

A população de seres da mesma espécie que perdeu sua susceptibilidade as drogas usadas contra ela é tida como resistente pela Organização Mundial de Saúde (Who, 2018).

Os tratamentos com larvicidas, inseticidas e medicamentos, contra parasitos e o vetor causadores de doenças relatados acima, apresentam características prejudiciais à saúde. Além disso, nos deparamos com a resistência desses parasitos e vetor a várias classes de drogas, larvicidas e inseticidas usadas para combatê-los (Mejia et al. 2012; Diniz et al. 2014). Isso implica na necessidade de se identificarem novos compostos com ação inseticida e microbicida. O uso de compostos vegetais, com mecanismos de ação totalmente elucidados, pode contribuir para o controle de várias doenças, sem causar tantos danos ao meio ambiente e aos organismos infectados.

As plantas por possuírem uma grande quantidade de substancias em sua composição, têm sido estudadas para uso no combate aos causadores de diversas doenças, o que as torna capaz de atingir contra uma gama maior de agentes patogênicos (Simas et al., 2004; Barreto, 2005). Nesse contexto, houve o interesse do nosso grupo em investigar as frações proteicas e óleo da mamona (*Ricinus communis*), os quais têm diversas aplicabilidades no mercado, em uma nova função, que é o combate aos parasitos e/ou vetores de doenças tropicais. Para tal utilizaremos as propriedades tóxicas e alergênicas da mamona, que vem sendo estudadas apenas com a finalidade de amenizar ou extinguir esses efeitos nos trabalhadores que a manuseiam em seu dia-a-dia e em pessoas num geral que desenvolvem alergia a essa planta. A descoberta de uma nova forma de uso dessas substâncias, produzidas por essa planta, poderá contribuir no combate desses patógenos.

2. Objetivo Geral

Avaliar a eficiência no uso dos componentes proteicos e do óleo extraídos e isolados das sementes de mamona (*Ricinus communis*), contra parasitos (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania amazonensis*) e o vetor *Aedes aegypti*.

Objetivos Específicos:

- Extrair e purificar as frações proteica e o óleo de *Ricinus communis*;
- Testar as frações (principalmente a fração peptídica) contra os parasitos *Leishmania amazonensis*, *T. gondii* e *T. cruzi*;
- Testar a toxicidade das frações e o óleo (principalmente o ácido ricinoleico) contra as larvas do mosquito;
- Caracterizar a (s) fração (s) de interesse quanto a sua estrutura química.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção das sementes e do óleo

O óleo das sementes de *Ricinus communis* nos foi fornecido pela Embrapa Algodão “Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)” - Campina Grande, Paraíba, onde foi extraído por prensa e centrifugado, sem nenhum procedimento químico de purificação.

3.2. Obtenção das sementes

As sementes de *Ricinus communis* foram fornecidas pela “Empresa Brasileira de Pesquisa e Agricultura (Embrapa)” – Campinas, São Paulo.

3.3. Extração de proteínas da semente de *Ricinus communis*

As frações da semente da mamona foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Thorpe *et al.* (1988) com adaptações feitas por Machado *et al.* (1992). As sementes (200 gramas) de mamona foram descascadas e maceradas, na presença de nitrogênio líquido. À massa resultante (125,34 gramas) foi adicionado 626,7mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (5mL para cada 1g de semente macerada) sob agitação por 3 h (a temperatura ambiente). O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos (a 4°C). O material foi filtrado para retirar todo sedimento e lipídeos, que foram descartados posteriormente. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até 90% de saturação. O material foi mantido durante 21 h sob agitação a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado contendo as proteínas de interesse foi recolhido e dissolvido em H₂O (1mL para cada 1g de semente macerada). Em seguida foi feita uma nova centrifugação (11.470 x g por 15 minutos), o sobrenadante foi recolhido e armazenado na geladeira.

3.4. Cromatografia de exclusão molecular

Para separação das frações proteicas presentes no extrato obtido, foi realizada uma filtração em gel utilizando resina Sephadex G-50 equilibrada em TFA 0,1%. As amostras foram eluídas com TFA 0,1% utilizando um fluxo de 1,0 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas.

Após a obtenção do material proveniente da filtração em gel, foi realizada uma análise dos tubos a 220 nm (PG instrumentLtd – Modelo T70 UV/VS) e as frações proteicas (FI, FII e FIII) foram separadas (Machado *et al.*, 1992).

3.5. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC)

A fração de baixo peso molecular que é a de nosso maior interesse foi submetida a um novo processo de purificação através de uma cromatografia líquida de fase reversa (coluna C18), com fluxo de 0,7 mL/min., sendo a fase móvel A (TFA 0,1%) e fase móvel B (TFA 0,1% + ACN 40%). O peptídeo majoritário isolado foi seco em centrífuga a vácuo (Speed- Vac, Savant – Modelo SC1110), e armazenado para análises futuras. Durante a eluição empregamos o gradiente descrito abaixo.

TEMPO (MIN.)	CONCENTRAÇÃO DE B (%)
0.01	0
5.00	0
7.00	15
10.00	15
13.00	45
18.00	45
20.00	50
23.00	50
25.00	52
28.00	52
40.00	80
43.00	80
45.00	0
65.00	INTERRUPÇÃO

3.6. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas das amostras em estudo foi feita pelo método de BCA - Ácido Bicinconínico (Smith, *et al*, 1985), sendo utilizada a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu, a λ 565 nm.

3.7. Seqüenciamento de N-terminal e composição de aminoácidos

A fração de interesse foi submetida ao **seqüenciamento N-terminal** utilizando o seqüenciador de aminoácidos (PPSQ-33, Shimadzu). Foi empregada a metodologia desenvolvida por Edman (1950). O processo de degradação de Edman é cíclico onde os resíduos de aminoácidos são clivados um a um (a cada ciclo) a partir da extremidade N-terminal da proteína e são identificados como derivados feniltioidantoínas (PTH-AA). Cada ciclo é dividido em três etapas: acoplamento do fenil-isotiocianato (PITC) como resíduo amino-terminal; clivagem do resíduo amino-terminal via ciclização em meio ácido; conversão do derivativo aminoácido-tiazolinona (AA-AZT) formado para um derivativo mais estável, a aminoácido-tioidantoína (AA-PTH), o qual pode ser identificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, usando um sistema de eluição isocrático (ACN 37%) (Allen, 1989).

Para análise da **composição em aminoácidos**, o peptídeo isolado por cromatografia fase reversa em coluna C18 foi hidrolisado com ácido clorídrico 6M a 150 °C por 90 minutos (Spackman, et al. 1958). O material hidrolisado foi seco em atmosfera N₂ e suspenso em HCL 0,01 M. O material foi aplicado no analisador de aminoácidos Shimadzu e analisado utilizando resina aniônica amino-Na, que separa os 20 aminoácidos padrões geralmente encontrados em proteínas.

Como meio de detecção dos aminoácidos o sistema emprega a derivatização pós-coluna com orto-fitalaldeído (OPA). Neste procedimento um detector de fluorescência foi empregado (Ex. 350nm e Em. 550nm).

3.8. Células hospedeiras (LLCMK2)

Células e parasitos foram obtidos de culturas presentes no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) em colaboração com o Prof. Edésio José Tenório de Melo. As células LLCMK2 (epitélio de rim de *Macaca mulatta*) foram mantidas em garrafas de plástico estéril de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de FBS (soro fetal bovino) (Sigma) e estreptomicina (1 µg / ml). As garrafas foram armazenadas a 37 ° C em 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

3.9. Manutenção de *T. gondii*

Antes da infecção, as células hospedeiras foram quantificadas quando se aproximaram da semi-confluência. Os parasitas libertados foram centrifugados a 906 x g durante 10 min. Uma alíquota de 10 µL foi diluída em 90 µL de líquido de contagem (75% de líquido de contagem e PBS a 25%) e uma alíquota de 10 µL foi quantificada a partir da câmara de Neubauer. Após as quantificações, foi feita uma interação de 10 parasitas por célula. Após 48 h, os parasitas foram liberados no meio de cultura. Todo o processo foi repetido para infecção de células novas.

3.10. Manutenção de *Trypanosoma cruzi* epimastigota

Os epimastigotas de *T. cruzi* (cepa DM28) foram cultivados em 5 mL de meio de triptose de infusão de fígado (LIT) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 4% de hemina a 28 ° C. Durante cinco dias, 1 mL de parasitas, ainda em crescimento exponencial da população, foram colocados em um tubo ao qual foi adicionado meio de cultura fresco para atingir 5 mL (Alexandrino; Carvalho et. al. 2016).

3.10.1 - Aquisição de tripomastigota e manutenção intracelular de *Trypanosoma cruzi*

Os epimastigotas foram climatizados a 37 ° C em meio RPMI 1680 durante 3 dias e depois utilizados para infectar células hospedeiras LLCMK2, em um processo semelhante ao descrito acima para *T. gondii*. Após sete dias, os tripomastigotas foram liberados no meio de cultura e coletados para ensaios de citotoxicidade.

3.11. Manutenção de *Leishmania amazonensis*

Os promastigotas de *L. amazonensis* (cepa Iv 79) foram cultivados em 5 mL de meio de Warren's [90% de caldo de coração/cerebral (Fluka), contendo 10% (v / v) FBS inativado por calor], enriquecido com 0,01% de ácido fólico e 0,4% de hemina a 28 ° C. Os protozoários foram transferidos para um novo meio a cada 3 dias

(Nascimento, et al. 2015).

3.12. Ensaios de toxicidade

Para realizar a experiência, as culturas celulares não infectadas em monocamada foram lavadas três vezes com 3 mL de PBS (solução salina tamponada com uma concentração de fosfato de sódio de NaCl 200 mM e 150 mM, pH 7,1) e tratada com tripsina, sendo assim suspensa. Esta suspensão foi dividida em uma placa de 24 poços, a uma taxa de $3,0 \times 10^4$ células por poço e armazenada durante 24 h. Após este período, as células não infectadas foram incubadas com as proteínas ou foram marcadas e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* a uma taxa de 5:1 (parasitas: células hospedeiras) e cultivadas por mais 24 horas.

Os epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram lavados três vezes com 3 mL de PBS (solução salina tamponada com uma concentração de fosfato de sódio de NaCl 200 mM e 150 mM, pH 7,1). Divididos em uma placa de 96 poços, a uma taxa de $1,6 \times 10^6$ parasitas por poço e incubadas com as proteínas por 24 horas.

Para incubação, a fração de baixo peso molecular (FBPM), obtida por cromatografia de filtração em gel, foi diluída em meio de cultura e esterilizada em um filtro de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Em seguida, o filtrado foi incubado com as células não infectadas, infectadas e em parasitas, em triplicata, em concentrações de 5, 10, 15, 20, 50, 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, durante 24 e 48 horas.

3.13. Microscopia óptica

Após os tratamentos, as células hospedeiras não infectadas e infectadas com *T. gondii*, os parasitos *T. cruzi* e *L. amazonenses* extracelular foram lavadas três vezes com PBS, fixadas durante 5 minutos na solução de Bouin e lavadas quatro vezes com PBS para realizar análises morfológicas e quantificação. Em seguida, as células foram coradas com solução de Giemsa (10%, v/v) à temperatura ambiente durante 6 horas. As lamínulas contendo as células foram desidratadas em uma mistura de acetona-xilol e colocadas em lâminas histológicas. Todas as preparações foram examinadas sob um microscópio óptico (Zeiss Axioinvert 135) equipado com uma objetiva de 20 e 40 x.

3.14. Criação dos insetos e manutenção da colônia

Aedes aegypti das linhagens Rockefeller, Campo e cruzamento das duas linhagens anteriores, obtidos de uma colônia mantida pela Prof.^a Marílvia Dansa Alencar, Laboratório de Química em Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), foram mantidos em gaiolas contendo solução aquosa de sacarose 10%. As fêmeas adultas, após fecundação, foram alimentadas com sangue de coelho para a postura dos ovos. Os ovos foram coletados e espalhados em um recipiente com água limpa por dois dias, para eclosão. As larvas foram alimentadas com ração de camundongo moída manualmente (aproximadamente 5g para cada 100 larvas no recipiente). Após 5 dias da emergência das larvas, as pupas começaram a ser removidas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As pupas foram então transferidas para uma gaiola até a emergência dos adultos.

3.15. Ensaio de toxicidade nas larvas de *Aedes aegypti*

3.15.1. Frações proteicas

Para verificar o potencial tóxico das frações proteicas da semente de *Ricinus communis* contra larvas de *Aedes aegypti* (terceiro estágio), 20 mg de cada fração foi diluída separadamente em 1 mL de água, dessas soluções estoque foram retiradas e utilizadas 5, 200, 400 e 800 μ L. Em cada poço a solução proteica foi adicionada e o volume completado a 20mL com água. 10 larvas foram adicionadas a esta solução e o desenvolvimento era observado por 24 e 48 horas.

Em um segundo ensaio, foram preparadas soluções estoque com 100 mg de cada fração diluídas separadamente em 1 mL de água. Destas foram retirados 250 μ L e levados a 5mL. 10 larvas foram adicionadas a esta solução contendo 5 mg/mL e o desenvolvimento foi observado por 24 e 48 horas.

3.15.2. Efeito do óleo de rícino e ácido ricinoleico

Alíquotas de 100, 500 e 1000 μ L de óleo de rícino (óleo de mamona) foram adicionadas em 20 mL de água. A esta suspensão foram colocadas 10 larvas e o

desenvolvimento foi observado por 24 e 48 horas.

O efeito do ácido ricinoleico, principal constituinte do óleo de rícino, também foi avaliado. Uma solução estoque com 45 μL do ácido diluído em 450 mL (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de óleo de soja foi preparada. Desta solução estoque foram preparadas diluições de 1, 2, 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, também em óleo de soja. 100 μL de cada uma destas soluções, incluindo a solução estoque foram colocados em 5 mL de água contendo 10 larvas. Após 24 e 48 horas o desenvolvimento das larvas era observado.

Todos os testes foram realizados com as larvas da linhagem Rockfeller e um cruzamento entre Rockfeller e campo, em seu terceiro estágio de desenvolvimento. Esse fator se deve as larvas desse estágio estarem mais robustas que o primeiro e segundo estágio e possuírem o hábito alimentar mais ativo que o estágio larvar quatro, que está mais próximo da transformação em pupa (estágio onde não há o hábito alimentar).

Para determinar o efeito tóxico das amostras, foram realizadas contagens das larvas vivas nos tempos de 24 e 48 horas após a incubação.

3.16. Espectrometria de massas

Uma alíquota contendo 5 μg da amostra (pool de peptídeos) seca, em centrífuga a vácuo (Speed-Vac, Savant – Modelo SC1110), foi suspensa em 10 μL de água com alto grau de pureza (Tédia). Logo após a amostra foi **Reduzida** (adição de 30 μL da solução de DTT a 10 mM, incubando por 30 minutos no Thermomixer a 25 °C sob agitação de 5 em 5 minutos), **Alquilada** (adição de 30 μL da solução de IAA a 50 mM incubando por 30 minutos, no escuro, no Thermomixer a 25°C sob agitação de 5 em 5 minutos) e **Digerida** (adição de 20 μL de Tripsina deixando incubado no Thermomixer por 17 horas a 37 °C). O extrato foi concentrado até 20 μL usando um Speed Vac, dessalinizada por C18 Zip Tip (Millipore, Billerico , MA , EUA), concentrado mais uma vez até 20 μL e transferido para frascos *Total Recovery* (Waters).

Os peptídeos gerados foram separados em Nano Acquity UPLC, uma coluna de fase reversa. A espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro

de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK), os espectros adquiridos foram processados em *Software ProteinLynx Global SERVER* (PLGS), utilizando como base de dados Uniprot/*Ricinus communis*. Informações adicionais foram buscadas em *software Blast2Go*.

4. Resultados

4.1. Cromatografia de filtração em gel

A Figura 9 mostra o perfil cromatográfico em Sephadex G-50 relativo ao fracionamento do extrato bruto de proteínas da semente. Três frações proteicas foram obtidas: FI, Fração de massa molecular (MM) > 35 kDa, enriquecida em ricina; FII, fração $35 < MM < 10$ kDa, região onde se encontram as albuminas 2S; e FIII, fração de massa molecular <10 kDa, denominada FBPM.

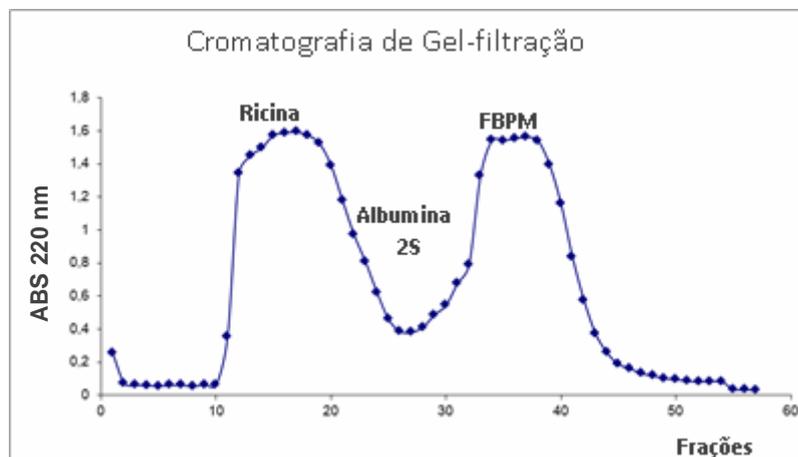


Figura 9- Perfil cromatográfico da filtração em gel - (Sephadex G-50) - (Coluna 50x1,0 cm) - (eluição de TFA 0,1%) - (Fração de 1,0 mL / tubo (fração de peso molecular baixo-FBPM)).

4.2. Efeito antiparasitário e análises morfológicas de células hospedeiras não infectadas

Na Figura 10 observamos o efeito de diversas concentrações de FBPM sobre células LLCMK2, mantidas em meio de cultura por 24 e 48 horas de tratamento. Até a concentração de 15 μ g/mL não observamos efeitos tóxicos no período analisado. A partir de 20 μ g/mL, 65% das células foram eliminadas após 24 de incubação. Toxicidades semelhantes foram observadas após incubações com 40 e 50 μ g / mL. Todas as células foram eliminadas após 24 horas, quando 100 μ g de FBPM foi utilizada. Quando as células eram incubadas na presença de FBPM por 48 horas, a toxicidade foi observada. Em concentração de 15 μ g / mL, o número médio de células diminuiu 10%, e todas as células foram eliminadas a partir de 20 μ g / mL.

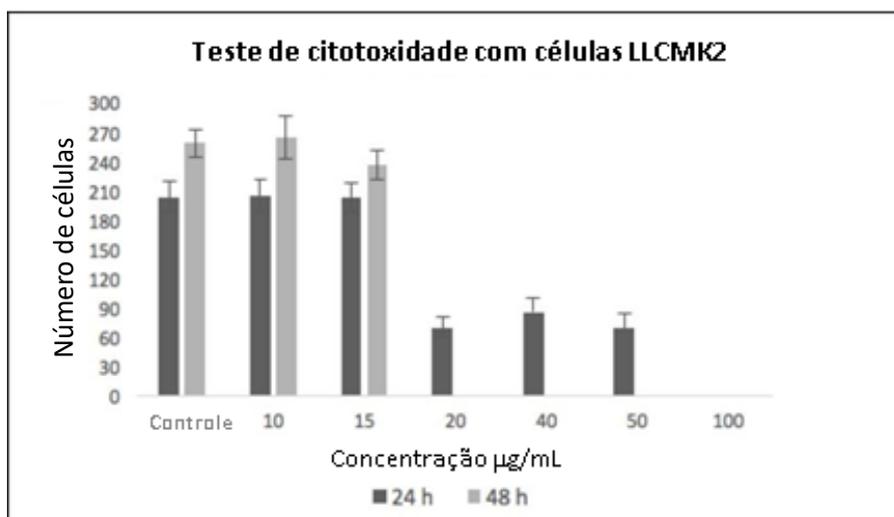


Figura 10 – Teste de citotoxicidade usando a FBPM em células hospedeiras LLCMK2. Número médio de células após incubações com 10, 15, 20, 40, 50 e 100 μ g / mL de FBPM por 24 e 48 horas.

4.3. Efeito antiparasitário em epimastigotas e tripomastigotas

O efeito de FBPM sobre as formas extracelulares de *T. cruzi*, epimastigotas e tripomastigotas é apresentado na Figura 11. Para as formas tripomastigotas, após 24 h de incubação com FBPM em 0,1 a 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, pequenas reduções de número de parasitas foram observadas em relação ao controle e em 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 50% dos parasitas foram eliminados. Não foi observado efeito tóxico nos epimastigotas nas mesmas condições (dados não apresentados).

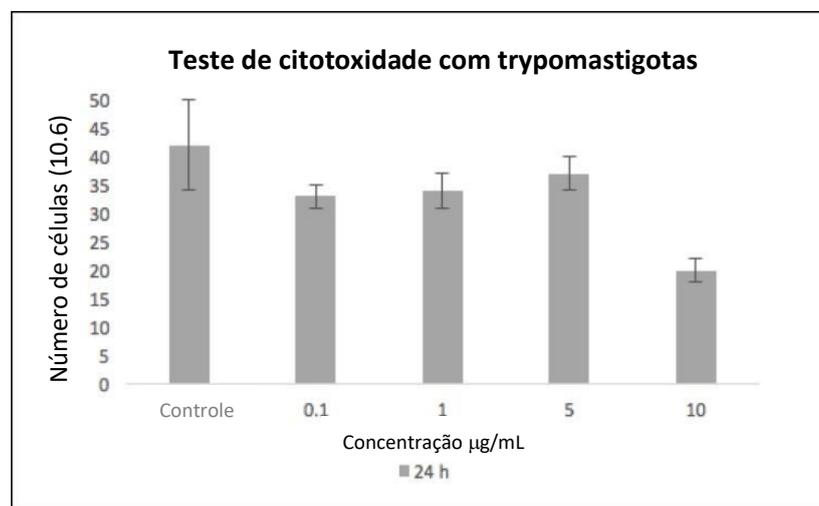


Figura 11- Teste de citotoxicidade usando FBPM em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Número médio de parasitas após incubações a 0,1; 1; 5 e 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ durante 24 horas.

4.4. Efeito antiparasitário em *L. amazonensis*

O efeito de FBPM sobre *L. amazonensis* é apresentado na Figura 12. O teste mostrou que não ocorre inibição do desenvolvimento da *amazonensis* em 24 horas. O número de parasitos após 48 horas não se altera quando comparado ao controle (48 horas) e aumenta sua população em quase o dobro quando comparado ao controle inicial (24 horas), como pode ser observado na concentração de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Os teste no tempo de 48 horas só foram realizados na concentração de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, pois no tempo de 24 horas, até nessa maior concentração, a FBPM não havia tido efeito algum sobre os parasitos.

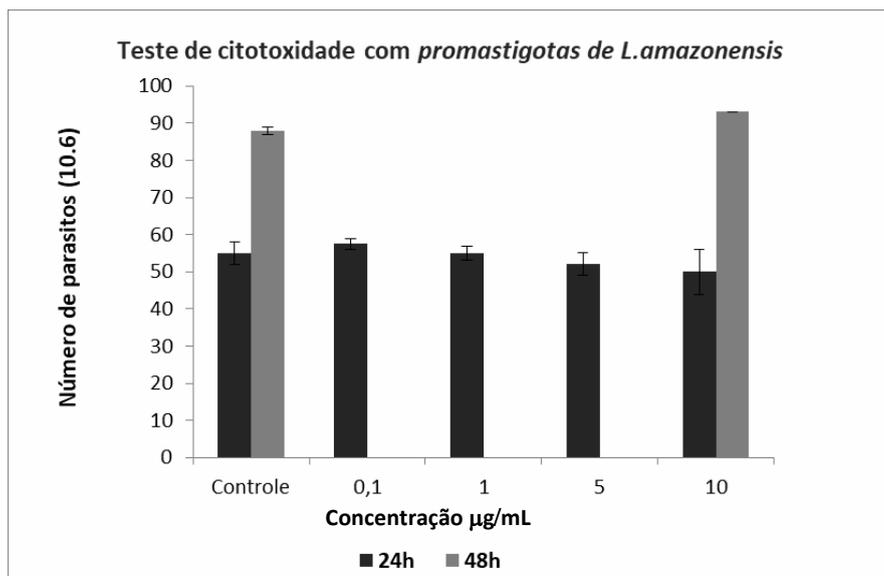


Figura 12- Teste de citotoxicidade usando FBPM sobre o crescimento de *L. amazonensis*. Número médio de parasitas após incubações a 0,1; 1; 5 e 10 µg / mL durante 24 horas e 10 µg / mL após 48 horas.

4.5. Efeito antiparasitário em células infectadas com *T. gondii*

Para verificar se o FBPM tem atividade contra parasitas intracelulares, utilizamos o *T. gondii* como modelo. Na Figura 13, observamos que na cultura não tratada, a maioria das células foi infectada (85%) e um número alto de parasitas foi observado. FBPM, na concentração de 15 µg / mL por 24 horas de incubação, provocou eliminação 11% dos parasitos. Em seguida, as culturas infectadas foram incubadas com esta mesma concentração (15 µg / mL) durante 48 h. Nestas condições, não foi observada a eliminação de células hospedeiras, mas o número de parasitas e porcentagens de células infectadas caiu 49%.

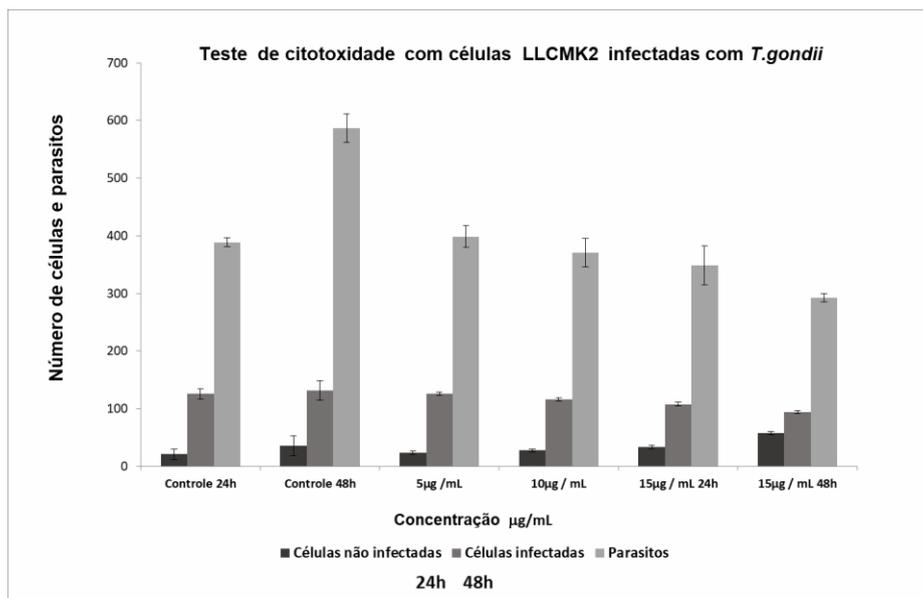


Figura 13- Teste de citotoxicidade usando FBPM em células hospedeiras infectadas com *Toxoplasma gondii*. Número médio de células e parasitas após incubações a 5, 10 e 15 µg / mL às 24 horas. Repetimos a incubação com a maior concentração (15 µg / mL) por 48 horas.

4.6. Cromatografia de fase reversa usando sistema de HPLC

Com o propósito de investigar qual o componente presente em FBPM com efeito protetor da infecção por *T. gondii*, esta fração proteica foi submetida à purificação por cromatografia de fase reversa, C-18 em Sistema HPLC. A Figura 14 mostra o perfil cromatográfico referente ao fracionamento da FBPM em coluna C18-HPLC. O pico principal (indicado pela seta na Figura 14) foi reunido e liofilizado.

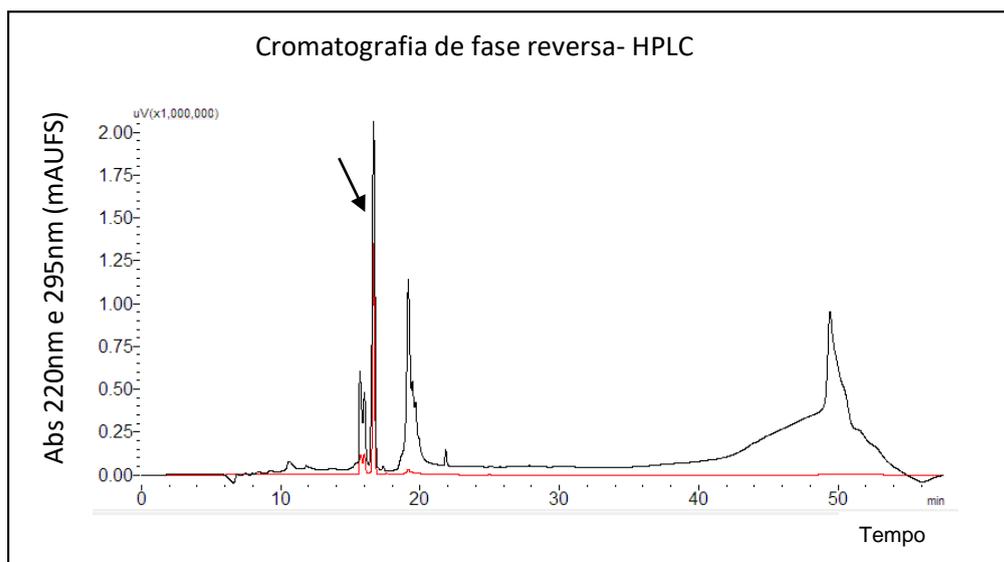


Figura 14- Perfil da fração de baixo peso molecular (FBPM) em cromatografia de fase reversa, sujeito a fracionamento em coluna C18. Eluente A 0,1% TFA e eluente B 80% ACN, 0,1% TFA. Absorbância: 220nm em preto e 295 nm em vermelho.

4.7. Caracterização da Fração de Baixo Peso Molecular por seqüenciamento de N-terminal e composição de aminoácidos

A composição mínima em aminoácidos do peptídeo majoritário purificado no HPLC é apresentada na Tabela 2. A hidrólise ácida converte asparagina em ácido aspártico e glutamina em ácido glutâmico. Por isto na tabela, Asx corresponde ao somatório Asp + Asn enquanto Glx corresponde ao somatório Glu + Gln. Os resíduos de triptofano, quando presentes, são destruídos e portanto não detectados após hidrólise ácida.

Tabela 2- Composição em aminoácidos do peptídeo majoritário purificado no HPLC utilizando o analisador de aminoácidos.

Composição mínima em Aminoácidos	
Aminoácidos	Número de resíduos
Asx	5
Thr	2
Ser	8
Glx	10
Pro	3
Gly	10
Ala	4
Val	3
Met	0
Ile	1
Leu	2
Tyr	0
Phe	1
His	2
Lys	2
Arg	1
Cys	6
Trp	nd

Não foi possível identificar a sequência N-terminal do peptídeo utilizando a metodologia de Edman em sequenciador automático, indicando que o N-terminal está bloqueado.

Também não foi possível identificar a sequência do peptídeo utilizando o espectrômetro de massas. A Figura 15 mostra o espectro do peptídeo majoritário obtido para a FBPM (nativo ou sem tratamento) por Maldi-TOF na faixa analisada, entre 600 e 5000 kDa.

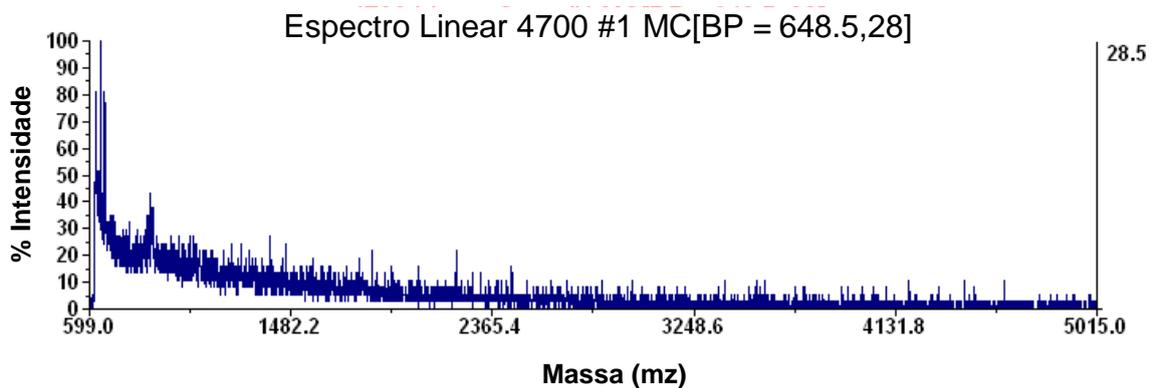


Figura 15- Espectro do peptídeo majoritário do HPLC, após realização de um Maldi-TOF.

4.8. Teste de toxicidade com *Aedes aegypti*

Investigamos os componentes proteicos e componentes do óleo das sementes de mamona sobre as larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Na Figura 9, verificamos que três frações obtidas quando o extrato bruto de proteínas de sementes de mamona foi fracionado por cromatografia de gel filtração.

Na tabela 2 mostramos os resultados obtidos para larvas incubadas com a fração 1 (ricina), com a fração 2 (albuminas 2S) e com a fração 3 (FBPM). Não observamos inibição do desenvolvimento das larvas em nenhuma das concentrações testadas com as frações 2 e 3.

Tabela 3 – Teste de toxicidade com as frações proteicas 1 (ricina), 2 (albuminas 2S) e 3 (FBPM).

Concentrações	Ricina 24h	Ricina 48h	Albumina 2S 24h	Albumina 2S 48h	FBPM 24h	FBPM 48h
0,02 µM	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
0,7 µM	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
1,3 µM	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
2,3 µM	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
83 µM	10 vivas	2 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas

Como o efeito tóxico da ricina, uma proteína inibidora de ribossomos, é amplamente descrito na literatura, e nenhum efeito tóxico para as larvas foi observado até a concentração de 2,3 μM , em 24 e 48 horas, a concentração desta proteína foi drasticamente aumentada até 83 μM . Mesmo nestas condições, nenhum efeito tóxico foi observado durante 24 horas de inibição. Porém em 48 horas, pode ser observada a morte de 90% das larvas (Figuras 16 e 17).

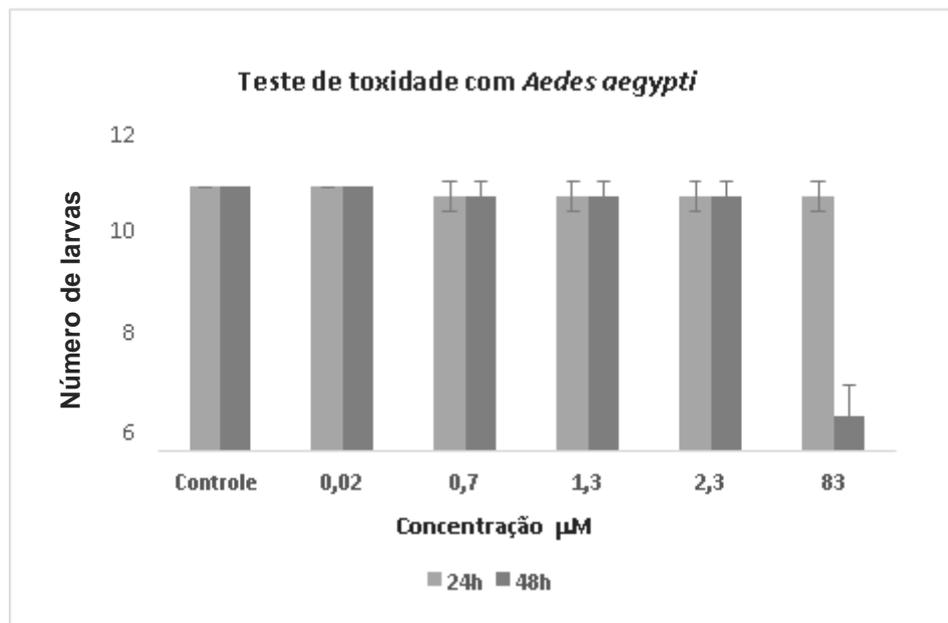


Figure 16- Efeito da fração contendo Ricina em larvas de *Aedes aegypti*. Número médio de larvas após incubação a 0,02, 0,7, 1,3, 2,3 e 83 μM às 24 e 48 horas.

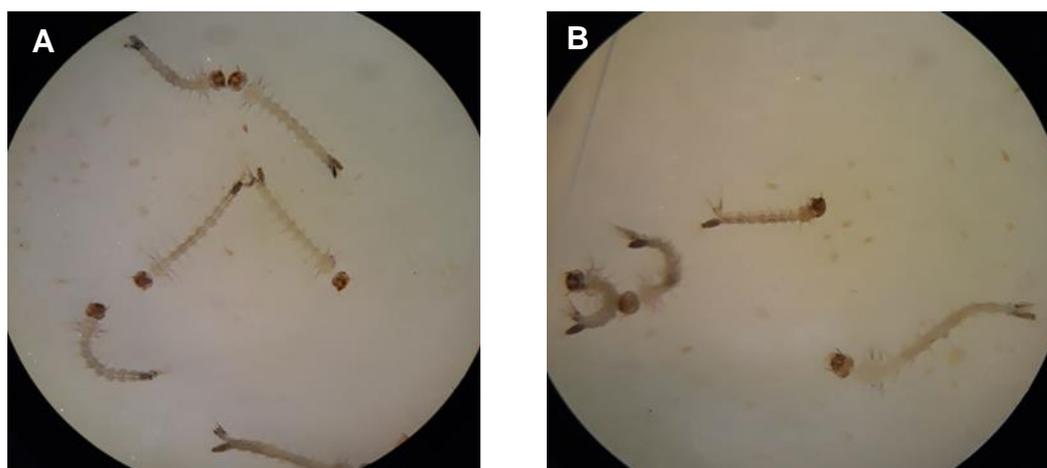


Figura 17– A: Controle – larvas de *Aedes aegypti* em 5 mL de água destilada B: Larvas de *Aedes aegypti* em 83 μM da fração proteica contendo ricina.

O efeito do óleo de mamona sobre as larvas é apresentado na Figura 18. Para excluir efeitos associados às características de insolubilidade do óleo, inicialmente incubamos as larvas na presença de óleo de soja. No controle 1, as larvas crescidas em meio aquoso e no controle 2, larvas mantidas na presença de óleo de soja. Não observamos mudanças significativas no desenvolvimento das larvas. Verificamos que o óleo de rícino não inibiu o crescimento de larvas quando 100 μL de óleo foi incubado com 10 larvas do inseto em 20 mL de solução. No entanto, formulações superiores a 500 μL /20 mL impediram os desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* (Rockfeller), Figuras 18. O aspecto do meio de crescimento e o perfil das larvas é apresentado na Figura 19.

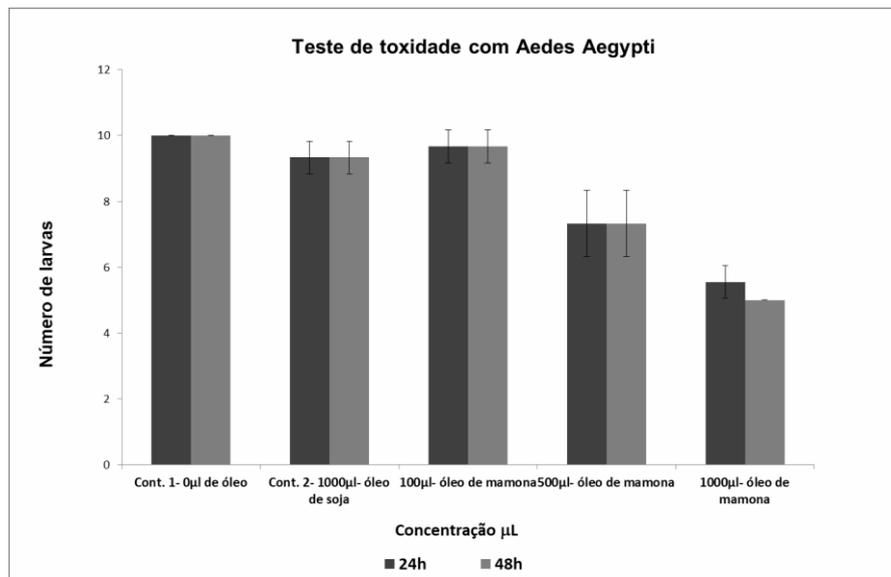


Figure 18- Efeito do óleo de rícino em larvas de *Aedes aegypti* (linhagem Rockfeller). Número médio de larvas após incubação com 100, 500 e 1000 μL às 24 e 48 horas.

Na Figura 19 podemos constatar que 1000 μL de óleo de rícino, inibiu o desenvolvimento das larvas do inseto, cruzamento entre a linhagens Rockfeller e Campo. 90% de inibição foi observado em 24 horas e 100% em 48 horas mostrando que essa linhagem foi bem mais sensível ao óleo que a mostrada anteriormente.

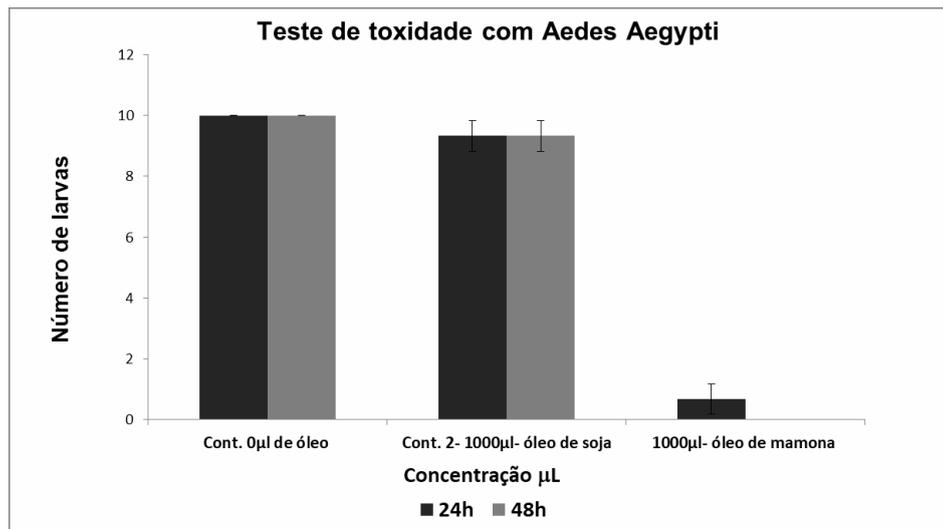


Figure 19- Efeito do óleo de rícino em larvas de *Aedes aegypti* (cruzamento entre as linhagens Rockefeller e Campo). Número médio de larvas após incubação com 100, 500 e 1000 µL às 24 e 48 horas.

A tabela 1 (seção introdução) apresenta a composição do óleo de soja e do óleo de rícino. O principal componente do óleo de rícino é inexistente no óleo de soja, sendo o ácido ricinoleico. Assim, testamos o efeito do ácido ricinoleico, dissolvido no óleo de soja, sobre as larvas do *A. aegypti*.

Nos teste com ácido ricinoleico, foram incubadas 10 larvas do inseto em 5 mL de água destilada em diferentes concentrações do componente. Até a concentração de 1,57 mM a inibição do desenvolvimento das larvas foi baixa, Figura 20. No entanto, na concentração de 3,15 mM (Figura 20) foi possível observar morte de 100% das larvas de *Aedes aegypti*. Na Figura 21 é apresentado o perfil das larvas, algumas destas ficaram com as extremidades bem escurecidas, após a morte por incubação com ácido ricinoleico.

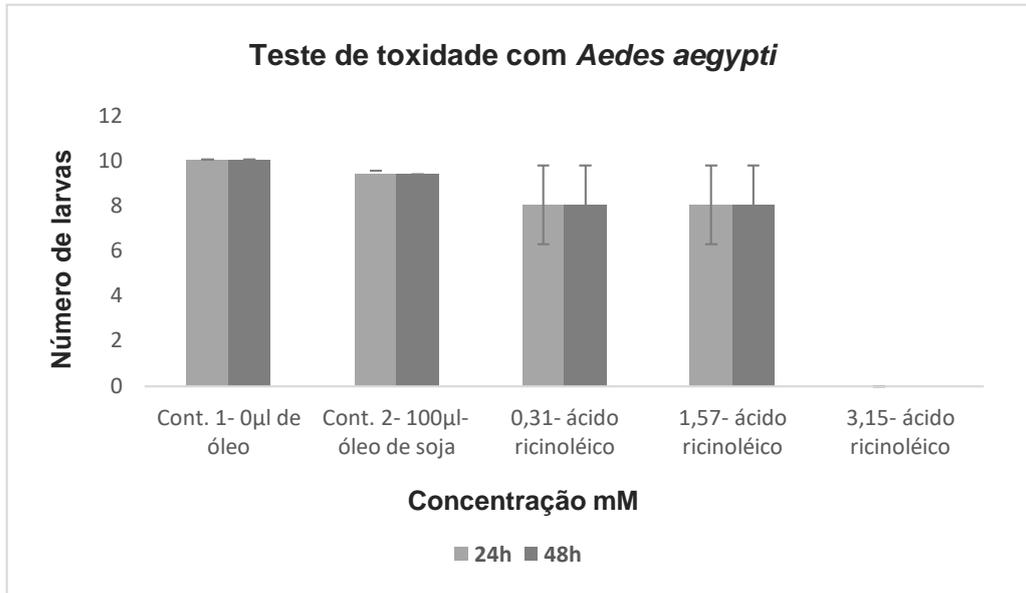


Figura 20- Efeito do ácido em larvas de *Aedes aegypti* incubadas por 24 e 48 horas. Número médio de larvas após incubação com 0,31, 0,62, 1,57 e 3,15 mM de ácido ricinoleico.



Figura 21– A: Controle – larvas de *Aedes aegypti* em 5 mL de água destilada B: Larvas de *Aedes aegypti* em 3,15mM de ácido ricinoleico.

5. Discussão

O nifurtimox, benznidazol, sulfadiazina e pirimetamina são exemplos de fármacos antiprotozoários usados para tratar toxoplasmose e doença de Chagas. Os parasitas que causam essas doenças, no entanto, tornaram-se resistentes aos medicamentos utilizados até hoje (Jackson et al. 2010, Apt, 2010, Holmes et al. 2011). No trabalho desenvolvido por Pereira et al. 2017, foi analisada a aplicabilidade de produtos à base de plantas no tratamento de infecções com *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Nele listaram-se metabólitos secundários identificados por rastreio fitoquímico a partir de cromatografia e espectrometria de massa. Sendo assim, identificar novos compostos com ação antiparasitária, se faz importante. Descrevemos aqui a atividade inibitória de uma fração polipeptídica sobre o desenvolvimento de *T. cruzi* e *T. gondii*.

Testamos a FBPM, fração polipeptídica de sementes de *Ricinus communis*, que reduziu a porcentagem intracelular de taquizoítos *T. gondii* a uma concentração de 15 µg / mL, reduzindo a infecção em 11% em 24 h e 49% em 48 h. Nesta concentração não foi observada toxicidade na célula hospedeira (Figura 10). Soares et al. 2015, em um estudo similar, testou o extrato de *Jatropha curcas* (JcCE). Estes autores relataram que culturas de células infectadas por *T. gondii* e incubadas durante 24 h com o extrato de JcCE nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,5 e 3,0 mg / mL diminuíram porcentagens de parasitas para 73,5, 66,6, 56,5 e 18,0%, respectivamente, em relação ao controle. A concentração da FBPM usada contra *T. gondii* em nosso estudo foi significativamente menor que aquelas usadas por Soares et al, 2015 para JcCE.

Observamos também que o uso da FBPM, 10 µg / mL apresentou ação anti parasitária para uma das formas de *T. cruzi*. A porcentagem de tripomastigotas no meio extracelular nesta concentração, foi reduzida em 50% em 24 h (Figura 11). Extratos foliares de *Palicourea marcgravii*, *Palicourea rudgeoides* e *Peperomia tetraphylla* diluídas em água, álcool butílico, metanol e diclorometan foram testados por Alexandrino et al. (2016) para avaliar o desenvolvimento de formas epimastigotes *T. cruzi*. Várias concentrações do extrato aquoso (25-400 µg / mL) contendo todas as substâncias vegetais não inibiram o parasita de forma eficiente. A concentração de 400 µg / mL do extrato de *P. marcgravii* e as concentrações de 100, 200 e 400 µg / mL do extrato de *P. rudgeoides* diluídos em álcool butílico, foram os melhores

inibidores, pois causaram 100% de eliminação. FBPM teve um efeito antiparasitário em concentrações bem abaixo das utilizadas por Alexandrino et al. 2016.

FBPM, não apresentou efeito tóxico sobre *Leishmania amazonensis*. Até a maior concentração usada, que foi de 10 µg / mL, por 24 horas, o número de parasitas no meio extracelular não se modificou. Já em 48 horas vimos a população desses parasitas aumentar em quase o dobro da inicial. Fardin et al. 2016 utilizou extratos da planta *Bertholletia excelsa*. Estes pesquisadores utilizaram componentes de massa molecular entre 6, 10 e 16 kDa. A porcentagem de protozoários tratados com essas frações foi reduzida em 37,7, 32,7 e 69,5% após 24 h e 37,5, 16,9 e 89,2% após 48 h, respectivamente. A partir desses resultados eles selecionaram a fração de 16 kDa como a mais eficiente por apresentar um efeito tóxico maior sobre *L. amazonensis*.

Esses foram os primeiros relatos sobre a utilização da fração de baixo peso molecular (FBPM) das sementes de *Ricinus communis* contra parasitos, apresentando seu efeito tóxico sobre *T. gondii* e *T. cruzi*. No entanto, a realização de estudos posteriores mostrando onde e como FBPM atua nesses parasitos serão necessários.

Como descrevemos, a FBPM apresentou efeitos tóxicos contra *T. cruzi* e *T. gondii*. Assim, esta fração foi repurificada por HPLC –C18. O sequenciamento N-terminal e por massas não foram possíveis. Troeira Henriques & Craik, 2017 descrevem uma família de peptídeos cíclicos denominados ciclotídeos cuja principal função está ligada à defesa de plantas contra patógenos, para a qual aplicabilidades farmacológicas e agronômicas têm sido atribuídas. As características principais desses peptídeos são uma estrutura macrocíclica de cabeça-cauda única e arranjo anudado de três ligações de dissulfeto, formadas a partir de seus seis resíduos cisteína conservados. Nestes, as pontes de enxofre e a ligação do resíduo N-terminal com o resíduo C-terminal, tornam estes peptídeos impossíveis de serem sequenciados por Edman, e as condições de padronização para ionização por Maldi e por eletrospray muito difícil. Assim, levantamos a hipótese de que o peptídeo majoritário de FBPM possa ser um ciclotídeo. Para ciclotídeos, como descrito por Troeira Henriques & Craik, 2017, a elucidação da estrutura primária só foi possível após a desnaturação, redução e alquilação do peptídeo, seguido por clivagens sequenciais pelas enzimas endo-glutamase e tripsina. Estudos que serão também empregados para a elucidação do pico majoritário de FBPM em etapas futuras.

As frações proteicas de *Ricinus communis*, testadas contra as larvas de *A.*

aegypti não mostraram efeitos tóxicos, na maioria das concentrações utilizadas. No entanto, um peptídeo de *R. communis* um inibidor de tripsina (RcTI) foi isolado por Silva et al. 2015. Estes pesquisadores observaram 91% de inibição das proteases do intestino médio das larvas de *A. aegypti*. Silva et al 2015 apontaram o potencial biotecnológico de RcTI como agente alternativo para combater o vetor *A. aegypti*. Somente a toxina ricina mostrou algum efeito em doses bem elevadas, 83 μ M. Este fato nos levou a questionar como uma proteína com propriedades tão tóxicas, já descritas na literatura (da Silva Fonseca & Soto-Blanco, 2014), poderia não ter efeito sobre as larvas do mosquito, a não ser em dose tão elevada. Trabalhos descrevem a presença de uma camada de material acelular no intestino do mosquito que separa o alimento das células epiteliais do intestino, denominada matriz peritrófica (Richards & Richards, 1977; Peters, 1992; Miller & Lehane, 1993). Insetos hematófagos adaptaram-se para anular ou minimizar os efeitos deletérios do grupamento heme livre e uma das mais importantes adaptações foi a ligação do heme à matriz peritrófica (Pascoa et al, 2002). Alguns trabalhos, através da observação da matriz peritrófica em cortes histológicos não corados e estudos citoquímicos, mostraram que parte do heme gerado durante a digestão sanguínea em *A. aegypti* liga-se fortemente à matriz (Graça-Souza et al, 2006; Pascoa et al, 2002). Em 2006, Devenport et al. mostraram que uma proteína de matriz peritrófica de *A. aegypti* foi capaz de associar uma grande quantidade de heme *in vitro*. Estes resultados sugerem que a matriz peritrófica pode funcionar como uma eficiente barreira para o heme. Estes estudos nos levam a supor que o mecanismo de defesa da larva de *A. aegypti* contra a ricina, pode estar ligado a capacidade da matriz peritrófica desse inseto em reter a absorção de tal proteína. Porém estudos posteriores serão necessários para essa comprovação.

Como descrito, as frações proteicas das sementes não apresentaram ação larvicida, no entanto, observamos a morte das larvas por componentes do óleo de rícino (mamona) em concentrações superiores a 500 μ L /20 mL (figuras 17 e 19). Componentes do óleo impediram o desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* tanto Rockefeller quanto larvas do cruzamento das linhagens de campo e Rockefeller em 50% e 90% após 24 horas de incubação, respectivamente. Como o ácido ricinoleico é o componente majoritário do óleo, este foi testado isoladamente. O ácido ricinoleico a 3,15 mM foi eficiente para provocar a morte de 100% das larvas de *Aedes aegypti* (cruzamento das linhagens de campo e Rockefeller, figura 21).

Luna et al. 2004 testaram os inseticidas químicos temephos “Temefós Fersol 1G”, (granulado, 1%) e cipermetrina “Cynoff 400 Pm”, (pó, 25%), substância sintética derivada da substância natural piretrina isolada de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Esses produtos foram diluídos em água mineral para preparar as soluções padrão com a mesma concentração do ingrediente ativo (i.a.) de 120 µM. As larvas de *A. aegypti* usadas foram coletadas no campo (criadouros artificiais de ferro velho em Curitiba e os testes feitos foram divididos em: concentração-diagnóstico (CD) 0,03 µM i.a. do organofosforado temephos, resultou em 90% de mortalidade. Para cipermetrina foi encontrado 65% de mortalidade na avaliação da concentração-diagnóstico (CD) 0,03 µM i.a. Para comparação a concentração-diagnóstico (CD) 0,030 µM i.a. de temephos e cipermetrina foi também utilizada para testar a colônia Linhagem Rockefeller, resultando em 100% de mortalidade para ambos os produtos. Para a cipermetrina, avaliou-se mais uma CD de 0,022 µM i.a. que também resultou em 100% de mortalidade. Os testes seguiram os padrões da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde abaixo de 80% de mortalidade considera-se a linhagem resistente a tal inseticida, sendo necessária a suspensão do uso deste. Os dados obtidos para o ácido ricinoleico se aproximam do uso dos organofosforados temephos assim como a cipermetrina usados por Luna et al. 2004. Esta concentração e porcentual de mortalidade atende a determinação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para que a linhagem não seja considerada resistente.

6. Conclusões e Perspectivas

A FBPM possui potencial antiprotozoário. Estudos estão em andamento para determinar as estruturas dos polipeptídeos anti-*T. cruzi* e anti-*T. gondii* e para determinar seu (s) mecanismo (s) de ação.

O óleo de rícino e o ácido ricinoleico possuem potencial larvicida. Porém, estudos posteriores ainda são necessários para verificar se as concentrações utilizadas os tornam viáveis para o uso comercial e determinar seus mecanismos de ação.

7. Referências

Achaya, K. T.; Craig, B. M.; Youngs, C. G. (1964). The Component Fatty Acids and Glycerides of Castor Oil. *JAOCS*, Vol. 41, p. 783-784.

Al-Abdely H. M., *MBBS, MD (2016)*. *An emerging teratogenic vírus*. *Saudi Med J*; Vol. 37 (8).

Allen, G. (1989). Sequencing of proteins and peptides. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Bundon R.H. and Knipperg, P.H. editors, 2^a edition.

Alexandrino, C. R., de Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., de Oliveira, É., Mello, V. M. G., Callado, C. H., & Da Cunha, M. (2016). *European Journal of Biomedical AND Pharmaceutical sciences*. *CEP*, 20550, 013.

Amendoeira, M. R. R., & Camillo-Coura, L. F. (2010). Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Sci Med*, 20(1), 113-9.

Amorim Neto, M. S.; Araújo, A. E., & Beltrão, N. E. M. (2001). Clima e Solo *In: Azevedo, D. M. P. De; Lima, E. F. (Ed.)*. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 63-76.

Apt, W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 243-253.

Barros Junior, G. *et al.* (2008). Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamona submetidas a estresse hídrico. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, v.12, n. 04, p. 350-355.

Barrett, A. D. T., & Higgs, S. (2007). Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*; 52:209–29.

Barreto, C. F. (2005). *Aedes aegypti*- Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Rev. Elet. FMB*, 1, 62-73.

Beltrão, N. E. M., & Cardoso, G. D. (2004). Informações sobre os sistemas de produção utilizados na ricinocultura na região Nordeste, em especial o Semi-Árido e outros aspectos ligados a sua cadeia. Embrapa. Campina Grande PB. (Comunicado Técnico.)

Berman, P.; Nizri, S., & Wiesman, Z. (2011). Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. *biomass and bioenergy*, 35(7), 2861-2866.

Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*, 108:1353–8.

Câmara, F. P.; Theophilo, R. L. G.; Santos, G. T. D.; Pereira, S. R. F. G.; Câmara, D. C. P., & Matos, R. R. C. D. (2007). Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2), 192-196.

Calvet, G.; Aguiar, R. S.; Melo, A. S. O.; Sampaio, S. A.; Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E. S. M.; Sequeira, P. C.; Mendonça, M. C. L.; Oliveira, L.; Tschoeke, D. A.; Schrago, C. G.; Thompson, F. L.; Brasil, P.; Santos, F. B.; Nogueira, R. M. R.; Tanuri, A., & Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infect. Dis.* 10.1016/S1473-3099(16) 00095-5.

Cantos, G. A.; Prando, M. D.; Siqueira, M. V., & Teixeira, R. M. (2000). Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(4), 335-341.

Coscione, A. R., & Berton, R. S. (2009). Barium extraction potential by mustard, sunflower and castor bean. *Scientia agricola*, v .66, n. 01, p. 59-63.

Coura, J.R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas Disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v. 115, n.1-2, p. 5-13.

Chang, K. P.; Fong, D., & Bray, R. S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: Chang, K. P.; Bray, R. S. (Ed). Leishmaniasis. London: *Elsevier*. p. 1-30.

Christophers, R. (1960). *Aedes aegypti* (L.): The Yellow Fever Mosquito. *Cambridge Univ. Press*.

Croft, S.L.; Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 111-126. (Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/19/1/111.full>>. Acesso em: 27/07/2016).

da Silva Fonseca, N. B., & Soto-Blanco, B. (2014). Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(3), 1415-1424.

Devenport, M., Alvarenga, P.H., Hisashi, L.S, Fujioka, M., Bianconi, L., Pedro L. Oliveira, P.L., Jacobs-Lorena, M., 2006. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochem*. 45, 95409.

Dias, L. B.; Almeida, S. C.; Haes, T. M.; Mota, L. M., & Roriz-Filho, J. S. (2010). Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, 43(2), 143-152.

Diniz, M. M. C. S. L.; Henriques, A. D. S.; Leandro, R. S.; Aguiar, D. L., & Beserra, E. B. (2014). Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Rev Saúde Pública* 48(5):775-782.

Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International journal for parasitology*, 38 (11), 1257-1278.

Duffy, M. R.; Chen, T. H.; Hancock, W. T.; Powers, A. M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S. et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl*

Edman, P. (1950). Method for determination of amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scan.* 28: 283-293.

Fardin, J. M.; Carvalho, L. P.; Nascimento, V. V.; Melo, E. J. T.; Gomes, V. M.; Machado, O. L. T.; Silva, F. C. V., & Carvalho, A. O. (2016). Biochemical purification of proteins from *bertholletia excelsa* seeds and their antileishmanial action *in vitro*. *World Journal of Pharmaceutical Research. Volume 5, Issue 7, 273-300.*

Felix, S. P.; Mayerhoffer, R. O.; Damatta, R. A.; Verícimo, M. A.; Nascimento, V. V., & Machado, O. L. T. (2008). Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*, 29(4), 497-504.

Ferguson, M.; Shin, J.; Knezevic, I.; Minor, P., & Barrett A. (2009). WHO working group technical specifications for manufacture and evaluation of yellow fever vaccines, Geneva, Switzerland, 13–14. *Vaccine* 28:8236–45

Ferreira, R. T. B., Branquinho, M. R., & Leite, P. C. (2014). Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária.

Ferreira, V. F., & Pinto, A. C. (2010). A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*, 33(9), 1829-1829.

Figueiró-Filho, E. A.; Lopes, A. H. A.; Senefonte, F. R. D. A.; Souza Júnior, V. D.; Botelho, C. A.; Figueiredo, M. S., & Duarte, G. (2005). Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 27(8), 442-9.

Freitas, G. A. (2011). Produção e área colhida de mamona no nordeste. Informe Rural ETENE- Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste Ambiente de Estudos e Pesquisa e Avaliação- AEPA, Nº 14.

Foy B. D.; Kobylinski, K. C.; Foy, J. L. C.; Blitvich, B. J.; Rosa, A. T.; Haddow, A. D.; Lanciotti, R. S., & Tesh, R. B. (2011). Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 880–882.

Graça-Souza, A.V.C., Maya-Monteiro, G.R.C., Braz, M.C., Paes, M.H.F., Sorgine, M.F., Oliveira, Oliveira, P.L., 2006. Adaptations against heme toxicity in blood feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 322–335.

Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A., & Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol*, 3:72–4.

Godoy, M. G.; Guitarra, M. L. E.; Maciel, F. M.; Felix, S. P.; Bevilaqua, J. B.; Machado, O. L. T., & Freire, D. M. G. (2009). *Enzyme and Microbial Technology*. v. 44, p. 317-322.

Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453-465.

Harapan, H., Anwar, S., Setiawan, A. M., & Sasmono, R. T. (2016). Dengue vaccine acceptance and associated factors in Indonesia: a community-based cross-sectional survey in Aceh. *Vaccine*, 34(32), 3670-3675.

Holmes, M., Crater, A. K., Dhudshia, B., Thadani, A. N., & Ananvoranich, S. (2011). *Toxoplasma gondii*: Inhibitory activity and encystation effect of securinine and pyrrolidine derivatives on *Toxoplasma* growth. *Experimental Parasitology*, 127(2), 370–375.

Jackson, Y. *et al* (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 10, p. e69-e75, Nov.

Kato, A., & Y. Yamaura (1970). A rapid gas chromatographic method for the determination of fatty acid compositions of soybean oil and castor oil. *Chem Ind* 39:1260.

Lelis, R. T. (2012). Efeitos de extratos de plantas da mata atlântica em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Lima, R. L.; Severino, L. S.; Sampaio, L. R.; Sofiatti, V.; Gomes, J. A., & Beltrão, N. E. (2011). Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 364-368.

Lorenzi, H. (2011). Plantas Tóxicas: Estudo de Fitotaxologia Química de Plantas Brasileiras. 1 ed. São Paulo. *Plantarum*, 256p.

Luna, J. E. D.; Martins, M. F.; Anjos, A. F.; Kuwabara, E. F., & Navarro-Silva, M. A. (2004). Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saúde Pública* 38(6): 842-3.

Machado, O. L., & Silva Júnior, J. G. (1992). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is a part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biológicas*, 25(6), 567–82.

Marchetti, M. B. S. D. O. (2016). *Desenvolvimento e validação de um ensaio imunoenzimático alternativo para quantificação de anticorpos IgG contra o vírus da Febre Amarela* (Doctoral dissertation).

Martines, R. B.; Bhatnagar, J.; Keating, M. K.; Silva-Flannery, L.; Atis Muehlenbachs, A.; Gary, J.; Goldsmith, C.; Hale, G.; Ritter, J.; Rollin, D.; Shieh, W.; Luz, K. G.; Oliveira Ramos, A. M.; Davi, H.P.F.; Oliveria, W. K.; Lanciotti, R.; Lambert, A., & Zaki, S. (2016). *Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses*. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. (MMWR)* 65, 159–160.

Miller, N., Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. *Parasitol. Today* 9, 45-50.

Mlakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popovic, M.; Poljsak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.;

Rus, K. R.; Vipotnik, T. V.; Vodusek, V. F.; Vizjak, A.; Pizem, J.; Petrovec, M., & Zupanc, T. A. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–958.

Mejia A. M.; Hall B. S.; Taylor M. C.; Gómez-Palacio A.; Wilkinson S. R.; Triana-Chávez O. et al. (2012). Benznidazole- resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Inf Dis.* 206:220-228.

Monath TP. (2012). Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Rev Vaccines* 11:427–48.

Nascimento, V. V. (2002). Identificação de um polipeptídeo inibidor de α -amilase isolado das sementes de *Ricinus communis*. Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Nascimento, V.V. (2004). Caracterização química e biológica de um peptídeo inibidor de α -amilase isolado de sementes de *Ricinus communis*. Dissertação de mestrado para obtenção de grau de Mestre em Biociências, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Nascimento, V. V., Mello, É. D. O., Carvalho, L. P., de Melo, E. J., Carvalho, A. D. O., Fernandes, K. V., & Gomes, V. M. (2015). PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. *Bioscience reports*, 35(5), e00248.

Ng, T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, 25:1215–22.

Oliveira Melo, A. S.; Malinger, G.; Ximenes, R.; Szejnfeld, P. O.; Sampaio, S. A., & Filippis, A. M. B. (2016). *Physician Alert. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47, 6–7.

Otero, M.; Solari, H., & Schweigmann, N., (2006). A stochastic population dynamics model for *Aedes aegypti*: formulation and application to a city with temperate climate. *Bull. Math. Biol.* 68 (8), 1945–1974.

Pascoa, V., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., Silva, J.R., Alvarenga, P.H., JacobsLorena, M., Lemos, F.J.A., 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 517523.

Peters, W., 1992. Peritrophic membranes. Bradshaw e cols., Zoophysiology, SpringerVerlag, Berlim 30, 1a.. edição, p. 238.

Peeling, R. W.; Artsob, H.; Pelegrino, J. L.; Buchy, P.; Cardoso, M. J.; Devi, S., & Halstead, S. B. (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S30-S37.

Pereira, R., Greco, G., Moreira, A., Chagas, P., Caldas, I., Gonçalves, R., & Novaes, R. (2017). Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: A systematic review of preclinical in vivo evidence. *Parasitology*, 144 (10), 1275-1287.

Petersen, L. R.; Jamieson, D. J.; Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *N Engl J Med* 374: 1552-1563

Portieles, R.; Ayra, C., & Borra's, O. (2006). Basic insight on plant defensins. *Biotecnol Apli*, 23:75–8.

Richards, A.G., Richards, P.A., 1977. The peritrophic membranes of Insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22, 219-240.

Robinson M.C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 49 (1), 28-32.

Rondon, F. C.; Bevilaqua, C. M.; Accioly, M. P.; Morais, S. M.; Andrade-Junior, H. F.; Machado, L. K., ... & Rodrigues, A. C. M. (2011). In vitro effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary parasitology*, 178(3), 235-240.

Ross R. W. (1956). - The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg. (London)*, 54 (2), 177-191.

Sarno M.; Sacramento, G. A.; Khouri, R.; Rosário, M. S.; Costa, F.; Archanjo, G.; Santos, L. A.; Nery, N. Jr.; Vasilakis, N.; Ko, A. I., & Almeida, A. R. P. (2016). Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004517.

Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.*; (7)491–500.

Silva, R. G.G.; Vasconcelosa, I. M.; Acrísio Filho, J. U. B.; Carvalho, A. F.; Souza, T. M.; Gondim, D. M.; Varela, A. L. N., & Oliveira, J. T. (2015). 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, 48-55.

Silva, T. R. B. *et al.* (2007). Adubação nitrogenada em cobertura na cultura da mamona em plantio direto. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 42, n. 09, p. 1357-1359.

Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kuster, R. M.; Oliveira Filho, A. M., & Lage, C. L. S. (2004). Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quím nova*, 27(1), 46-49.

Smalleya, C.; Erasmusb, J. H.; Chessonb, C. B., & Beasleyc, D. W. C. (2016). Status of research and development of vaccines for chikungunya. *Vaccine* 34, 2976–2981.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Soares, A. M. S., Carvalho, L. P., Melo, E. J. T., Costa, H. P. S., Vasconcelos, I. M., & Oliveira, J. T. A. (2015). A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Experimental parasitology*, 153, 111-117.

Sousa, E. S. M., de Sousa Barbosa, M. R., de Castro Gomes, I. C., & García-Zapata, M. T. A. (2015). Os gambás (*Didelphis* sp) e a Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp) na Possível Transmissão Oral do *Trypanosoma cruzi*: Revisão da Literatura. *Journal of Health Sciences*.

Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1260. Appud Allen.

Suaya, J. A.; Shepard, D. S.; Siqueira, J. B.; Martelli, C. T.; Lum, L. C.; Tan, L. H., & Armien, B. (2009). Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5), 846-855.

Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S. C.; Jin, P.; Song, H., & Ming, G. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth Cell Stem Cell 18, 1–4.

Távora, F. J. A. (1982). A cultura da mamona. Fortaleza: EPACE, 111 p.

Thorpe, S. C.; Kemedly, D. M.; Panzani, R. C.; Mcgulr, B.; Lord, M. Allergy to castor bean II – identification of the major allergens in castor bean seeds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 82, p. 67-62. 1988.

Troeira Henriques, S., & Craik, D. J. (2017). Cyclotide structure and function: The role of membrane binding and permeation. *Biochemistry*, 56(5), 669-682.

Trovão, F. P.; Spaziani, G.; Vasconcelos, R. M.; Teixeira, R. A.; Antunes, R.; Patzina, T. P. D. A. B., & Mello, C. F. (2013). Toxoplasmose gástrica em paciente infectado pelo vírus da imunodeficiência humana. Relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Clín.*

Méd, 11(4).

Tuon, F. F. (2012). Toxoplasmose. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/1270/toxoplasmose.htm>. Acesso em: 24 jun. 2016.

Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., ... & Rey, L. C. (2015). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 372(2), 113-123.

Weaver, S. C.; Osorio, J. E.; Livengood, J. A.; Chen, R., & Stinchcomb, D. T. (2012). Chikungunyavirus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines* (9):1087–101.

Wilder-Smith, A., Ooi, E. E., Vasudevan, S. G., & Gubler, D. J. (2010). Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Current infectious disease reports*, 12(3), 157-164.

World Health Organization (WHO). (2013). Vaccines and vaccination against yellow fever: *WHO Position Paper— recommendations*. *Vaccine* 33:76–7.

World Health Organization (WHO). (2016). Dengue vaccine: WHO position paper – recommendations. *Immunization, Vaccines and Biologicals*, Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland.

World Health Organization (WHO), TDR. (2017). Chagas disease (American trypanosomiasis). (Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 16/04/2018).

World Health Organization (WHO), TDR. (2018). Leishmaniasis. (Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 16/04/2018).

Zanluca C.; Melo, V. C. A.; Mosimann, A. L. P.; Santos, G. I. V.; Santos, C. N. D., & Luz K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 569–572.

